

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE SINOP
Programa de Pós Graduação em Ciências Ambientais

**Densidade populacional e bioprospecção de bactérias com potencial antagonista em solo
sob restauração florestal no ecótono Cerrado/Amazônia**

Tatiana Caroline Dias Pereira

Sinop, Mato Grosso

Fevereiro, 2015

TATIANA CAROLINE DIAS PEREIRA

**Densidade populacional e bioprospecção de bactérias com potencial antagonista em solo
sob restauração florestal no ecótono Cerrado/Amazônia**

Orientador: DR. ANDERSON FERREIRA

Dissertação apresentada ao PPGCAM como
parte dos requisitos para a obtenção do título
de Mestre em Ciências Ambientais.

Sinop, Mato Grosso

Fevereiro, 2015

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

P436d Pereira, Tatiana Caroline Dias.

Densidade populacional e bioprospecção de bactérias com potencial antagonista em solo sob restauração florestal no ecótono Cerrado/Amazônia / Tatiana Caroline Dias Pereira. -- 2015
53 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientador: Anderson Ferreira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto de Ciências Naturais, Humanas e Sociais, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Sinop, 2015.

Inclui bibliografia.

1. 16 rDNA. 2. *Fusarium oxysporum*. 3. *Rhizoctonia solani*. 4. Controle biológico. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE SINOP – CUS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS NATURAIS HUMANAS E SOCIAIS - ICNHS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS



FOLHA DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Densidade populacional e bioprospecção de bactérias com potencial antagonista em solo sob restauração florestal no ecótono Cerrado/Amazônia

AUTOR : Mestrando(a) Tatiana Caroline Dias Pereira

Dissertação defendida e aprovada em: 20 / 02 / 2015

Composição da Banca Examinadora:

Dr. Anderson Ferreira

Dr. Rafael Ferreira Alfenas

Dra. Fabiana Rezende de Abreu

Presidente Banca / Orientador: Dr. (a) _____

Anderson Ferreira

Instituição: Embrapa Agrossilvipastoril

Examinador Interno. Dr. (a) RAFAEL FERREIRA ALFENAS

Instituição: Universidade Federal do Mato Grosso

Examinador Externo. Dr. (a) Fabiana Rezende de Abreu

Instituição: Embrapa Agrossilvipastoril

SINOP, 20/02/2015

Sinopse:

Quantificou-se as bactérias presentes no solo de uma área submetida à restauração florestal, avaliando o potencial de antagonismos das bactérias isoladas contra fitopatógenos identificando através de ferramentas moleculares os isolados positivos para o antagonismo. As amostras de solo foram coletadas na área experimental da Embrapa Agrossilvipastoril, localizada no município de Sinop-MT, e processadas em laboratório, no período de abril de 2013 à novembro de 2014.

Palavras-chave: 16 rDNA, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, controle biológico

DEDICO

A Maria Solange, minha mãe, por sempre acreditar em mim,
me incentivar e ensinar que o conhecimento
e a fé, nunca poderão ser tirado de nós.

AGRADECIMENTOS

A Deus, a quem até hoje chamo carinhosamente de papai do céu durante nossas conversas, por permitir que minha existência nesse plano espiritual se passe ao lado de pessoas tão especiais. Obrigada por se mostrar presente em todos os momentos.

A minha mamis linda, Maria Solange, pela sua existência, por me aceitar vir ao mundo como sua filha, por todas as oportunidades oferecidas para que eu alcançasse meus sonhos. Agradeço por ela ser como é, minha inspiração, meu porto seguro, minha vida.

Aos meus sobrinhos lindos, tão amados, Higor e Isabela. Por serem a alegria dos meus dias. Por estarem presente mesmo que a mais de 2 mil km de distância diariamente em minha vida. Pelas fotos e áudios no whatsApp, pelas cartinhas, brincadeiras e amor.

A minha vovis fofa, D. Geralda, tão querida. Pelas orações, biscoitos de polvilho, chás milagrosos e carinho dispensados.

Ao meu irmão, Tiago, pelo carinho (e por me dar sobrinhos lindos!).

Ao meu companheiro de todas as horas, sempre presente, Eduardo. Por suportar a distância (quase sempre!) sem cobranças, por todo amor e amizade dispensados. Pelos cafés da manhã com pão de queijo em Minas, pelas conversas, risadas e carinho. Pelos 360°! Por todas as vezes que tocou Franz Liszt, em especial Liebestraum ao piano até pelo telefone ou Skype, porque é a minha música e eu sempre quero escutar, diminuindo assim a saudade. Pela liberdade dividida e confiada.

Ao meu orientador, Anderson Ferreira. Primeiro, pela orientação e oportunidade de crescimento, mas acima de tudo, pela amizade. Por nos mostrar a importância do trabalho em equipe, pelos conhecimentos divididos e risadas.

Aos meus amigos Juliana e Vinicius, pela irmandade. Nenhuma outra palavra caberia para descrever nossa relação de amizade, cumplicidade e companheirismo. Eles estão distantes, mas nunca ausentes da minha vida. Por todas as vezes que entenderam essa ausência. São os irmãos que eu escolhi para toda a vida.

Aos meus queridos amigos Gabriel, Raquel e Pâmela, por todo incentivo, amizade e churrascos. Vocês foram imprescindíveis para esse momento, principalmente por não me deixarem desistir de fazer a prova!

Aos meus amigos de pós-graduação e agora da vida, Tamara e Rafael. Por nossa amizade ter sobrevivido as eleições, por não se importarem de eu não responder nem abrir nenhum vídeo no whatsApp só porque eu sou chata e não tenho paciência. A amizade conquistada, será pra sempre.

Ao meu amigo querido Bruno, vulgo Brubru. Por todas as vezes que me socorreu no laboratório, por toda a ajuda nos cálculos químicos, por todos os momentos engraçados e baladas inesquecíveis.

Aos meus queridos amigos de laboratório Mirelly, Jacqueline, Vinícius, Anizia, Joyce e Fátima. Obrigada pelos momentos de descontração, de intervalos para o lanche, de ajuda e risadas no lab. Foi mais divertido com vocês.

A Maira, por todo cuidado com minhas bactérias, por toda a ajuda no laboratório.

A Kellen, pela ajuda quando estava começando no laboratório, pela amizade, risadas, pelos passeios de sábado e pela meditação. Por nos fazer pirar de tanto pensar em outras possibilidades.

A minha amiga e companheira de laboratório, Kaynara. Ela merece um parágrafo inteiro dedicado a ela. Foram quase dois anos de cumplicidade, ajuda, amizade, companheirismo, crises de risos (outras de choro também!), fotos, segredos e experimentos feitos harmoniosamente, em equipe. Sempre unidas. Obrigada por toda ajuda. Esse trabalho, também é seu.

A todos os professores que tive ao longo da vida acadêmica, em especial minha querida professora Rosângela Monteiro, por ser tão especial, dedicada e ensinar com tanto amor, que é impossível esquecê-la e não se inspirar.

Aos meus vícios (leia-se filmes de Star Wars, desenhos animados, livros de Dostoiévski, Garcia Márquez e Pablo Neruda que vivi assistindo e relendo nesses últimos dois anos) pelos momentos de descontração - me ajudando a não surtar.

Aos professores Doutor Rafael Ferreira Alfenas e Doutor Ingo Invernizen pela contribuição no trabalho com conhecimentos divididos sobre filogenia e restauração florestal.

A CAPES e CNPQ pelo apoio financeiro e a Embrapa Agrossilvopastoril, pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

"Tamanho nada significa. Olhe para mim. Pelo meu tamanho você me julga?"

Mestre Yoda, 66 cm, Grande Mestre da Ordem Jedi (Star Wars)

“O papel dos infinitamente pequenos é infinitamente grande”.

(Louis Pasteur -1822- 1895)

RESUMO

Técnicas que minimizem o impacto decorrente do uso e manejo do solo vêm sendo estudadas e aplicadas para minimizar esses efeitos. Um instrumento para reverter a degradação ambiental, é a restauração florestal. Este estudo foi realizado em uma área anteriormente utilizada para práticas agrícolas, agora submetida a diferentes estratégias de restauração florestal. O objetivo foi quantificar as bactérias cultivadas presentes no solo sob diferentes tratamentos de restauração e em área de remanescente florestal e avaliar o potencial de antagonismo contra fungos fitopatógenos: *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani*. Não houve diferença significativa ($p > 0.05$) entre os tratamentos, quando avaliados no seu respectivo ano de coleta. Quando comparados os tratamentos iguais entre um ano e outro, houve diferença significativa entre os tratamentos T1, T2, T3, T6 e T8. Não houve diferença significativa em nenhum dos anos quando comparados os tratamentos com a área de remanescente florestal. Os isolados antagonistas aos fitopatógenos, foram classificados como pertencentes ao Filo Firmicutes e Proteobacteria. Os isolados identificados são constituídos por bactérias do gênero *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Burkholderia*, *Paenibacillus* e *Variovorax*. Esse é o primeiro relato de quantificação e bioprospecção de bactérias em diferentes tratamentos de restauração florestal no ecotono Cerrado/Amazônia e servirá como base para estudos do potencial biotecnológico desses microrganismos. Esses resultados poderão auxiliar nas decisões sobre estratégias de restauração florestal nessa região.

ABSTRACT

Techniques which minimize the impact resulting from use and handling of the soil have been studied and applied to minimize these effects. An instrument to revert the environmental degradation, is forest restoration. This study was made in an area previously used to agricultural practices, now submitted to different strategies of forest restoration. The object was quantify the cultured bacterias present in soil under different treatments of restoration and in area of remaining forest and evaluate potential of antagonism against phytopathogenic fungi: *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani*. There was no significant difference among treatments, when evaluated in its respective year of collect. When compared the equal treatments between a year and another, there was significant difference among treatments T1,T2,T3,T6 e T8. There was no significant difference in any year when compared treatments with the area of remaining forest. The isolates antagonists to phytopathogens, were classified as belonging to Filo Firmicutes and Proteobacteria. The indentified isolates are formed by bacteria of genus *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Burkholderia*, *Paenibacillus* e *Variovorax*. This is the first quantification report and bioprospecting of bacteria in different treatments of forest restoration in ecotone Cerrado/Amazon and serve as a basis for potential biotechnological studies of these microorganisms. These results may help in deciding which forest restoration strategies in this region.

SUMÁRIO

Introdução.....	13
Material e métodos	14
Descrição da área experimental.....	14
Descrição do experimento e delineamento experimental.....	14
Coleta e amostragem de solo.....	17
Isolamento e quantificação de bactérias.....	18
Teste de antagonismo.....	18
Amplificação e sequenciamento da região 16S rDNA.....	19
Identificação dos isolados.....	19
Resultados.....	20
Unidades Formadoras de Colônias de Bactérias.....	20
Antagonismo.....	21
Identificação dos isolados antagonistas.....	22
Discussão.....	28
Agradecimentos.....	33
Referências.....	33
ANEXO A – Normas do Periódico World Journal of Microbiology and Biotechnology	39

Introdução

Técnicas que minimizem o impacto decorrente do uso e manejo do solo vêm sendo estudadas e aplicadas para minimizar os efeitos da degradação ambiental, pois ela altera a produtividade biológica e afeta a sustentabilidade (Nunes et al. 2012).

Um dos instrumentos usados para reverter a degradação ambiental é a restauração florestal, que pode ser definida como o processo de favorecer a recuperação de um determinado ecossistema que foi degradado, danificado ou destruído (Engel e Parrota 2003). A restauração florestal vem sendo considerada como um processo de aceleração do restabelecimento de comunidades por meio de ações que sustentem a sucessão florestal (Kageyama e Gandara 2003). No entanto, não é consenso na comunidade científica qual o melhor modelo a ser empregado para tal finalidade (Durigan et al. 2010).

O estabelecimento de plantas e o consequente aumento da cobertura vegetal pode favorecer melhorias nas propriedades químicas, físicas e microbiológicas do solo (Veloso et al. 2010; Nunes et al. 2012; Araújo et al. 2013).

Os microrganismos estão intimamente associados aos processos ecológicos do ambiente, recuperando formas de energia e nutrientes (Souza et al. 2013). Assim, apresentam grande potencial para serem utilizados como indicadores da qualidade do solo durante o processo de restauração florestal, além do potencial de uso de suas características benéficas de forma a favorecer o estabelecimento e permanência da vegetação implantada. De acordo com DeGroot et al. (2005), para que projetos de restauração sejam eficientes devem estar associados a regeneração da comunidade microbiana.

A diversidade e abundância microbiana se relaciona com os padrões de uso do solo e sua composição se altera em resposta a essa intervenção e seleção no ambiente (Chau et al. 2011). Com o ambiente em processo de recuperação, os microrganismos também podem ser condicionados pelo modelo de restauração empregado, estimulando a competição por novos nichos (Ollivier et al. 2011; Van der Putten 2012).

Áreas de restauração podem ser excelentes pontos de bioprospecção de bactérias com potencial antagônico para uso em biocontrole. O uso dessas bactérias como controladores biológicos, pode ser uma alternativa ao uso de agroquímicos na agricultura, além de direcionar o uso de estratégias de restauração florestal que favoreçam o estabelecimento desses antagonistas no ambiente (Silva et al. 2013).

A identificação desses microrganismos através de ferramentas moleculares, como o sequenciamento da região 16s rDNA, também pode colaborar no entendimento da funcionalidade e na qualidade do solo, auxiliando no processo de restauração florestal de áreas degradadas.

Nesse sentido, os objetivos do presente trabalho foram: *i*: quantificar as bactérias presentes em solos sob diferentes estratégias de restauração florestal e em mata nativa; *ii*: avaliar o potencial antagônico de bactérias isoladas nessas estratégias de restauração florestal e em mata nativa contra dois fungos fitopatogênicos: *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani*; *iii*: identificar os isolados com potencial antagônico através da região 16 sDNA.

Material e métodos

Descrição da área experimental

O experimento avaliado está situado no campo experimental da Embrapa Agrossilvipastoril localizado no município de Sinop, estado de Mato Grosso, Brasil, sob as coordenadas 11°86'S, 55°60'W, em uma região considerada como uma área de transição entre os biomas Cerrado e Amazônia (Araújo et al. 2009).

De acordo com Köppen, o clima da região é classificado como AW, tropical com inverno seco, estações de chuvas e secas bem definidas. A temperatura média anual do ar é de 25°C, variando de 18°C à 32,5°C. A umidade relativa média anual é de 82,5%, com precipitação média de 2.550 mm, tendo maior intensidade entre os meses de dezembro e março (Inmet 2014).

O solo predominante na área experimental é o latossolo vermelho amarelo argiloso, com relevo plano e altitude de 380 m (Sema – MT 2014). As características químicas e físicas do solo foram determinadas antes da instalação do experimento. O pH em água foi de 5,8; P 17,7 mg dm⁻³; K (Mehlich-1) 61,1 mg dm⁻³; Ca 3,2 cmol_c dm⁻³; Mg 2,4 cmol_c dm⁻³; Al 0,0; teor de matéria orgânica 29,5 g kg⁻¹; areia 351,0 g kg⁻¹; silte 114,5 g kg⁻¹ e argila 534,5 g kg⁻¹.

Descrição do experimento e delineamento experimental

Instalado em dezembro de 2012, para o experimento de restauração florestal foram escolhidas espécies nativas regionais e uma exótica, de forma a contemplar diferentes funcionalidades ecológicas e econômicas (madeireiras e não-madeireiras): híbrido de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* – clone I144 (exótica), *Anacardium occidentale*,

Bellucia grossularioides, *Bertholletia excelsa*, *Buchenavia tetraphylla*, *Calophyllum brasiliense*, *Cecropia* sp., *Cordia glabrata*, *Enterolobium schomburgkii*, *Euterpe oleracea*, *Dipteryx odorata*, *Genipa americana*, *Hevea brasiliensis*, *Hymenaea courbaril*, *Mezilaurus itauba*, *Tabebuia serratifolia* e *Trattinickia rhoifolia*. Além das espécies nativas, em alguns tratamentos (Tabela 1) foram semeados adubos verdes, todos leguminosas (Fabaceae - duas variedades de *Cajanus cajan* – herbáceo (IAPAR 43) e arbustivo (BRS Mandarin), *Vigna unguiculata* e *Crotalaria spectabilis*). As espécies foram arranjadas em campo de acordo com os 10 tratamentos descritos na Tabela 1.

Toda a área experimental da Embrapa era previamente coberta por floresta até o ano de 1984, quando começou a ser gradativamente utilizada para fins agrícolas (Diel, 2014). Após um período de pousio de aproximadamente dois anos (2010-2012), quando ficou coberta por densa camada de gramíneas, a área do experimento de restauração florestal passou por dessecação em área total com aplicação de glifosato (3,5 L/ha) (ago./2012).

O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, com quatro repetições, totalizando 40 parcelas. Cada parcela tem 4.800 m² (0,48 ha), sendo que os tratamentos T4-T5, T6-T7 e T8-T9 foram originados a partir de subdivisão de parcela maior, de 0,48ha, ficando com 0,24ha (30m x 80m). Considerando as quatro repetições a área experimental total é de 134.400 m² (13,44 ha). Todas as repetições encontram-se contíguas a um fragmento florestal secundário presente dentro do campo experimental, compondo uma área total de 7,3 km de extensão a partir da mata ciliar do rio Teles Pires com largura média de 200 m. Essa área de remanescente florestal foi considerada como referência.

Tabela 1 Descrição dos tratamentos implantados no experimento de restauração florestal

Descrição		Detalhes de preparo e implantação	Tamanho da parcela
T1	Plantio de mudas de eucalipto em consórcio com 15 espécies nativas de diferentes grupos funcionais	Sulcagem a 60cm de profundidade nas linhas de plantio, seguida de aplicação de herbicida pós-emergente em área total. O espaçamento das mudas foi de 4m de entrelinhas por 3m na linha, totalizando 20 linhas de plantio – 400 mudas. Em fev./13 foi semeado <i>C. cajan</i> arbustivo entre todas as mudas, mas em fev. 14 os indivíduos foram derrubados e depositados nas linhas de plantio.	0,48ha (60m x 80m)
T2	Idem T1, substituindo eucalipto por arranjo de seringueira (<i>Hevea brasiliensis</i>) com açaí (<i>Euterpe oleracea</i>)	Idem T1, exceto espaçamento de seringueiras, que foi de 4m na linha.	0,48ha (60m x 80m)
T3	Plantio consorciado de mudas de 15 espécies nativas de diferentes grupos funcionais	Preparo idêntico ao T1, mas somente mudas nativas.	0,48ha (60m x 80m)
T4	Semeadura direta a lanço com mistura de sementes de 15 espécies nativas de diferentes grupos funcionais e adubos verdes	Um mês antes da implantação da semeadura foi realizada gradagem em toda a área da parcela, atingindo cerca de 20cm de profundidade, repetida no dia da implantação. As sementes (cerca de 10Kg) foram distribuídas manualmente na parcela, da forma mais homogênea possível. Imediatamente após semeadura foi realizada gradagem leve para incorporação das sementes.	0,24ha (30m x 80m)*
T5	Semeadura direta a lanço com mistura de sementes de 15 espécies nativas de diferentes grupos funcionais e adubos verdes, com plantio de mudas de eucalipto	Idem T4, mas em janeiro de 2013 foram plantadas mudas de eucaliptos em quatro renques duplos, em espaçamento idêntico ao T1. Essas mudas, porém, foram consumidas por formigas nos três meses seguintes à implantação, não tendo sido repostas.	0,24ha (30m x 80m)*
T6	Semeadura direta em linha de 15 espécies nativas de diferentes grupos funcionais	Um mês antes da implantação da semeadura foi realizada gradagem em toda a área da parcela, atingindo cerca de 20cm de profundidade, repetida no dia da implantação. No dia da implantação, os 10Kg de sementes foram misturadas a cerca de 35Kg de areia para homogeneização, após o que foram semeadas de forma mecanizada através de plantadora de quatro linhas. Não houve gradagem posterior para incorporação das sementes.	0,24ha (30m x 80m)*
T7	Semeadura direta em linha de 15 espécies nativas de diferentes grupos funcionais, com plantio de mudas de eucalipto.	Idem T6, com o acréscimo de mudas de eucalipto em janeiro de 2013, todas também predadas por formigas nos três meses subsequentes.	0,24ha (30m x 80m)*
T8	Condução passiva de regeneração natural	Após a aplicação de glifosato em ago./2012, não foi mais realizada nenhuma intervenção nesse tratamento. Nas datas das coletas do presente trabalho, as parcelas encontravam-se cobertas com elevada densidade de gramíneas exóticas.	0,24ha (30m x 80m)*
T9	Condução ativa de regeneração natural com aplicação de herbicida.	Idem T8. Até a data das coletas para o presente trabalho não tinha sido realizada nenhuma aplicação de herbicida para controle de mato-competição.	0,24ha (30m x 80m)*
T10	Idem T3, mas sem exploração econômica futura (testemunha de manejo)	Preparo idêntico ao T1, mas somente mudas nativas.	0,48ha (60m x 80m)

* os tratamentos T4-T5, T6-T7 e T8-T9 foram originados a partir de subdivisão de parcela maior, de 0,48ha

Após a instalação dos tratamentos não houve nenhuma aplicação de herbicidas, tendo sido desde então realizadas roçadas mecanizadas e manuais para controle de mato-competição.

Coleta e amostragem de solo

Foram realizadas duas coletas de solo em dois anos, nos meses de abril de 2013 e abril de 2014, durante a estação chuvosa. Considerando a média dos meses chuvosos na região (outubro a abril), para a coleta realizada em 2013, a precipitação média foi de 254,26 mm, com acumulado dos meses de 1784,13 mm, a temperatura média do ar foi de 25,43 e umidade relativa do ar de 84,65 (Estação Meteorológica Automática do Campus Universitário da Universidade Federal do Mato Grosso, Sinop (latitude -11,98°, longitude -55,56°, altitude 371m).

Para a coleta de 2014, considerando a média dos meses chuvosos (outubro a abril), a precipitação média foi de 293,14 mm, com acumulado dos meses de 2051,98 mm, temperatura média do ar de 25,03°C e umidade relativa do ar de 84,83% (Estação Meteorológica Automática do Campus Universitário da Universidade Federal do Mato Grosso, Sinop (latitude -11,98°, longitude -55,56°, altitude 371m).

O solo foi coletado na profundidade de 0-10 cm, com auxílio de um trado holandês, esterilizado com álcool 70 % entre cada parcela, nos locais submetidos à restauração florestal e na área de remanescente florestal. Para cada tratamento foi formado uma amostra composta, a partir de 20 subamostras, coletadas em pontos, em ziguezague. A coleta realizada na área de remanescente florestal foi realizada em quatro pontos, formando em cada ponto, uma amostra composta, a partir de 20 subamostras. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos, à temperatura de 4°C, e transportadas até o laboratório de Microbiologia de Solos da Embrapa Agrossilvipastoril. O solo foi homogeneizado, passado por uma peneira de malha 4 mm, e armazenado à temperatura de 4 °C até o momento da realização das análises de laboratório. O peso seco de cada amostra foi determinado a partir de 10 gramas de solo submetido por 24 horas em estufa, à 105 °C.

Isolamento e quantificação de bactérias

Para isolamento das bactérias, as amostras de solo foram pesadas (10 g) e diluídas em 90 mL de tampão fosfato esterilizado (PBS, contendo [g.L⁻¹] 1,44 Na₂HPO₄; 0,24 KH₂PO₄; 0,20 KCl; 8,00 NaCl; pH 7,4), e incubadas sob agitação (150 r.p.m.) por uma 1 h. Uma alíquota de 100µL das diluições 10⁻³, 10⁻⁴ e 10⁻⁵, foram dispostas sobre meio de cultura TSA (Tryptona Soja Ágar) 10%, em triplicata para cada diluição. As culturas foram incubadas em BOD à 28 °C por 96 horas. Posteriormente, as unidades formadoras de colônia (UFCs) foram quantificadas sob lupa, para estimar a médias das respectivas densidades populacionais.

Foi realizada uma seleção baseada nas características morfocromáticas de representantes da diversidade bacteriana das amostras de solo coletadas em 2013. Esses isolados foram purificados por meio de estrias de esgotamento, em seguida crescidos em TSA 10% líquido por 72 horas e em seguida, acrescidas de glicerol 20%, e armazenadas em ultra freezer à -80 °C.

A normalidade dos dados foi aferida pelos testes de Lilliefors e Kolmogorov-Smirnov e a homocedasticidade pelos testes de Cochran e Bartlett. Para a análise estatística dos dados de UFCs, as variáveis que não atenderam aos pressupostos para a realização da análise de variância (normalidade e homogeneidade) foram transformadas em logaritmo decimal e expressas em log UFC.g⁻¹ de solo seco. Atendidos os pressupostos, os dados foram submetidos à análise de variância, no software *Assistat* 7.7 Beta (Silva e Azevedo 2009). As médias dos tratamentos foram comparadas com as médias da área de referência – remanescente florestal, pelo teste *t* student ($p < 0.05$) por meio do software Excel.

Teste de antagonismo

Foram selecionados através das características morfocromáticas 220 isolados bacterianos, obtidos das amostras de solo coletadas em 2013 para o teste da ação antagônica à fitopatógenos. Os fungos fitopatogênicos utilizados foram *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani* oriundos da coleção do Laboratório de Microbiologia da Embrapa Agrossilvipastoril. Para testar o potencial de biocontrole, as avaliações foram realizadas utilizando o método de cultura pareada, que consiste no confronto direto, em meio sólido do antagonista (microrganismo do solo) e do fitopatógeno, conforme descrito por Mariano 1993. Para o ensaio *in vitro*, foram inoculados em lados opostos da placa de petri contendo meio de cultura Dextrose Batata Ágar, o patógeno e o isolado a ser avaliado. As culturas foram mantidas à temperatura de 28° C e avaliadas diariamente. Para o controle, foram avaliadas placas contendo um disco

de micélio do fitopatógeno, com a observação do seu crescimento. Todas as análises foram realizadas em duplicata. Após o cultivo, foi avaliada a presença ou ausência de zonas de inibição entre as culturas pareadas, com a medição do halo de inibição.

Amplificação e sequenciamento da região 16S rDNA

A amplificação dos genes 16S rDNA, foi realizada por PCR direto de colônias sem extração de DNA (Ferreira et al. 2008). Para isso, as bactérias antagônicas a pelo menos um dos patógenos testados foram crescidas em meio de cultura TSA 10% sólido e transferidas para um tubo contendo 200 µl de água deionizada ultra-pura esterilizada. Foi utilizado 1 µl dessa suspensão bacteriana como fonte de DNA para realização da PCR. Os iniciadores utilizados foram o PO27F (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3') e 1387r (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGAACG-3'). O volume final das reações foi de 50 µl, contendo 1 µl da suspensão bacteriana, 5 µL de tampão 10x com MgCl₂ (Sigma), 0,2 mM dos desoxirribonucleotídeos trifosfato, 2,5 U de Taq DNA polimerase (Sigma) e 200 mM de cada primer (iniciador) descrito acima. Um controle negativo (reação de PCR sem suspensão bacteriana) foi incluído em todas as reações de amplificação. A PCR foi realizada em termociclador BioRad T100 (Thermo Scientific), programado para realizar uma desnaturação inicial a 94 °C por 4 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, 62,5 °C por 1 min e 72 °C por 1 min e uma extensão final de 72 °C por 7 min. A amplificação foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1,5 % (p/v), corado com GelRed™ 20 x, submetido a eletroforese 70 V por 40 min, e o fragmento de tamanho esperado (1400 pb) observado sobre luz ultravioleta e fotodocumentado (Loccus Biotecnologia).

Os produtos de PCR de bactérias foram purificados, adicionando 850 µl de isopropanol 100 % e submetidos a centrifugação por 15 minutos a 9000 xg. O sobrenadante foi descartado e adicionado 200 µl de etanol 70 %. O tubo foi incubado por 1 minuto à temperatura ambiente. Após, foi centrifugado por 5 minutos e o sobrenadante descartado. Os tubos foram colocados em banho seco para evaporação à 35°C. O produto final foi ressuspensionado em 20 µl de água ultra-pura autoclavada e incubado na geladeira por 1/2 período (Ferreira et al. 2008).

Identificação dos isolados

Os produtos de PCR de bactérias purificados, foram enviados ao Setor de Sequenciamento de DNA do Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo para serem parcialmente sequenciados utilizando o iniciador "reverse", para identificação das espécies bacterianas. As sequências obtidas foram extraídas pelo programa BioEdit (Hall

1999) e avaliadas para avaliação das bases com baixa qualidade e comparadas por BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul et al., 1990) contra a base de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology information website*).

As sequências obtidas foram comparadas com as já existentes no *GenBank*. As sequências do *GenBank* que apresentaram maior similaridade, foram selecionadas e alinhadas juntamente com as sequências obtidas no sequenciamento. O alinhamento foi realizado pelo algoritmo ClustalW e corrigido manualmente quando necessário. A análise filogenética foi gerada pelo método Neighbor-Joining com valores de bootstrap de 1000 repetições, usando o modelo de substituição Kimura 2 utilizando o programa MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013).

Resultados

Unidades Formadoras de Colônias de Bactérias

O número de unidades formadoras de colônia variou de $6,66 \times 10^8$ à $1,49 \times 10^8$ UFC.g⁻¹ de solo seco no ano de 2013 e de $1,39 \times 10^8$ à $3,45 \times 10^8$ UFC.g⁻¹ de solo seco no ano de 2014. Não houve diferença significativa ($p > 0.05$) entre os tratamentos, quando avaliados entre si, no seu respectivo ano de coleta.

No ano de 2013 quando comparados os tratamentos iguais entre um ano e outro, através do teste *t* student, houve diferença significativa ($p < 0.05$) entre os tratamentos T1 ($p < 0,0143$), T2 ($p < 0,0286$), T3 ($p < 0,0143$), T6 ($p < 0,0286$) e T8 ($p < 0,0143$). Os demais tratamentos não apresentaram diferença significativa entre os anos. Não houve diferença significativa em nenhum dos anos quando comparados os tratamentos com a área de referência (remanescente florestal (Tabela 2).

Tabela 2 Comparação do número de unidades formadoras de colônia de bactérias (log UFC.g⁻¹ de solo) através do teste *t* entre tratamentos nos anos de 2013 e 2014 e entre a área de referência

Tratamento	Média UFC (Log N)		2013vs 2014 Valor <i>p</i>	Tratamento 2013 vs Remanescente Florestal 2013	Tratamento 2013 vs Remanescente Florestal 2013
	2013	2014		Valor <i>p</i>	Valor <i>p</i>
T1	7,908	8,381	0,0143*	0,3429	0,5000
T2	7,846	8,538	0,0286*	0,4429	0,2429
T3	7,869	8,493	0,0143*	0,1714	0,4429
T4	8,173	8,341	0,3429	0,2000	0,4429
T5	8,171	8,310	0,2429	0,3429	0,4429
T6	8,016	8,454	0,0286*	0,3429	0,4429
T7	8,157	8,352	0,1714	0,2429	0,4429
T8	7,824	8,487	0,0143*	0,2429	0,3429
T9	8,143	8,144	0,8857	0,1714	0,1714
T10	7,838	8,257	0,1000	0,1714	0,5000
Remanescente Florestal	8,018	8,305	0,1000	-	-

*diferença significativa ($p < 0.05$) pelo teste *t* student

Antagonismo

Do total de 220 isolados testados contra *Rhizoctonia solani*. e *Fusarium oxysporum* (ver Figuras 1 e 2), 9 %, apresentaram potencial antagônico, com a formação de halo de inibição sugerindo a produção de compostos que interferem no desenvolvimento *in vitro* do fitopatógeno, sendo que destes, 6,4 % foram positivos para ambos os fungos e 1,3 %, positivos apenas para um ou outro patógeno avaliado.

Ao analisar os resultados de antagonismo, foi observado que todos os tratamentos apresentaram pelo menos um isolado com capacidade de inibir o crescimento dos patógenos. A área de referência (remanescente florestal), não apresentou nenhum isolado positivo para o teste de antagonismo.

Na avaliação contra *Fusarium oxysporum*, dos 10 tratamentos avaliados, apenas o tratamento T1 não apresentou isolados positivos (0 %). Os tratamentos T4, T7 e T10, apresentaram 5 % de isolados positivos. Os tratamentos T2, T3, T5 e T9 apresentaram 10 % de isolados com potencial de biocontrole. Os tratamentos T6 e T8 apresentaram os melhores resultados (15 %).

Na avaliação contra *Rhizoctonia solani* todos os tratamentos apresentaram isolados positivos para o teste de antagonismo. O tratamento T5 apresentou o maior número de isolados com potencial antagônico (15 %), seguido dos tratamentos T2, T3, T6, T8 e T9, ambos com 10 % de isolados positivos para o teste *in vitro*. Os tratamentos T1, T4, T7 e T10, apresentaram os menores valores observados (5 %).

Identificação dos isolados antagonistas

Os isolados antagonistas aos fitopatógenos foram identificados e classificados taxonomicamente (Tabela 3) como pertencentes ao Filo Firmicutes (85 %) e Proteobacteria (15 %). Todos os tratamentos avaliados apresentam pelo menos uma espécie pertencente ao Filo Firmicutes.

Os isolados identificados são constituídos por bactérias do gênero *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Burkholderia*, *Paenibacillus* e *Variovorax*, sendo do gênero *Bacillus*, o maior número de isolados identificados (65 %).

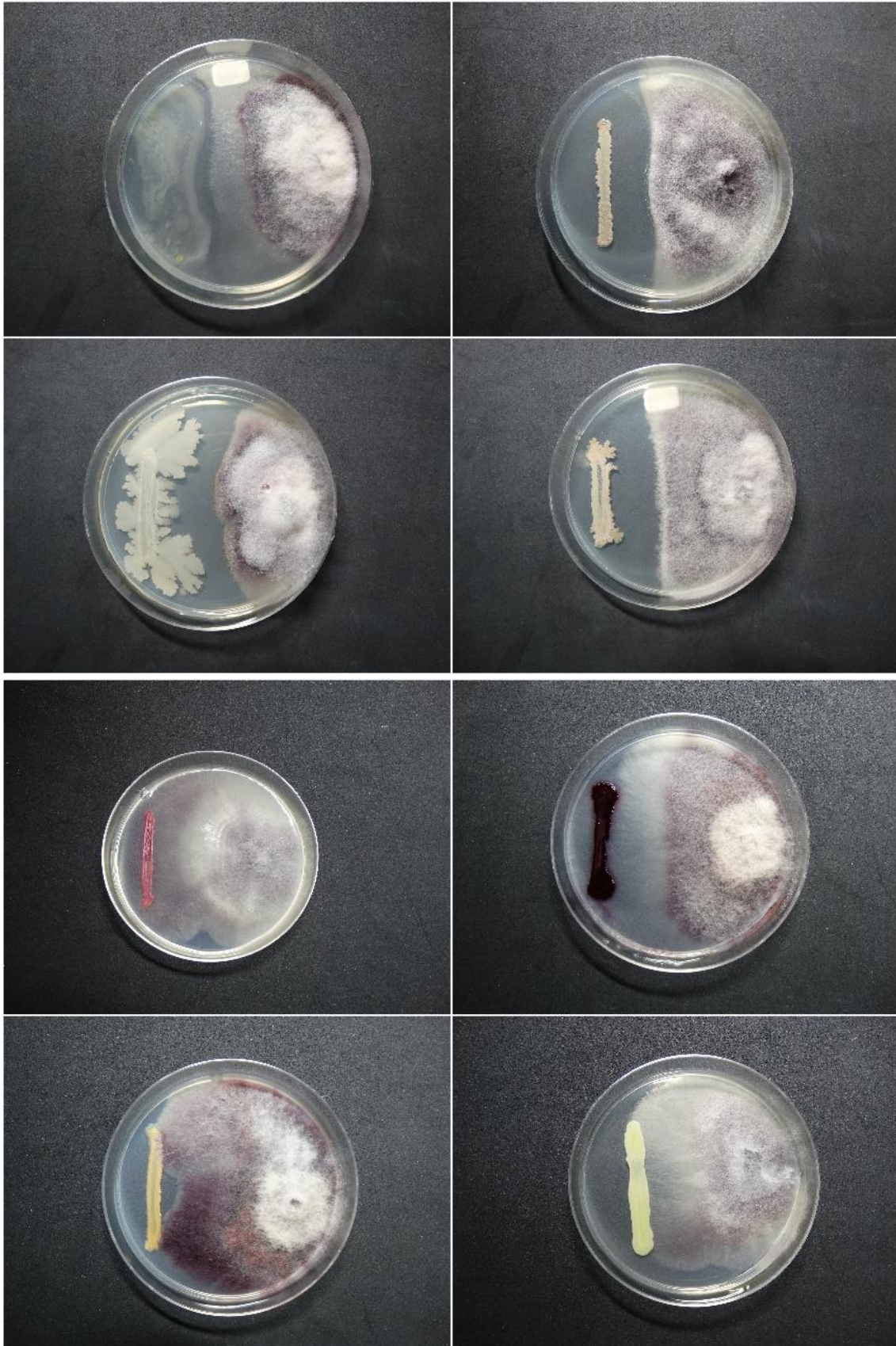


Fig 1 Avaliação de controle biológico contra *Fusarium oxysporum* pelo método de cultura pareada. Do lado esquerdo estão os isolados bacterianos e do lado direito o fungo fitopatogênico. Bactérias identificadas: a: *Variovorax paradoxus* b: *Bacillus subtilis* c: *Bacillus subtilis* d: *Bacillus tequilensis* e, f, g, h: isolados negativos sem identificação molecular



Fig 2 Avaliação de controle biológico contra *Rhizoctonia solani* pelo método de cultura pareada. Do lado esquerdo estão os isolados bacterianos e do lado direito o fungo fitopatogênico. Bactérias identificadas: a: *Burkholderia ambifaria* b: *Bacillus subtilis* c: *Bacillus subtilis* d: *Bacillus amyloliquefaciens* e, f, g, h: isolados negativos sem identificação molecular

Tabela 3 Identificação de bactérias do solo com potencial antagonista. A identificação molecular das espécies foi realizada por sequenciamento parcial do 16S rDNA e análises de comparação no Blastn (*National Center for Biotechnology information website*)

Tratamento	Isolado	Filo	Espécie (Blast-NCBI)	%*	Referência no GenBank
T5	72.30	Proteobacteria	<i>Burkholderia ambifaria</i>	99%	KM191298.1
T9	74.50	Proteobacteria	<i>Variovorax paradoxus</i>	99%	KC128901.1
T9	74.57	Proteobacteria	<i>Burkholderia ambifaria</i>	99%	KM191298.1
T6	71.18	Firmicutes	<i>Bacillus tequilensis</i>	95%	KF599048.1
T6	71.22	Firmicutes	<i>Brevibacillus agri</i>	97%	KF600766.1
T5	72.31	Firmicutes	<i>Paenibacillus brasiliensis</i>	96%	NR025106.1
T9	74.55	Firmicutes	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	98%	EU304922.1
T8	75.66	Firmicutes	<i>Bacillus subtilis</i>	95%	KF499101.1
T8	75.69	Firmicutes	<i>Brevibacillus formosus</i>	98%	KF600766.1
T3	80.126	Firmicutes	<i>Bacillus subtilis</i>	96%	JQ832938.1
T4	84.177	Firmicutes	<i>Bacillus subtilis</i>	90%	GU392046.1
T10	76.83	Firmicutes	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	98%	EU304922.1
T5	85.188	Firmicutes	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	98%	KM269197.1
T8	86.204	Firmicutes	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	98%	EU304922.1
T1	89.233	Firmicutes	<i>Paenibacillus</i> sp	94%	JX566619.1
T6	71.20	Firmicutes	<i>Bacillus subtilis</i>	93%	CP009748.1
T2	98.338	Firmicutes	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	HQ234330.1
T7	109.476	Firmicutes	<i>Bacillus subtilis</i>	93%	KJ124577.1
T3	80.130	Firmicutes	<i>Bacillus subtilis</i>	96%	KJ124577.1
T2	79.117	Firmicutes	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	97%	KM269197.1

*Similaridade com linhagem de referência

As espécies *Brevibacillus agri*, *Variovorax paradoxus* e *Brevibacillus formosus* foram positivas apenas para *Fusarium oxysporum*. Já os isolados identificados como *Burkholderia ambifaria* e *Paennibacillus* sp, foram positivos apenas para *Rhizoctonia solani*, sendo que destes, dois isolados foram identificados como pertencentes a espécie *Burkholderia ambifaria*.

As espécies identificadas como *Bacillus tequilensis*, *Paenibacillus brasiliensis*, *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus subtilis*, foram positivas para ambos fitopatógenos na avaliação *in vitro*.

Através dos halos de inibição obtidos nos testes de antagonismo, foi realizada uma média onde os tamanhos variaram de 3,08 mm (*Variovorax paradoxus*) à 13,42 mm (*Brevibacillus agri*) para *F. oxysporum* e de 3,80 mm a 10,96 mm, ambos *Bacillus subtilis*, na avaliação contra *Rhizoctonia solani* (Tabela 4).

Tabela 4 Média de tamanho dos halos de inibição dos isolados avaliados

Isolado	Espécie	Média Halo (mm)	Média Halo (mm)
		<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
71/18	<i>Bacillus tequilensis</i>	11,99	6,62
71/22	<i>Brevibacillus agri</i>	13,42	0,00
72/31	<i>Paenibacillus brasiliensis</i>	4,24	5,48
74/50	<i>Variovorax paradoxus</i>	3,08	0,00
74/55	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	6,54	5,65
75/66	<i>Bacillus subtilis</i>	7,915	6,25
75/69	<i>Brevibacillus formosus</i>	8,15	0,00
80/126	<i>Bacillus subtilis</i>	10,09	10,96
84/177	<i>Bacillus subtilis</i>	11,23	3,80
76/83	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	12,38	5,83
85/188	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	11,42	4,78
86/204	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	7,57	4,5
71/20	<i>Bacillus subtilis</i>	10,01	7,52
98/338	<i>Bacillus subtilis</i>	9,74	3,96
109/476	<i>Bacillus subtilis</i>	12,45	4,86
80/130	<i>Bacillus subtilis</i>	7,70	4,875
79/117	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	9,85	4,49
72/30	<i>Burkholderia ambifaria</i>	0,00	8,49
89/233	<i>Paenibacillus</i> sp	0,00	5,11
74/57	<i>Burkholderia ambifaria</i>	0,00	5,63

Foi gerada uma árvore filogenética, a partir do sequenciamento do gene 16S rDNA, que mostrou a existência de dois grupos, que separam os isolados como pertencentes aos Filos Firmicutes e Filo Proteobacteria (Fig.1). Sequências de referência do GenBank, foram utilizadas para comparação entre os isolados identificados taxonomicamente.



Fig. 1 Árvore filogenética construída pelo método de Neighbor-Joining com as sequências do 16s rDNA. As sequências foram obtidas dos isolados bacterianos positivos para o antagonismo, descritas na árvore, através do número da amostra. Como grupo externo, foi utilizada a bactéria *Streptomyces* sp

Discussão

Os valores médios de UFCs, encontrados no estudo revelaram a densidade das bactérias cultiváveis na ordem de 10^8 e 10^9 UFC por grama de solo, valores de acordo com a literatura (Araujo et al. 1994). A abundância microbiana no solo é afetada por um conjunto de fatores físicos e químicos entre eles, pH, estação, clima, textura do solo, disponibilidade de nutrientes, matéria orgânica e temperatura do solo (Pasternak et al. 2013).

Nesse estudo, a avaliação ocorreu no período chuvoso, onde a umidade média relativa do ar (84,65% - 2013 e 84,83% - 2014) e a temperatura média do ar (25,43°C - 2013 e 25,03°C - 2014) não variaram de um ano para o outro. Entretanto, a precipitação foi maior em 2014, quando apresentou o somatório de 2051,98 mm contra 1784,13 mm acumulados no ano de 2013. A umidade do ar e precipitação são fatores que influenciam os microrganismos do solo (Pereira et al. 1999).

O aumento da precipitação influencia no teor de água e consequentemente, na sua umidade, que é de extrema relevância para o crescimento microbiano, pois a umidade reduzida limita a difusão de substratos solúveis aos microrganismos, podendo provocar a redução da mobilidade microbiana. Além disso, solos úmidos estão menos sujeitos a variações diurnas que podem influenciar na atividade e crescimento dos microrganismos (Voroney, 2007).

Os tratamentos T1, T2, T3, T6 e T8 tiveram aumento da densidade populacional bacteriana do ano de 2013 para o ano de 2014. Associados ao fator precipitação, os tratamentos T1, T2 e T3, podem ter sido favorecidos com o efeito rizosférico com acúmulo de substratos orgânicos, de exsudatos, de secreções e de matéria orgânica, já que foram estabelecidos com uso de mudas (Eisenhauer et al. 2010; Araujo et al. 2013). Além disso, no ano de 2014 os arbustivos *C. Cajan* implantados em fevereiro de 2013 nesses tratamentos, foram derrubados e depositados nas linhas de plantio em fevereiro de 2014, aumentando assim, a cobertura vegetal nesses tratamentos.

Outro fator que deve ser considerado é que área experimental passou por um período de pousio de aproximadamente 2 anos, entre 2010 e 2012, quando ficou coberta por uma densa camada de gramíneas. As gramíneas apresentam sistema radicular profundo e abundante, favorecendo a agregação e estruturação do solo. Essa característica influencia diretamente na densidade da comunidade microbiana total do solo, em razão da elevada rizodeposição (Moreira e Siqueira 2006; Eisenhauer et al. 2010), o que poderia também explicar o teor de matéria orgânica em toda a área do experimento de $29,5 \text{ g kg}^{-1}$, considerando a região do estudo. Como a avaliação do teor de matéria orgânica foi antes da implantação do experimento, os níveis de

MO do solo também podem ter favorecido a densidade bacteriana na área, fato que associado aos fatores ambientais descritos anteriormente, podem justificar a ausência de diferença significativa entre os tratamentos quando comparados dentro dos anos, podendo considerar que a área ainda não havia sofrido tanto a influência dos tratamentos, e sim, dos fatores anteriores a sua implantação, já que as épocas de coletas foram próximas ao início da implantação do experimento.

O tratamento T6, estabelecido com sementes, também apresentou aumento no número de UFC entre os anos. Esse tratamento foi implantado em consórcio com adubos verdes, o que pode influenciar no aporte de resíduos vegetais e matéria orgânica. Além disso, houve a gradagem em toda a área da parcela desse tratamento, atingindo cerca de 20 cm de profundidade um mês antes da implantação do tratamento e no dia. A gradagem ocasiona o revolvimento do solo, dessa forma ocorre o rompimento dos agregados em partículas menores, expondo os microrganismos a um aumento de aeração, que estimula o processo de decomposição dos resíduos vegetais, que por sua vez, altera a densidade, atividade microbiana e a dinâmica de agregação (Pereira et al. 1999).

O tratamento T8, que é conduzido com a regeneração natural, também apresentou diferença significativa. Nessa área não houve nenhum tipo de intervenção, com exceção da deposição da matéria orgânica proveniente da vegetação já estabelecida na área. No período das coletas, a área encontrava-se coberta com uma elevada densidade de gramíneas exóticas.

Em agosto de 2012, a área do experimento passou por dessecação em área total através da aplicação de glifosato (3,5 L/ha). O glifosato, herbicida aplicado 4 meses antes da implantação do experimento, tem a meia-vida em solos brasileiros variando de 10 a 20 dias (Moreira e Siqueira 2006). Por ser rapidamente degradado e por ter baixa toxicidade, a aplicação do produto não interferiu na densidade bacteriana, considerando a época da coleta e sua aplicação.

Os resultados encontrados podem alterar ao longo dos anos, com o estabelecimento das árvores e a avaliação da densidade também no período de seca a fim de comparações, uma vez que a abundância e atividade dos microrganismos são muito suscetíveis às variações sazonais, principalmente temperatura e umidade (Zilli et al. 2003).

Diversos autores avaliando sistemas de restauração, demonstraram que a cobertura vegetal influencia na composição e atividade da comunidade microbiana do solo (Zak et al. 2003; Eisenhauer et al. 2010; Araújo et al. 2013). A cobertura vegetal fornece entrada de matéria orgânica que melhora a qualidade do solo e aumenta a densidade e diversidade de

bactérias (Habekost et al. 2008; Tipayno et al. 2012). De acordo com Potthoff et al. (2006), em áreas restauradas, a cobertura vegetal auxilia a recuperação da comunidade microbiana do solo.

No presente trabalho, os números de UFC observados na mata, não apresentaram diferença entre os anos e quando comparados com os tratamentos. Os valores encontrados de UFC nos tratamentos próximos aos encontrados na área de referência, podem ser em decorrência do aumento populacional de uma ou mais espécies nos tratamentos, possivelmente associado ao período de coleta.

Todavia, esse resultado não diz que os organismos cultiváveis obtidos através dos tratamentos se assemelhem a mata, pois em observações visuais dos morfotipos das colônias (dados não mostrados), foi possível constatar que havia uma diferença nos grupos dominantes isolados da mata, quando comparados com os tratamentos. A densidade populacional, avaliada através da UFC, demonstra a abundância dos microrganismos da área de estudo refletindo a flutuação microbiana a curto prazo, porém, sem apresentar sua diversidade. A diversidade revela o equilíbrio entre os diversos organismos e domínios funcionais do solo, situação encontrada em geral, em estudos que avaliaram área de mata (De Fede et al. 2001; Grayston et al. 2001; Zilli et al. 2003; Calegari et al. 2008; Selle 2007).

Foi possível prospectar bactérias com potencial antagonico a *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani*, dois fungos cosmopolita presentes comumente no solo, causadores de grandes prejuízos econômicos em culturas comerciais, entre elas, soja, milho e algodão, culturas amplamente cultivadas na região do estudo (IMEA, 2014)

Em todos os tratamentos avaliados, exceto na área de referência – remanescente florestal, foram encontrados isolados com potencial de biocontrole, tendo sido identificadas espécies pertencentes aos filos Firmicutes e Proteobacteria. Esse resultado pode estar relacionado ao pH do solo da área de restauração florestal de 5,8. Outros estudos indicaram que as bactérias produtoras de substâncias bioativas foram isoladas de amostras de solo que apresentavam pH com valores entre 5,50 – 6,11. Sendo que, as melhores condições de produção associadas à ação inibitória ocorreram na faixa de pH ótimo de 5,63 (Braz et al. 2014).

O filo Proteobacteria é extremamente diverso morfológico e metabolicamente, sendo o maior grupo de bactérias existentes. Seus representantes são comumente encontrados em solos cultivados, sendo de grande importância no ciclo global do nitrogênio e no ciclo do enxofre. O número reduzido de isolados pertencentes a esse filo identificados no trabalho, pode estar relacionado ao fato de que a maioria das espécies de Proteobacteria do solo não são cultivadas em meios de cultura (Thomas et al. 2008).

Em todos os tratamentos foram encontrados isolados pertencentes ao filo Firmicutes. Espécies desse filo tem capacidade elevada de crescimento quando as fontes nutricionais são abundantes. Neste grupo encontram-se os gêneros *Bacillus* que, em momentos de escassez, formam esporos possibilitando sua longa manutenção e sobrevivência em nichos ecológicos específicos, sendo resistentes a agressões exógenas (Campos e Silva et al. 2008; Hammami et al. 2009).

No estudo, o maior número de isolados positivos identificados, pertence ao gênero *Bacillus*. Bactérias desse gênero apresentam multiplicidade de mecanismos antagônicos (Campos e Silva 2008) e tem sido testada como agentes potenciais para biocontrole (Chanway et al. 2000; Chen et al. 2000; Ramamoorthy et al. 2001; Orhan et al. 2006). A presença desses isolados na área, auxilia na proteção das espécies implantadas no experimento, já que eles podem atuar de forma antagonista no solo.

A espécie *B. subtilis*, encontrada em grande número no trabalho, foi positiva para o antagonismo a ambos fitopatógenos avaliados, com a formação dos halos de inibição com média de 10,01 mm para o controle de *F. oxysporum* e 10,96 mm para *R. solani*. Essa espécie é capaz de produzir uma grande variedade de metabólitos antifúngicos e substâncias voláteis com atividade antifúngica que inibem o crescimento de uma gama de fitopatógenos (Lanna-Filho et al. 2010, Saha et al. 2012).

Outros estudos já demonstraram esse potencial (Tsavkelova et al. 2007; Karlidag et al. 2007; Senthilkumar et al. 2007; Assumpção et al. 2009; Akhtar et al. 2010). Essa espécie tem sido usada comercialmente para o biocontrole de doenças de plantas e no aumento da produtividade de culturas, por aumentar a fixação biológica de nitrogênio, a solubilização de nutrientes, síntese de fitormônios e melhoria das condições do solo (Manjula e Podle 2005; Araujo et al. 2012; Luo et al. 2012). Como a região do estudo se encontra em uma área de transição entre o Cerrado e a Amazônia, com o clima bem característico dessa região, isolar essas espécies nesse local e utilizá-las também para a promoção de crescimento de plantas, pode garantir o sucesso da tentativa, uma vez que são bactérias já submetidas as condições da região. *Bacillus subtilis* apresenta facilidade para manutenção de sua viabilidade em bioformulados, sendo seus bioprodutos comerciais indicados para diversas culturas, entre elas, algodão, soja e milho, culturas amplamente difundidas nessa região e no Brasil (Lanna-Filho et al. 2010).

Algumas bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus* e *Burkholderia*, são capazes de converter formas insolúveis de fósforo no solo, em formas acessíveis, sendo importantes na promoção do crescimento de plantas (Correa et al. 2004; Durães 2011). Espécies do gênero *Paenibacillus* sp. também contribuem para o desenvolvimento e crescimento vegetal,

através da fixação de N₂ (Han et al. 2005) além de atuarem como controladores biológicos de fitopatógenos (Souza 2011). A presença dessas bactérias na área avaliada, pode auxiliar no crescimento das espécies implantadas no experimento, além de melhorar a qualidade do solo.

A presença de isolados de *Bacillus amyloliquefaciens* nos tratamentos avaliados, pode ser vantajosa para o crescimento das plantas utilizadas na restauração, pela capacidade de solubilização de fósforo que essa espécie possui (Kim et al. 2004). Os halos de inibição dessa espécie chegaram até 12,38 mm para o controle de *F. oxysporum*, demonstrando um alto poder de inibição contra esse fitopatógeno, já para o controle de *R. solani* essa média foi de 5,83 mm.

No trabalho, foram identificadas espécies de *Burkholderia ambifaria* positivas para o antagonismo a *Rhizoctonia solani*, com a formação de média de halos de inibição de 8,49 mm. Essas bactérias são isoladas principalmente de solos, sendo que algumas espécies podem ser fixadoras de N₂. Outros estudos avaliaram o potencial antagônico dessa espécie como controlador biológico (Coenye et al. 2001; Chiarini et al. 2006; Chapalain et al. 2013), porém essas avaliações devem ser feitas com cautela, pela patogenicidade de algumas de suas espécies para humanos, pois ainda que raramente, essa bactéria pode ser isolada em pacientes imunocomprometidos, onde provoca infecções (Chiarini et al. 2006; Mahenthiralingam et al. 2008).

A espécie *Variovorax paradoxus*, foi observada como controladora de *Fusarium oxysporum*, apresentando a formação de um halo de inibição com média de 3,08 mm. Esse isolado não foi descrito na literatura consultada como antagonista aos fitopatógenos avaliados nesse estudo. Pesquisas envolvendo essa espécie descreveram características metabólicas que tornam a espécie promissora para biorremediação (Han et al 2011; Futamata et al, 2001). Na área da medicina, estudos envolvendo *V. paradoxus* estão sendo realizados para entender melhor a correlação entre a bactéria e a resistência ao HIV (Satola et al. 2012). Ainda é cedo para afirmar quais produtos serão originados a partir dos estudos dessa bactéria, porém o avanço de estudos genômicos que envolvam essa espécie, poderão fornecer informações detalhadas do seu metabolismo, auxiliando sua aplicação biotecnológica. A presença de isolados dessa espécie na área de estudo, demonstra o potencial da área para prospecção e avaliações aplicadas para a biotecnologia.

Encontrar isolados não-patogênicos com capacidade antagonista contra as doenças causadas por esses fitopatógenos, que estejam também associados ao aumento da produtividade, são de grande importância. Assim, os isolados encontrados nesse trabalho devem ser continuamente estudados, para testes e posterior desenvolvimento e comercialização de formulações que os empregue, de forma a torná-los viáveis para aplicação na agricultura.

Resultados de antagonismo obtidos *in vitro*, nem sempre são eficientes no campo. A eficácia oferece um indicativo, sendo um prognóstico de uma possível viabilidade no controle de fitopatógenos em condições naturais de sua ocorrência (Kupper et al. 2003). O teste em casa de vegetação, auxilia no direcionamento do limiar de população exigida para que o antagonismo seja também eficiente no campo. Assim, prospectar isolados com potencial antagônico oriundos de uma região altamente agrícola é favorecer o estudo de novas alternativas para o controle de doenças que atingem as culturas gerando prejuízos. Como os microrganismos já estão adaptados ao tipo de solo e condições climáticas da região, a possibilidade de sucesso durante sua aplicação não só para o controle biológico, mas também para favorecer a qualidade do solo, será maior.

Este é o primeiro estudo de bactérias na área do experimento de restauração florestal e servirá como base para estudos futuros que avaliem tanto a comunidade microbiana na área, quanto a presença de determinados microrganismos como indicadores de qualidade do solo e com potencial para biocontrole. Será possível avaliar a eficiência a longo prazo dos tratamentos implantados, a abundância e diversidade microbiana, refletindo o equilíbrio entre os diversos organismos e os domínios funcionais do solo (Zilli et al 2003; Six et al. 2004; Six et al. 2006).

Agradecimentos

A agencia financiadora Capes – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa de pós-graduação, à Embrapa Agrossilvipastoril e ao CNPQ pelo suporte e recursos disponibilizados para a execução do trabalho.

Referências

- Akhtar MS, Shakeel U, Siddiqui ZA (2010) Biocontrol of *Fusarium wilt* by *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas alcaligenes*, and *Rhizobium* sp. on lentil. Turkish Journal of Biology3: 1-7
- Altschul SF (1990) Basic local alignment search tool J Mol Biol 215 (3):403-10
- Araujo ASF, Cesarz S, Leite LFC, Borges CD, Tsai SM, Eisenhauer N (2013) Soil microbial properties and temporal stability in degraded and restored lands of Northeast Brazil. Soil Biol Biochem 66:175–181
- Araujo FF, Guabert LM, Silva IF (2012) Bioprospecção de rizobactérias promotoras de crescimento em *Brachiaria brizantha*. Revista Brasileira de Zootecnia 41(3):521-527
- Araujo RA, Costa RB, Felfili JM, Gonçalves IK, Melo e Souza RAT, Dorval A (2009) Florística e estrutura de fragmento florestal em área de transição na Amazônia Matogrossense no Município de Sinop. Acta Amazonica 39:865-878

- Araújo RS, Hungria M (1994) Microrganismos de importância agrícola EMBRAPA-CNPq, Brasília, pp 236
- Assumpção LC, Lacava PT, Dias ACF, Azevedo ACF, Azevedo JL, Menten JOM (2009) Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 44(5): 503-510
- Braz MR dos S, Rodrigues L, Silveira IA, Santos ECG dos (2014) Substâncias antagonistas produzidas por bactérias isoladas de amostras de solo do rio Pitimbu/RN contra cepas de *Staphylococcus* sp. *Facider Revista Científica* 6:32-50
- Calegari A, Hargrove WL, Rheinheimer D dos S, Ralisch R, Tessier D, Tourdonnet S D, Guimarães M de F (2008) Impact of long-term no-tillage and cropping system management on soil organic carbon in an Oxisol: a model for sustainability. *Agronomy Journal*, Madison 100:1013-1019
- Campos Silva JR, Souza RM; Zaccaron AB, Silva, LHCP, Castro AMS (2008) Bactérias endofíticas no controle e inibição *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, agente da pinta bacteriana do tomateiro. *Ciência e Agrotecnologia* 32:1062-1072
- Chanway CP, Shishido M, Nairn J, Jungwirth S, Markham J, Xiao G, Holl FB (2000) Endophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. *Forest Ecology and Management* 133:81-88
- Chapalain A, Vial L, Laprade N, Dekimpe V, Perreault J, Déziel E (2013) Identification of quorum sensing-controlled genes in *Burkholderia ambifaria*. *Microbiology Open* (2)2:226–242
- Chau JF, Bagtzoglou AC, Willig MR (2011) The effect of soil texture on richness and diversity of bacterial communities. *Environ Foren* 12:333–341
- Chau JF, Bagtzoglou AC, Willig MR (2011) The effect of soil texture on richness and diversity of bacterial communities. *Environ Foren* 12:333–341
- Chen C, Bélanger RR, Benhamou N, Paulitz TC (2000) Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 56:13-23
- Chiarini L, A Bevivino, C Dalmastri S, Tabacchioni, Visca P (2006) *Burkholderia cepacia* complex species: health hazards and biotechnological potential. *Trends Microbiol* 14:277–286
- Coenye TE, Mahenthiralingam D, Henry JJ, LiPuma S, Laevens M, Gillis, et al. (2001) *Burkholderia ambifaria* sp. nov., a novel member of the *Burkholderia cepacia* complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* 51:1481–1490
- Correa JD, Barrios ML, Galdona, RP (2004) Screening for plant growth-promoting rhizobacteria in *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste), a forage tree-shrub legume endemic to the Canary Islands. *Plant Soil*, 266:758

- De Fede KL, Panaccione DG, Sextone AJ (2001) Characterization of dilution enrichment cultures obtained from size-fractionated soil bacteria by BIOLOGR community-level physiological profiles and restriction analysis of 16S rDNA genes. *Soil Biology and Biochemistry* (33)11:1555-1562
- DeGroot SH, Claassen VP, Scow KM (2005) Microbial community composition on native and drastically disturbed serpentine soils. *Soil Biol Biochem* 37:1427–1435
- Diel D, Behling M, Farias Neto AL de, Isernhagen ECC (2014) Distribuição horizontal e vertical de fósforo em sistemas de cultivos exclusivos de soja e de integração lavoura-pecuária-floresta. *Pesq Agropec Bras* 49:639-647
- Durigan G, Engel VL, Torezan JM, Melo ACG de, Marques MCM, Martins SM, Reis A, Scarano FR (2010) Normas jurídicas para a restauração ecológica: uma barreira a mais a dificultar o êxito das iniciativas? *Revista Árvore* 34(3)471-485
- Eisenhauer N, Bessler H, Engels C, Gleixner G, Habekost M, Milcu A, Partsch S, Sabais ACW, Scherber C, Steinbeiss S, Weigelt A, Weisser WW, Scheu S (2010) Plant diversity effects on soil microorganisms support the singular hypothesis. *Ecology* 91:485–496
- Engel VL, Parrota JA. (2003) O desenvolvimento do conceito de restauração ecológica. In: Kageyama PY, Oliveira RE, Moraes LFD, Engel VL, Gandara FB.(Org.) *Restauração ecológica de ecossistemas naturais*. Botucatu. p 1-26
- Ferreira A, Quecine MC, Lacava PT, Oda S, Azevedo JL, Araújo WL(2008) Diversity of endophytic bacteria from eucalyptus species seeds and colonization of seedlings by pantoea agglomerans. *Fems Microbiology Letters*, 287(1), 8–14
- Futamata H, Harayama S, Watanabe K (2001) Group-specific monitoring of phenol hydroxylase genes for a functional assessment of phenol-stimulated trichloroethylene bioremediation. *Appl Environ Microbiol* 67:4671–4677
- Grayston SJ, Griffiths GS, Mawdesley JL, Campebell CD, Bardgett RD (2001) Accounting of variability in soil microbial communities of temperate upland grassland ecosystem. *Soil Biology & Biochemistry* 33:533-551
- Habekost M, Eisenhauer N, Scheu S, Steinbeiss S, Weigelt A, Gleixner G (2008) Seasonal changes in the soil microbial community in a grassland plant diversity gradient 4 years after establishment. *Soil Biol Biochem* 40:2588–259
- Hall TA (1999) BioEdit a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98
- Hammami I, Rhouma A, Jaouabi B, Rebai A, Nesme X. Optimization and biochemical characterization of a bacteriocin from a newly isolate *Bacillus subtilis* strain 14B for biocontrol of *Agrobacterium* spp. strain. *Letters in Applied Microbiology* 48:253-260
- Han J, Sun L, Dong X, Cai Z, Sun X, Yang H, Wang Y, Song W (2005) Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a

diazotroph and a potential biocontrol agent against various pathogens. *Syst Appl. Microbiol* 28:66-76

Han JI, Choi HK, Lee SW, Orwin PM, Kim J, LaRoe SL, Kim T, O'Neil J, Leadbetter JR, Lee SY, Hur CG, Spain JC, Ovchinnikova G, Goodwin L, Cliff H (2011) Complete genome sequence of the metabolically versatile plant growth-promoting endophyte *Variovorax paradoxus* S110. *J Bacteriol* 193:1183–1190

IMEA (2014), Caracterização da agricultura no estado do Mato Grosso <http://www.imea.com.br> Acesso 21 dez 2014

INMET Instituto Nacional de Meteorologia. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abasteciment (2014) <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home2/index> .Acesso 21 dez 2014

Kageyama PY, Gandara F (2003) Restauração e conservação de ecossistemas tropicais. In: Cullen Jr L, Valladares-Pádua, C.R. (Org.). Métodos de estudos em biologia da conservação e manejo da vida silvestre. Curitiba: UFPR, Fundação O Boticário de Proteção à Natureza. p. 383-394

Karlidag H, Esitken A, Turan M, Sahin F (2007) Effects of root inoculation of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient element contents of leaves of apple. *Scientia Horticulturae* 114:6-20

Kim PI, Chung KC (2004) Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET 0908. *FEMS Microbiology Letters* 234: 177-183

Kupper KC, Gimenes-Fernandes N, Goes A de (2003) Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. *Fitopatologia Brasileira* 28:251-257

Lanna Filho R, Ferro HM, Pinho RSC (2010) Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. *Revista Trópica Ciências Agrárias e Biológicas* 4(2):12-20

Luo S et al. (2012) Endophyte-assisted promotion of biomass production and metal-uptake of emergy crop sweet sorghum by plant-growth-promotion endophyte *Bacillus* sp. SLS18. *Applied Microbiology and Biotechnology* 93:1745-1753

Mahenthiralingam, E., A. Baldwin, and C. G. Dowson (2008) *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. *J. Appl. Microbiol* 104:1539–1551

Manjula K, Krishna Kishore G, Podile AR (2004) Whole cells of *Bacillus subtilis* AF 1 proved more effective than cell-free and chitinase-based formulations in biological control of citrus fruit rot and groundnut rust. *Canadian Journal of Microbiology* 50: 737-744

Moreira FMS, Siqueira JO (2006) Microbiologia e bioquímica do solo. 2 ed. Lavras: Editora UFLA. 729 p.

- Nunes JS, Araújo ASF, Nunes LAPL, Lima LM, Carneiro RFV, Tsai SM, Salviano AAC (2012) Land degradation on soil microbial biomass and activity in Northeast Brazil. *Pedosphere* 22:88–95
- Ollivier J, Towe S, Bannert A, Hai B, Kastl EM, Meyer A, Su MX, Kleinedam K, Schlöter M (2011) Nitrogen turnover in soil and global change. *FEMS Microbiol Ecol* 78:3–16
- Orhan E, Esitken A, Ercisli S, Turan M, Sahin, F (2006) Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. *Scientia Horticulturae* 111:38-43
- Pereira JC, Neves MCP, Drozdowicz A (1999) Dinâmica das populações bacterianas em solos de cerrados. *Pesq. Agropec. Bras.* 34:(5)801-811
- Potthoff M, Steenwerth KL, Jackson LA, Drenovsky RE, Scow KM, Joergensen RG (2006) Soil microbial community composition as affected by restoration practices in California grassland. *Soil Biology & Biochemistry* 38:1851-1860
- Ramamoorthy V, Viswanathan R, Raguchander T, Prakasam V, Samiyappan R (2001) Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protection* 20:1-11
- Saha D, G.D. Purkayastha A, Ghosh M I, Saha A (2012) *B. subtilis* strains as potential biocontrol agents *Journal of Plant Pathology* 94(1), 109-118
- Satola B, Wübbeler JH, Steinbüchel A (2013) Metabolic characteristics of the species *Variovorax paradoxus* *Appl Microbiol Biotechnol* 97:541–560
- Selle, GL (2007) Ciclagem de nutrientes em ecossistemas florestais. *Bioscience Journal* 23: 29-39
- SEMA – MT, Secretaria de Estado Meio Ambiente – Mato Grosso. Características do Mato Grosso. <http://www.sema.mt.gov.br/>. Acesso: 10 dez 2014
- Senthilkumar M, Govindasamy V, Annapurna K (2007) Role of antibiosis in suppression of charcoal rot disease by soybean endophyte *Paenibacillus* sp. HKA-15. *Current Microbiology* 55:25-29
- Silva AP, Babujia LC, Matsumoto LS, Guimarães MF ; Hungria M (2013) Microbial diversity under different soil tillage and crop rotation systems in an oxisol of southern. Brazil *Open Agricola* 7:40-47
- Silva F de A, Azevedo CAV (2009) Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: Word Congress on Computers in Agriculture, 7, Reno-NV-USA. American Society of Agricultural and Biological Engineers
- Six J, Frey SD, Thiet RK (2006) Bacterial and fungal contributions to carbon sequestration in agroecosystems. *Soil Sc Soc Am J* 70:555–569

- Souza RC, Cantão ME, Vasconcelos ATR.,Nogueira MA.,Hungria M. (2013) Soil metagenomics reveals differences under conventional and no-tillage with crop rotation or succession. *Applied Soil Ecology*. 72:49– 61
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, Chicago 24: 1596-1599
- Thomas SH, Wagner RD, Arakaki AK, Skolnick J, Kirby JR, Shimkets LJ, Sanford RA, Löffler FE (2008) The mosaic genome of *Anaeromyxobacter dehalogenans* strain 2CP-C suggests an aerobic common ancestor to the delta-proteobacteria. *PLoS One*, 3(5)
- Tipayno S, Kim CG, Sa T (2012) T-RFLP analysis of structural changes in soil bacterial communities in response to metal and metalloid contamination and initial phytoremediation. *App Soil Ecol* 61:137–146
- Tsavkelova EA, Cherdyntseva TA, Botina SG, Netrsov AI (2007) Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *Microbiological Research* 162:69-76
- Van der Putten WH (2012) Aboveground-belowground interactions, and species' range shifts. *Ann Rev Ecol Evol Syst* Cl Ch 43:365–383
- Veloso MEC, Leite LFC, Araujo ECE, Rocha Jr. AF, Lima MG, Salviano AAC (2010) Soil structure analyses and water infiltration under degraded area, Gilbue ´s, PI. In International conference: climate, sustainability and development in semiarid regions, Fortaleza, p 1–4
- Voroney RP (2007) The soil habitat. In: *Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry*, edited by E. A. Paul p 25-52
- Zak DR, Holmes WE, White DC, Peacock AD, Tilmam D (2003) Plant diversity, soil microbial communities, and ecosystem function: are there any links? *Ecology* 84:2042–2050
- Zilli JE, Rumjanek NG, Xavier GR, Coutinho HL da C, Neves MCP (2003) Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. *Cadernos de Ciência e Tecnologia* (20)3: 391-411

World Journal of Microbiology and Biotechnology

Editor – in- Chief: Peter J. Large

ISSN:0959-3993 (print version)

ISSN: 1573-0973 (electronic version/0

Journal no.11274

Instructions for Authors

Manuscript Submission

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Title page

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Format

Manuscripts should be divided into the following sections:

- Title page
- Abstract
- Introduction
- Materials and methods
- Results
- Discussion; the Discussion section must not recapitulate the Results
- Acknowledgements
- References
- Figure legends
- Figures
- Tables

Results and Discussion should be separated.

Text

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- [LaTeX macro package \(zip, 182 kB\)](#)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

References

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

- Journal article
Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8
Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:
Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329
- Article by DOI
Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086
- Book
South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London
- Book chapter
Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257
- Online document
Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007
- Dissertation
Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

- ISSN.org LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

- EndNote style (zip, 2 kB)

Tables

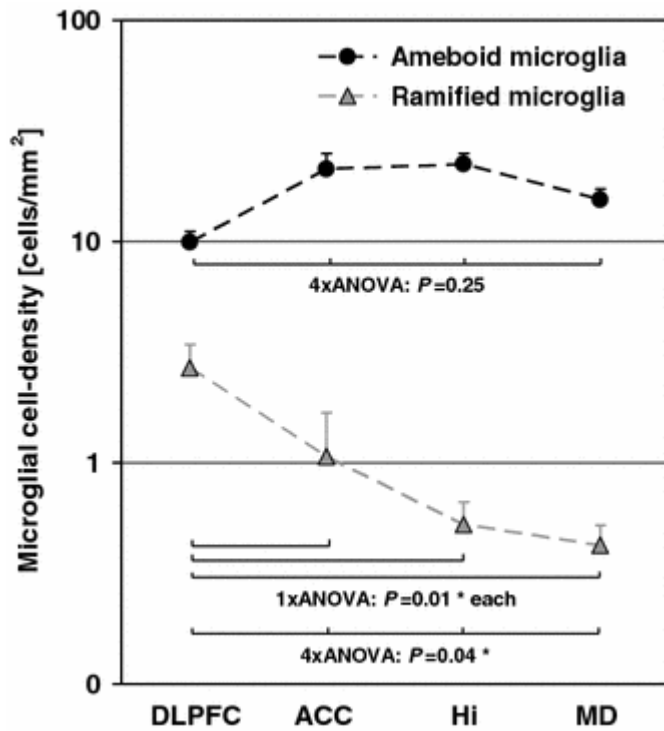
- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Artwork and Illustrations Guidelines

Electronic Figure Submission

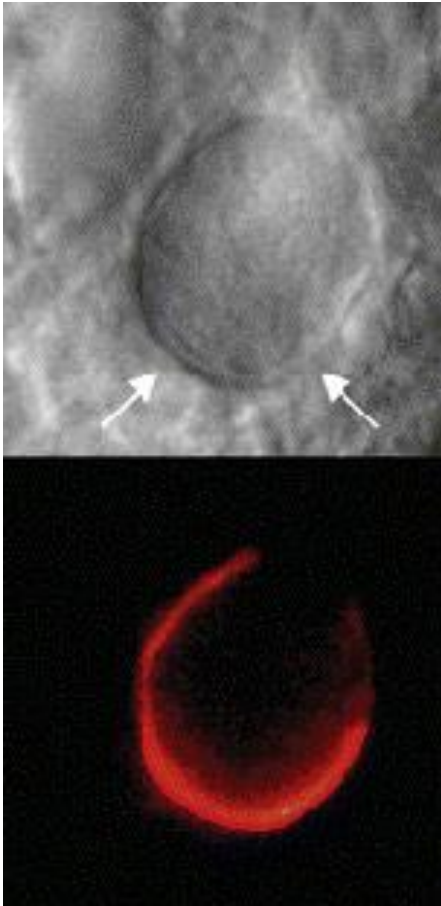
- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art



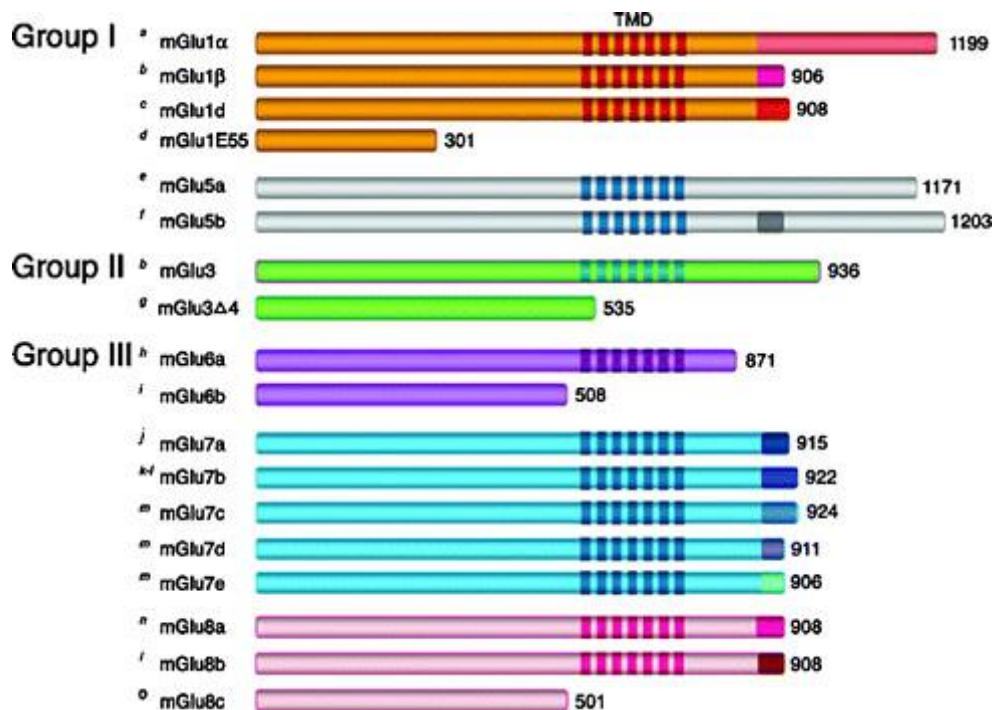
- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art



- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Electronic Supplementary Material

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

- Always use MPEG-1 (.mpg) format.

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., “... as shown in the animation (Online Resource 3)”, “... additional data are given in Online Resource 4”.
- Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

Availability of Materials

By publishing the authors agree that any microbial strains, plasmids, viruses, and other materials such as prions or cell lines newly described in the articles are available in a timely fashion, free or at reasonable cost, to members of the scientific community for noncommercial purposes, if necessary via an appropriate Materials Transfer Agreement between the interested parties.

We strongly encourage the authors to deposit important strains in publicly accessible culture collections and to refer to the collections and strain numbers in the manuscript. The authors should indicate laboratory strain designations and donor source when the culture or subculture specimen is distributed by individuals.

Nucleotide and Amino Acid Sequences

Any nucleotide or amino acid sequences that were determined for the first time should be deposited to a public database, such as GenBank, EMBL or DDBJ, and the accession numbers should be included in a separate paragraph in the Materials and Methods section. Sequence data must be publicly available no later than the publication date of the article.

Ethical Responsibilities of Authors

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

- The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling (“self-plagiarism”).
- A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. “salami-publishing”).
- No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions
- No data, text, or theories by others are presented as if they were the author’s own (“plagiarism”). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

- Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.
- Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.

In addition:

- Changes of authorship or in the order of authors are not accepted **after** acceptance of a manuscript.
- Requesting to add or delete authors at revision stage, proof stage, or after publication is a serious matter and may be considered when justifiably warranted. Justification for changes in authorship must be compelling and may be considered only after receipt of written approval from all authors and a convincing, detailed explanation about the role/deletion of the new/deleted author. In case of changes at revision stage, a letter must accompany the revised manuscript. In case of changes after acceptance or publication, the request and documentation must be sent via the Publisher to the Editor-in-Chief. In all cases, further documentation may be required to support your request. The decision on accepting the change rests with the Editor-in-Chief of the journal and may be turned down. Therefore authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission.
- Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the

accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief's implementation of the following measures, including, but not limited to:

- If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.
- If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note.
- The author's institution may be informed.

Compliance with Ethical Standards

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" before the References when submitting a paper:

- Disclosure of potential conflicts of interest
- Research involving Human Participants and/or Animals
- Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the Instructions for Authors carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

Disclosure of potential conflicts of interest

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests **that are directly or indirectly related to the research** may include but are not limited to the following:

- Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)
- Honoraria for speaking at symposia
- Financial support for attending symposia
- Financial support for educational programs
- Employment or consultation

- Support from a project sponsor
- Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships
- Multiple affiliations
- Financial relationships, for example equity ownership or investment interest
- Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)
- Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found

- [here](#):

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Research involving human participants and/or animals

1) Statement of human rights

When reporting studies that involve human participants, authors should include a statement that the studies have been approved by the appropriate institutional and/or national research ethics committee and have been performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards.

If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that the independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study.

The following statements should be included in the text before the References section:

Ethical approval: “All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.”

For retrospective studies, please add the following sentence:

“For this type of study formal consent is not required.”

2) Statement on the welfare of animals

The welfare of animals used for research must be respected. When reporting experiments on animals, authors should indicate whether the international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals have been followed, and that the studies have been approved by a research ethics committee at the institution or practice at which the studies were conducted (where such a committee exists).

For studies with animals, the following statement should be included in the text before the References section:

Ethical approval: “All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.”

If applicable (where such a committee exists): “All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.”

If articles do not contain studies with human participants or animals by any of the authors, please select one of the following statements:

“This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.”

Informed consent

All individuals have individual rights that are not to be infringed. Individual participants in studies have, for example, the right to decide what happens to the (identifiable) personal data gathered, to what they have said during a study or an interview, as well as to any photograph that was taken. Hence it is important that all participants gave their informed consent in writing prior to inclusion in the study. Identifying details (names, dates of birth, identity numbers and other information) of the participants that were studied should not be published in written descriptions, photographs, and genetic profiles unless the information is essential for scientific purposes and the participant (or parent or guardian if the participant is incapable) gave written informed consent for publication. Complete anonymity is difficult to achieve in some cases, and informed consent should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning.

The following statement should be included:

Informed consent: “Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.”

If identifying information about participants is available in the article, the following statement should be included:

“Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article.”

Does Springer provide English language support?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in all areas
Springer
publishes in:

- Edanz English editing for scientists

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.

Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

- Edanz English editing for scientists

For Authors from China

文章在投稿前进行专业的语言润色将对作者的投稿进程有所帮助。作者可自愿选择使用Springer推荐的编辑服务，使用与否并不作为判断文章是否被录用的依据。提高文章的语言质量将有助于审稿人理解文章的内容，通过对学术内容的判断来决定文章的取舍，而不会因为语言问题导致直接退稿。作者需自行联系Springer推荐的编辑服务公司，协商编辑事宜。

- 理文编辑

For Authors from Japan

ジャーナルに論文を投稿する前に、ネイティブ・スピーカーによる英文校閲を希望されている方には、Edanz社をご紹介します。サービス内容、料金および申込方法など、日本語による詳しい説明はエダンズグループジャパン株式会社の下記サイトをご覧ください。

- エダンズグループジャパン

For Authors from Korea

영어 논문 투고에 앞서 원어민에게 영문 교정을 받고자 하시는 분들께 Edanz 회사를 소개해 드립니다. 서비스 내용, 가격 및 신청 방법 등에 대한 자세한 사항은 저희 Edanz Editing Global 웹사이트를 참조해 주시면 감사하겠습니다.

- Edanz Editing Global

After acceptance

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

- Springer Open Choice

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor. After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.