

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E
AMBIENTAIS**

IVANA GIULY TAVARES FLORES DA SILVA

PRISCILA LEOCADIA ROSA DOURADO

**TESTE DE ANTIBIOSE COM DIFERENTES GRUPOS BACTERIANOS
ISOLADOS DE SOLO CULTIVADO COM CANA-DE-AÇÚCAR SOB A
APLICAÇÃO DE FIPRONIL**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO - CURSO DE
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**DOURADOS/MS
DEZEMBRO 2011**

**IVANA GIULY TAVARES FLORES DA SILVA
PRISCILA LEOCADIA ROSA DOURADO**

**TESTE DE ANTIBIOSE COM DIFERENTES GRUPOS BACTERIANOS ISOLADOS DE
SOLO CULTIVADO COM CANA-DE-AÇÚCAR SOB A APLICAÇÃO DE FIPRONIL**

ORIENTADORA: PROF^a. Dr^a. GISELE JANE DE JESUS

Apresentação do trabalho de Conclusão de Curso, pela
Universidade Federal da Grande Dourados, como requisito
parcial à obtenção do Título de Licenciatura em Ciências
Biológicas.

**DOURADOS/MS
DEZEMBRO 2011**

Após a apresentação, arguição e apreciação da banca examinadora, foi emitido o parecer _____, para o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: “Teste de antibiose com diferentes grupos bacterianos isolados de solo cultivado com cana-de-açúcar sob a aplicação de fipronil” de autoria de: Ivana Giuly Tavares Flores da Silva e Priscila Leocadia Rosa Dourado.

Dra. Mara Nilza Teodoro Lopes

Universidade Federal da Grande Dourados
Presidente da Banca Examinadora

Msc. Fabiana Gomes da Silva Profa
Universidade Federal da Grande Dourados
Membro Examinador

Msc. Tiara Kesli Conticelli Teodósio
Universidade Federal da Grande Dourados
Membro Examinador

Dourados/MS, 12 de dezembro de 2011
LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Tabela 1: Teste de antibiose com bactérias isoladas de solo cultivado com cana-de-açúcar na região de Dourados-MS.....	14
Figura1: Medidas dos halos de inibição (cm) frente as cepas bacterianas do solo, quando submetidas aos referidos antibióticos.....	15
Figura 2: Medidas dos halos de inibição (cm) frente as cepas bacterianas do solo,quando submetidas aos referidos antibióticos.....	16

SUMÁRIO

Lista de Figuras e Tabelas	v
Artigo: Teste de antibiose com diferentes grupos bacterianos isolados de solo cultivado com cana-de-açúcar sob aplicação de Fipronil	7
Introdução	8
Material e Métodos	11
Isolamento e caracterização morfológica de bactérias.....	11
Coloração de Gram	12
Teste de antibiograma	12
Resultados e Discussões	13
Conclusões	17
Agradecimentos	17
Literatura Citada	18
Normas da Revista Brasileira de Ciências do Solo	21

Teste de antibiose com diferentes grupos bacterianos isolados de solo cultivado com cana-de-açúcar sob aplicação de Fipronil

Antibiosis test with different bacterial groups isolated from soil cultivated with sugar cane in the application of the Fipronil

Ivana Giuly Tavares Flores da Silva¹; Priscila Leocadia Rosa Dourado²; Gisele Jane de Jesus³

RESUMO

O cultivo da cana-de-açúcar é uma das maiores produções do Brasil, porém esta prática agrícola consome muitos recursos naturais e/ou introduzem muitas substâncias (herbicidas, fertilizantes, etc.) para garantir melhor produção, e essas práticas podem afetar condições do solo. O fato, porém, é que cada vez mais as bactérias associadas às plantas têm mostrado grande potencial para o controle de pragas e doenças. Sendo assim o objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar morfológicamente as diferentes bactérias encontradas no solo cultivado com cana-de-açúcar e selecionar antibióticos para o controle desses microrganismos. Foram testados 8 antibióticos diferentes em 15 cepas bacterianas diversas, onde o antibiótico Eritromicina e Ciprofloxacina mostraram maior eficiência.

SUMMARY

The cultivation of sugar cane is one of the biggest productions in Brazil, but this practice natural resource-intensive agricultural and / or introduce many substances (herbicides, fertilizers, etc.) To ensure better production practices and these conditions can affect the the soil. The fact, however, is that more and more bacteria associated with plants have shown great potential for the control of pests and diseases. Therefore the aim of this work is to isolate, characterize morphologically different bacteria found in soil with cultivation of sugar cane and to select antibiotics to control these microorganisms. 8 different antibiotics were tested in 15 different bacterial strains, where the antibiotic erythromycin and ciprofloxacin showed the highest efficiency.

Palavras-chave: Teste de antibiose, Cana-de-açúcar, Bactérias fitopatogênicas.

⁽¹⁾Acadêmica do curso de Ciências Biológicas e Ambientais da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais/FCBA/UFGD.

⁽²⁾Acadêmica do curso de Ciências Biológicas e Ambientais da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais/FCBA/UFGD

⁽³⁾Orientadora, Docente da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais/FCBA/UFG

INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta tradição no cultivo de cana-de-açúcar e atualmente é um dos maiores produtores mundiais desta cultura. No entanto, em alguns locais, essa atividade se constitui em um dos sistemas agrícolas mais primitivos, que consomem muitos recursos naturais ou introduzem no ambiente outras substâncias como, inseticidas, herbicidas e fertilizantes para garantir melhor produção (Peret, 2009).

Podendo estas práticas agrícolas afetar as propriedades químicas, físicas e biológicas do solo, as quais dependem das condições de solo, clima, tipo de cultura e práticas adotadas (Mendes *et al.*, 2003).

O solo é um ecossistema complexo e dinâmico, difícil de ser estudado. As transformações microbianas, por conta das diferentes populações que nele ocorrem, assim como suas diferentes reações químicas podem ser alteradas sempre que esse ecossistema sofre algum tipo de interferência (Castro *et al.*, 1993).

Dentre os agentes químicos mais utilizados nas plantações de cana-de-açúcar está o fipronil, que se trata de um pesticida altamente eficiente, usado no solo, também em culturas de batata, milho, em folhas nas culturas de algodão, arroz, soja, sementes de arroz, cevada, feijão e na água para irrigação de arroz. Também é utilizado como preservante de madeira, no controle de pulgas e carrapatos em animais e domesticamente contra baratas e formigas. Sofre degradação lenta em água e sedimentos em condições anaeróbias, com tempo de meia-vida variando entre 116 e 130 dias. Quando exposto a luz, o composto sofre fotodegradação e sua meia-vida é de 3,6 horas em água e 34 dias em solo argiloso. Produz diversos metabólitos (produtos da fotodegradação) (Coutinho *et al.*, 2005).

Algumas propriedades biológicas do solo "ênfatizando as de natureza microbiológica" têm sido propostas como as mais sensíveis a mudanças quando os solos são submetidos a diferentes tipos de manejo e, portanto, seriam mais adequadas como indicadores de qualidade do solo. Segundo Bottomley (apud Reis, 2008), os microrganismos do solo influenciam diretamente a fertilidade e a produtividade vegetal por meio da ciclagem de nutrientes, supressão de fitopatógenos, produção de fitormônios e, ainda, a capacidade de metabolização de agrotóxicos. Também, ênfaticamente que as atividades dos microrganismos estão envolvidas no ciclo biogeoquímico, visto que influenciam diretamente a disponibilidade dos nutrientes e

elucidam melhor as mudanças do funcionamento do ecossistema solo (Reis, *et al.*;2008).

Dessa forma, dentre os processos biológicos que determinam a persistência dos herbicidas no solo, a degradação microbiana constitui o de maior importância. Entretanto, a complexa interação entre microrganismos, substratos e os constituintes geram influência significativa na biodegradação dessas moléculas (Souza *et al.*, 1999).

O fato, porém, é que cada vez mais as bactérias associadas às plantas têm mostrado grande potencial para o controle de pragas e doenças, além da promoção do crescimento da planta hospedeira e a produção de enzimas de interesse biotecnológico, tornando-se necessário um amplo conhecimento desta comunidade e das interações que ocorrem na planta, para que se possam utilizar estes microrganismos na agricultura, na indústria e em processos biotecnológicos (Silva *et al.*, 2009).

Na aplicação de diferentes tipos de manejo, é de se esperar, portanto, uma modificação qualitativa e quantitativa na constituição desse solo. Diferentes tipos de manejo podem significar diferentes disponibilidades de substrato que em última instância vão determinar, favorecendo ou inibindo, o estabelecimento dos diferentes grupos microbianos (Cardoso *et al.*, 1993).

Entretanto, é nas imediações das raízes (rizosfera) que os microrganismos encontram os substratos que necessitam para sua proliferação. As actinobactérias correspondem um grupo heterogêneo de bactérias filamentosas, que habitam o solo, adaptam-se às diversas condições do ambiente, produzem antibióticos e são capazes de colonizar a rizosfera e tecidos internos das plantas, a vasta maioria de antibióticos em uso é produzido pelas actinobactérias (Canova, 2009).

O uso de actinobactérias no controle de bactérias fitopatogênicas vem sendo estudada desde 1914 e embora, os trabalhos existentes sejam em número reduzido os resultados são promissores (Melo, 2009).

Os antibióticos não essenciais para o crescimento e reprodução do microrganismo que o produz. No entanto, em termos competitivos os microrganismos produtores de antibióticos são favorecidos em relação aos não produtores (Canova, 2009).

Por causa da fitotoxicidade e alto custo do tratamento, os antibióticos devem ser utilizados apenas para contaminantes específicos das culturas, pois somente as bactérias

que estiverem dentro do espectro de ação de cada antibiótico serão controladas (Pereira, 2003).

Importante destacar a atuação dos microrganismos em associação à qualidade ambiental, tanto por seu papel fundamental na manutenção dos ecossistemas como por sua sensibilidade a variações nos muitos fatores que compõem os ambientes, incluindo os vários agentes químicos que são introduzidos nos diversos cultivares. Eles fazem parte do solo de maneira indissociável, sendo responsáveis por inúmeras reações bioquímicas e desempenham papel fundamental na gênese do solo e ainda atuam como reguladores de nutrientes, pela decomposição da matéria orgânica e ciclagem dos elementos, atuando, portanto, como fonte de dreno de nutrientes para o crescimento das plantas (Sala *et al.*, 2007). As bactérias e os fungos são responsáveis por cerca de 90% da atividade da biomassa (Siqueira, *et al.*, 1994).

Partindo disso, pelo fato do solo ser um ecossistema complexo e difícil de ser estudado, devido as suas transformações microbianas, por conta das diferentes populações que nele ocorrem, assim como suas diferentes reações químicas podem ser alteradas sempre que esse ecossistema sofre algum tipo de interferência (Cardoso, *et al.*, 1993) é importante o uso de antibióticos para saber o grau de resistência ou sensibilidade de uma bactéria, que é comumente chamado de antibiograma.

Segundo Brunetta (2006), a eficácia no controle de patógenos através dos antibióticos depende da susceptibilidade da população do patógeno-alvo.

Essa susceptibilidade dos microrganismos às drogas pode ser pesquisada por métodos de diluição. Dois métodos são utilizados: a diluição seriada em tubos ou em placas e a difusão pelo sistema de discos, sendo este o método mais comum. As concentrações previamente determinadas de drogas são incorporadas ao meio de cultura ou em discos de papel. A maioria dos laboratórios usa o método de Kirby-Bauer que emprega discos de alta potência em gar Mueller-Hinton. A zona de inibição de crescimento e halo de inibição pode indicar as categorias, sensível, moderadamente sensível (intermediária) e resistente (Rende & Okura, 2008).

O uso de antibiograma como ferramenta para controlar a perda da microbiota do solo, devido às práticas agrícolas, é extremamente importante, porém, muito ainda precisa ser estudado, pois poucos estudos foram feitos sobre o assunto, baseado na baixa quantidade de bibliografias disponíveis. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo isolar, caracterizar morfológicamente as diferentes bactérias encontradas no

solo com cultivo de cana-de-açúcar e selecionar antibióticos para o controle desses microrganismos.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de solo foram coletadas em uma área experimental de 2500 m² (50 x 50m), cultivada com cana-de-açúcar, na Embrapa Agropecuária Oeste do município de Dourados/ MS (Latitude 22° 16' 26' S e Longitude 54° 48' 50' W), após aplicação de fipronil. Os tratamentos culturais foram os utilizados na região obedecendo às boas práticas agrícolas. O solo da área é classificado como Latossolo vermelho diférico típico de textura muito argilosa.

As sub-amostras foram diluídas em solução salina esterilizadas até o volume de 50 mL aproximadamente e foram inoculadas 0,1 ml de cada diluição por placa.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia, da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais/UFGD, onde foram feitos testes de antibiose com bactérias isoladas de solo cultivado de cana-de-açúcar.

Isolamento e caracterização morfológica de bactérias

O meio de cultura utilizado foi o Ágar Nutriente para crescimento bacteriano em meio sólido que foram preparados com água destilada aquecido até se dissolver completamente e posteriormente esterilizados por autoclavagem, a 121° C, observando as necessárias condições de assepsia, de modo a evitar contaminações com outros microrganismos.

Após serem autoclavados os meios foram vertidos em placas de Petri devidamente esterilizadas, até sua solidificação. Em seguida, as colônias bacterianas foram isoladas pela técnica de esgotamento em estrias, para serem reativadas, sendo que foram incubadas no tempo necessário para o crescimento bacteriano em um prazo de até três dias.

Com o crescimento as amostras foram diluídas em solução salina dispostas em microtubos tipo eppendorfs.

Coloração de Gram

Posteriormente ao crescimento bacteriano, foram feitos esfregaços nas lâminas e submetidos à técnica de coloração de gram. a fim de caracterizar as bactérias quanto suas características morfológicas em positivas ou negativas. Após esse procedimento as lâminas foram observadas ao microscópio óptico e identificadas de acordo com a sua forma, coloração e arranjo celular.

Teste de antibiograma

Para identificar o perfil de resistência das bactérias aos diversos tipos de antibiótico foram realizados testes de antibiograma, por meios da técnica de difusão em disco espalhados pelo meio de cultura em placas de Petri.

Para o teste de susceptibilidade foi utilizado o meio Ágar Nutriente vertidos em placa de Petri. As colônias bacterianas que estavam congeladas nos microtubos tipo eppendorf foram reativadas e na sequência diluídas em solução salina dispostas em tubos de ensaio. Após a homogeneização do inóculo foi introduzido um swab estéril dentro do tubo e, em seguida a inoculação foi feita em forma de estrias por toda a placa. A aplicação dos discos foi feita com o auxílio de uma pinça esterilizada. Foram utilizados 8 tipos diferenciados de discos de papel de 6 mm de diâmetro impregnados com os seguintes antibióticos, Ceftazidina 30 mg (CAZ); eritromicina 15 mg (ERI); cefotaxima 30 mg (CTX); NV 15 mg (NV); sulfam-trimetropina 30 mg (SUT); oxacilina 1 mg (OXA); cloranfenicol 30 mg (CLO); ciprofloxacina 5 mg (CIP) sendo que em cada placa foram colocados 4 tipos diferentes, assepticamente, sobre o meio, sendo as placas então incubadas. Cada disco foi considerado como uma unidade de observação.

A sensibilidade do isolado bacteriano ao antibiótico foi avaliada após 24 horas de incubação, determinando-se o tamanho do halo de inibição, presença de contaminantes e se o disco estava bem definido.

Esse método é qualitativo e permite classificar a amostra bacteriana em suscetível, intermediária ou resistente ao agente antimicrobiano (Sejas et.al., 2003).

Assim, este teste foi realizado com o intuito de avaliar a resistência dos contaminantes bacterianos frente aos antibióticos selecionados.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados do presente trabalho foram obtidos através de testes de antibiograma para verificar a susceptibilidade/resistência de bactérias extraídas do solo com a presença de fipronil. Para isso, foram analisadas a formação dos halos transparentes sobre a superfície do meio, onde se inoculou os discos de antibióticos, revelando a ação inibitória do antibiótico sobre a bactéria do teste, e dessa forma, os extratos que apresentarem ausência de crescimento bacteriano revelaram ação inibitória do antibiótico analisado sobre a bactéria.

Segundo Pinto (apud Toledo, 2011), o crescimento do microrganismo ocorre respeitando, porém, as áreas onde ocorreu a difusão do antibiótico, gerando contraste e resultando na chamada zona de inibição de crescimento.

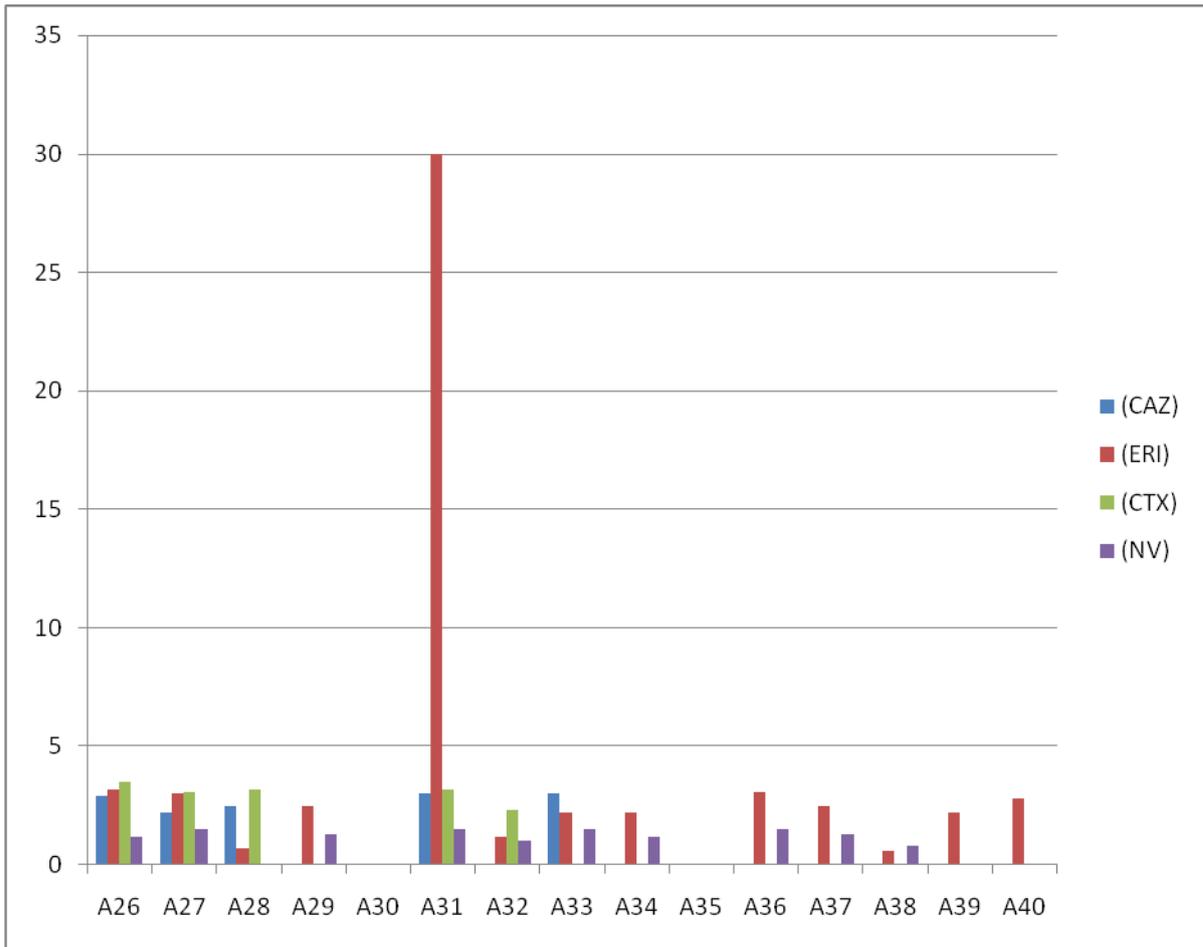
O teste de difusão pelo método de disco é o mais utilizado não só pela facilidade, mas pela rapidez do resultado obtido. Os dados foram obtidos visualmente, através da observação do desenvolvimento das colônias, tomando-se como padrão o halo de inibição das bactérias. As diferenças observadas no crescimento das colônias das bactérias, no meio contendo os diferentes tipos de antibióticos, foram classificadas em susceptíveis as que não cresceram e resistentes as que cresceram (Toledo, 2011).

Conforme a Tabela 1, que mostra as medidas do halo de inibição de diferentes antibióticos sobre as bactérias utilizadas, é possível analisar que todos os antibióticos utilizados realizaram ação inibitória frente às cepas bacterianas.

Tabela 1. Teste de antibiose com bactérias isoladas de solo cultivado com cana-de-açúcar na região de Dourados-MS

	30mg (CAZ)	15 mg (ERI)	30mg (CTX)	10 mg (NV)	30mg (SUT)	1 mg (OXA)	30mg (CLO)	5 mg (CIP)
Medidas do halo de inibição em cm								
A26	2,9	3,2	3,5	1,2	3,0	2,5	3,5	3,7
A27	2,2	3,0	3,1	1,5	2,7	1,9	2,1	3,5
A28	2,5	0,7	3,2	0,0	2,7	0,0	2,7	3,1
A29	0,0	2,5	0,0	1,3	0,0	0,0	1,9	2,1
A30	0,0	0,0	0,0	0,0	3,0	1,7	1,5	2,8
A31	3,0	3,0	3,2	1,5	2,7	1,7	2,7	3,0
A32	0,0	1,2	2,3	1,0	0,0	0,8	1,0	2,5
A33	3,0	2,2	0,0	1,5	2,5	0,0	2,5	2,8
A34	0,0	2,2	0,0	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0
A35	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9	2,0
A36	0,0	3,1	0,0	1,5	0,0	0,0	0,0	2,7
A37	0,0	2,5	0,0	1,3	0,0	0,0	1,6	2,1
A38	0,0	0,6	0,0	0,8	0,0	0,6	1,0	1,5
A39	0,0	2,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	1,8
A40	0,0	2,8	0,0	0,0	0,0	0,0	1,8	2,9

Sobretudo, é possível notar que ao compararmos os resultados, houve variações significativas entre os antibióticos testados, nas placas de A26 à A40 as cepas bacterianas apresentaram diferentes tamanhos nos halos de inibição, porém, a maioria dos antibióticos testados inibiram o crescimento ou não passaram de cerca de 1,5 cm de diâmetro. Nesta tabela podemos perceber que os antibióticos Eritromicina e Ciprofloxacina foram os mais inibitórios quando tiveram seus halos medidos.



Medida do halo de inibição

Cepas bacterianas (+ ou -)

Figura 1. Medidas dos halos de inibição (cm), frente as cepas bacterianas do solo, quando submetidas aos referidos antibióticos.

Observando a **figura 1**, dentre um grupo de 4 antibióticos envolvendo Ceftazidima, cefotaxima e NV a Eritomicina obteve halo de inibição em 13 das 15 placas, sendo que na A31 mostrou maior halo de inibição a esse antibiótico do que os demais e as placas A39 e A40 só foram sensíveis a Eritromicina, sendo assim resistentes aos demais antibióticos. Os demais antibióticos se apresentaram menos eficientes, pois obtiveram menor espectro de ação.

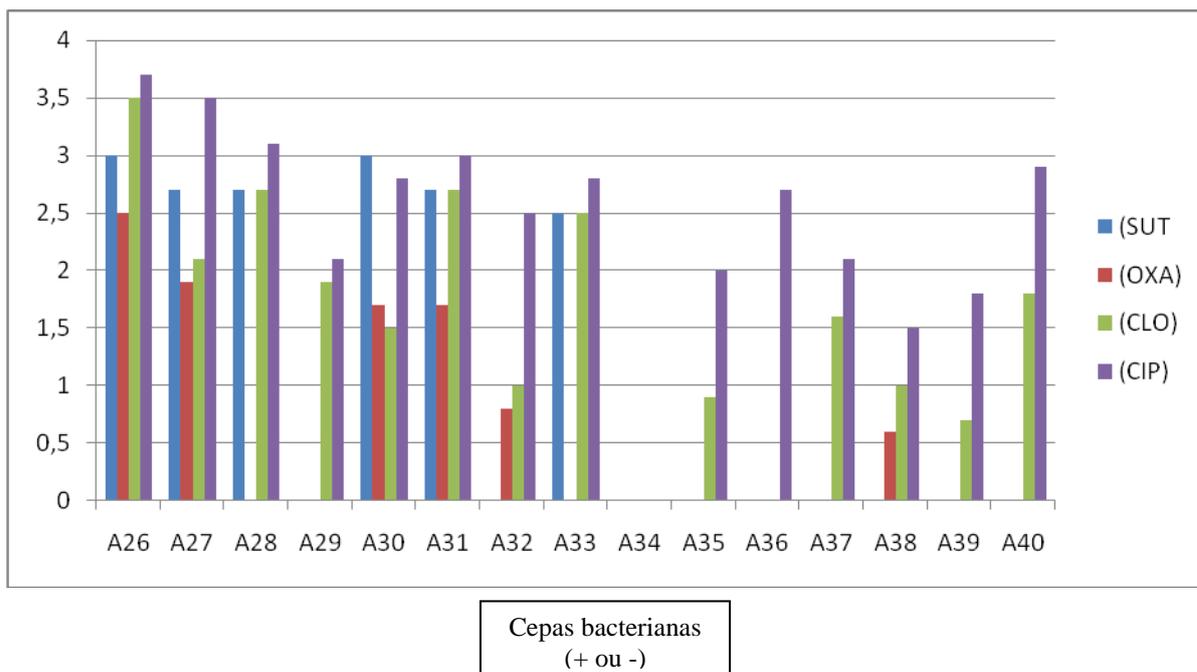


Figura 2. Medidas dos halos de inibição (cm), frente às cepas bacterianas do solo, quando submetidas aos referidos antibióticos.

Avaliando a resistência dos contaminantes bacterianos frente aos antibióticos a **figura 2**, estão os antibióticos Sulfa-Trimetropina, Oxacilina, Cloranfenicol e Ciprofloxacina, sendo este mais eficiente aos demais, pois também obteve halo de inibição em 13 das 15 placas, onde o diâmetro maior foi na placa A26 que também se mostrou sensível aos outros antibióticos testados. O antibiótico Sulfa-Trimetropina também se mostrou eficaz nas placas A26, A27, A28, A30, A31 e A33. Nesta análise podemos sugerir que Oxacilina se mostrou menos eficaz comparando aos demais antibióticos.

Os testes de antibiograma não se prestam apenas para se saber quais antibióticos um determinado isolamento bacteriano é sensível ou resistente. Na pesquisa com bactérias fitopatogênicas, os antibiogramas podem ser usados para detectar e quantificar antibióticos em solo, órgãos vegetais, lavados de filoplano, etc. assim como servir como instrumento auxiliar em grande número de outros tipos de pesquisa (Romeiro).

A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno genético, relacionado à existência de genes contidos no microrganismo que codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação das drogas. A resistência pode ser originada em

mutações que ocorrem no microrganismo durante seu processo reprodutivo (Zin *et al*, 2007).

CONCLUSÕES

Os antibióticos que sugeriram maior eficiência sobre as cepas bacterianas foram a Eritromicina conforme figura 1 e Ciprofloxacina conforme figura 2, foram os antibióticos que melhor ação inibitória provocaram sobre as cepas bacterianas analisadas.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal da Grande Dourados pelo apoio financeiro e pelo uso dos laboratórios.

A FUNDECT pelo apoio financeiro.

A nossa orientadora Gisele Jane de Jesus por ter nos auxiliado e estado ao nosso lado todo esse tempo.

A técnica de laboratório e Mestre Fabiana Gomes da Silva pela paciência com que nos ajudou nos procedimentos laboratoriais e que nos foi de grande ajuda.

A minha mãe e padrasto por estarem ao meu lado em todos os momentos, me dando força e amor.

A minha companheira Priscila Dourado por estar ao meu lado em todos os momentos e por quem tenho um imenso carinho.

Aos meus amigos do curso pela companhia ao longo desses anos.

E principalmente, a Deus, por ter me dado à chance de estar aqui hoje.

LITERATURA CONSULTADA

- BALOTA, E.L; COLOZZI-FILHO, A; ANDRADE, D.S; HUNGRIA, M. **Biomassa microbiana e sua atividade em solos sob diferentes sistemas de preparo e sucessão de culturas.** Revista Brasileira Ciência do Solo, 1998.
- CANOVA, Sara Pigato. **Diversidade e Bioprospecção de actinobactérias isoladas de manguezais.** Instituto de Ciências Biomédicas ICB IV da Universidade de São Paulo. Janeiro de 2009
- CARDOSO, E. J. B. N.; PRADO, H. do; SEVEDO, A. C. R. CASTRO, O. M. **Avaliação da atividade de microrganismos do solo em diferentes sistemas de manejo de soja.** Scientia Agrícola, Piracicaba, vol.50, no.2, 8 p., 1993.
- CORÁ, J.E; ARAÚJO, A.V; PEREIRA, G. T; BERALDO, J. M. G. **Variabilidade espacial de atributos do solo para adoção do sistema de agricultura de precisão na cultura de cana-de-açúcar.** Revista Brasileira de Ciência do Solo. Viçosa. 2004.
- COUTINHO, C. F. B.; TANIMOTO, S.T.; GALLI, A.; GARBELLINI, G.S.; TAKAYAMA, M.; AMARAL, R.B. do; MAZO, L.H.; AVACA, L.A.; MACHADO, S.A.S. **Pesticidas: Mecanismo de Ação, Degradação e Toxidez.** Instituto de Química de São Carlos (IQSC), São Carlos-SP, 2005.
- FREITAS, V.R; PICOLI, S.U. **A coloração de Gram e as variações na sua execução.** Laboratório de Biomedicina. 2007.
- GONÇALVEZ, A.L; ALVES FILHO, A; MENEZES, A.H. **Atividade antimicrobiana do mel de abelha nativa sem ferrão *Nannotrigona testaceicornes* (Hymenoptera: apidae, meliponini).** UNESP. RIO CLARO. 2005.
- KUSS, A.V; KUSS, V.V; LOVATO, T; FLÔRES, M.L. **Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas.** Pesquisa Agropecuária Brasileira. Brasília. 2007.

- MELO, F. M. P.; **Bioprospecção de actinobactérias rizosféricas de milho (ZEA MAYS L.) com atividade antifúngica.** Programa de Pós Graduação Interunidades de Biotecnologia USP /Instituto Butantã/IPT. São Paulo. 2009.

- MENDONZA, H. N. S; LIMA, E; ANJOS, L. H. C; SILVA, L. A; CEDDIA, M. B; ANTUNES, M. V. **Propriedades químicas e biológicas do solo de tabuleiro cultivado com cana-de-açúcar com e sem queima da palhada.** Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Viçosa. 2000.

- NEDER, R. N. **Microbiologia, manual de laboratório.** Editora Nobel, pág 109, São Paulo 1992.

- OLIVEIRA, F.R.A; VALARINI, P.J; POPPI, R.J. **Indicadores de qualidade do solo em área de mata e cultivado com cana orgânica e convencional.** Revista Brasileira em Agroecologia. 2007.

- PEREIRA, J. E. S. et al. **Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados.** Pesquisa agropecuária brasileira. Brasília. v. 38. Julho. 2003

- PEREIRA, João Carlos; NEVES, Maria Cristina Prata; DROZDOWICZ, Adam. **Quantificações das populações de bactérias em geral, de bactérias resistentes a antibióticos e de actinomicetos em solos.** Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 1996.

- PEREIRA, J.C; NEVES, M.C.P; DROZDOWICZ, A. **Quantificações das bactérias em geral, de bactérias resistentes a antibióticos e de actinomicetos de solos.** EMBRAPA. Rio de Janeiro. 1996.

- REIS, M.R; SILVA, A.A; COSTA, M.D; GUIMARÃES, A.A; FERREIRA, E.A; SANTOS, J.B; CECON, P.R. **Atividade microbiana em solo cultivado com cana-de-açúcar após aplicação de herbicidas.** Planta Daninha. Viçosa. 2008.

- REIS, M.R; SILVA, A.A; GUIMARÃES, A.A; COSTA, M.D; MASSENSINI, A.M; FERREIRA, E.A. **Ação de herbicidas sobre microrganismos solubilizadores de fosfato inorgânico em solo rizosférico de cana-de-açúcar.** Revista Planta Daninha. Viçosa. 2008.

- RENDE, J. C.; OKURA, M. H. **Microbiologia, roteiro de aulas práticas.** Editora Tecmedd, pág 141, São Paulo, 2008.

- ROMERO, R.S. **Antibiótico e seu emprego em pesquisa com bactérias fitopatogênicas.** UFV. Viçosa.

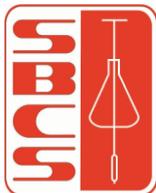
- SEJAS, L. **Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil.** Jornal brasileiro de Medicina e Patologia. Rio de Janeiro 2003

- TAVARES, W. **Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2000

- TOLEDO, C.P. **Identificação e controle de microrganismos contaminantes no processo de micropropagação de cana-de-açúcar.** Universidade de São Paulo. Piracicaba. 2011.

- ZIN, G.Z; SIMM, K.C.B. **Análise da susceptibilidade a antibióticos de bactérias presentes nas águas dos mananciais de abastecimento da cidade de cascavel-PR.** Paraná. 2007.

ANEXO I: Normas da Revista Brasileira de Ciência do Solo



Revista Brasileira de Ciência do Solo

ISSN 0100-0683 versão impressa

ISSN 1806-9657 versão on-line

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- Escopo e política
- Forma e preparação de manuscritos
- Envio de manuscritos

Escopo e política

A Revista Brasileira de Ciência do Solo é um periódico de divulgação científica publicado pela Sociedade Brasileira de Ciência do Solo (SBCS).

Os trabalhos submetidos à publicação somente poderão ser enviados pelo site www.sbcs.org.br, e não mais em papel, e nas seguintes formas:

Artigos ou notas científicas.

Revisões de literatura sobre tema específico.

Cartas ao Editor de, no máximo, quatro páginas digitadas em espaço duplo, contendo um dos seguintes temas: (a) Comunicação de matéria diretamente ligada à Ciência do Solo; (b) Comentário crítico de trabalhos publicados na Revista Brasileira de Ciência do Solo.

Só serão aceitos trabalhos escritos em português ou inglês, depois de revistos e aprovados pela Comissão Editorial, e que não foram publicados e não submetidos à publicação em outro veículo. Excetuam-se, nesta última limitação, os apresentados em congressos, em forma de resumo. O autor que encaminhar o trabalho deverá se responsabilizar pelos demais autores, quando houver, como co-responsáveis pelo conteúdo científico do trabalho.

Os trabalhos subdivididos em partes I, II..., devem ser enviados juntos, pois serão submetidos aos mesmos revisores.

Forma e preparação de manuscritos

Solicita-se observar as seguintes instruções para o preparo dos artigos e notas científicas:

1. O original deve ser encaminhado completo e revisto.
2. Deve ser enviado digitado em espaço 1,5, utilizando fonte "Times New Roman 12", formato A4, com 2,5 cm nas margens superior e inferior e 2,0 cm nas margens direita e esquerda, enumerando-se todas as páginas e as linhas do texto.
3. O trabalho deve ser o mais claro e conciso possível. Somente em casos especiais serão aceitos trabalhos com número de páginas de texto superior a quinze.
4. Os artigos, notas e revisões deverão ser iniciados com o título do trabalho e, logo abaixo, os nomes completos dos autores. Como chamada de rodapé referente ao título, deve-se usar número-índice que poderá indicar se foi trabalho extraído de tese, ou apresentado em congresso, entidades financiadoras do projeto e, necessariamente, a data (Recebido para publicação em / /) em que o trabalho foi recebido para publicação. O cargo, o local de trabalho dos autores [endereço postal e, se possível, eletrônico (E-mail)], deverão ser inseridos também no rodapé, em numeração consecutiva de chamada de números-índices colocados logo após o nome de cada autor. A condição de bolsista poderá ser incluída.
5. Os artigos deverão ser divididos, sempre que possível, em seções com cabeçalho, na seguinte ordem: RESUMO, SUMMARY (precedido da tradução do título para o inglês), INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES, AGRADECIMENTOS e LITERATURA CITADA. Não há necessidade dessa subdivisão para os artigos sobre educação, revisões de literatura e notas científicas, embora devam ter, obrigatoriamente, RESUMO e SUMMARY.

Tais seções devem ser constituídas de:

- 5.1. TÍTULO do trabalho que deve ser conciso e indicar o seu conteúdo.
- 5.2. RESUMO que deve apresentar, objetivamente, uma breve frase introdutória, que justifique o trabalho, o que foi feito e estudado, os mais importantes resultados e conclusões. Ser seguido da indicação dos termos de indexação, diferentes daqueles constantes do título. A tradução do RESUMO para o inglês constituirá o SUMMARY.
- 5.3. INTRODUÇÃO que deve ser breve, esclarecendo o tipo de problema abordado ou a(s) hipótese(s) de trabalho, com citação da bibliografia específica e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho.
- 5.4. MATERIAL E MÉTODOS em que devem ser reunidas informações necessárias e suficientes que possibilitem a repetição do trabalho por outros pesquisadores.
- 5.5. RESULTADOS que devem conter uma apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros ou figuras devem ser preparados sem dados supérfluos.

5.6. DISCUSSÃO que deve conter os resultados analisados, levando em conta a literatura, mas sem introdução de novos dados.

5.7. CONCLUSÕES que devem basear-se somente nos dados apresentados no trabalho e deverão ser numeradas.

5.8. AGRADECIMENTOS devem ser sucintos e não aparecer no texto ou em notas de rodapé.

5.9. LITERATURA CITADA, incluindo trabalhos citados no texto, quadro(s) ou figura(s) e inserida em ordem alfabética e da seguinte forma:

a. Periódicos: Nome de todos os autores, Título do artigo. Título abreviado do periódico, volume: páginas inicial e final, ano de publicação. Exemplo:

FONSECA, J.A. & MEURER, E.J. Inibição da absorção de magnésio pelo potássio em plântulas de milho em solução nutritiva. R. Bras. Ci. Solo, 21:47-50, 1997.

b. Livro: Autores. Título da publicação. Número da edição. Local, Editora, ano de publicação. Número de páginas. Exemplo:

KONHNKE, H. Soil physics. 2.ed. New York, MacGraw Hill, 1969. 224p.

c. Participação em obra coletiva: Autores. Título da parte referenciada seguida de In: Nome do editor. Título da publicação, número da edição. Local de Publicação, Editora, ano. Páginas inicial e final. Exemplos:

- Capítulo de livro:

JACKSON, M.L. Chemical composition of soil. In: BEAR, F.E., ed. Chemistry of the soil. 2.ed. New York, Reinhold, 1964. p.71-141.

d. Trabalho em Anais:

VETTORI, L. Ferro livre por cálculo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 15., Campinas, 1975. Anais. Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1976. p.127-128.

e. CD-ROM:

SILVA, M.L.N.; FREITAS, P.L.; BLANCANEUX, P. & CURI, N. Índice de erosividade de chuva da região de Goiânia (GO). In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DO SOLO. 13., 1996. Anais. Luvas de Lindóia, Embrapa, 1996. CD-ROM

f. Internet:

EL NIÑO and La Niña. Disponível em: <
<http://www.stormfax.com/elnino.htm>>. Acesso em 15 out. 2000.

As abreviações de nome de revistas devem ser feitas de acordo com as usadas pelos abstracting journals, como dos Commonwealth Agricultural Bureaux.

6. As Referências no texto deverão ser feitas na forma: Silva & Smith (1975) ou (Silva & Smith, 1975). Quando houver mais de dois autores, usar a forma reduzida: (Souza et al., 1975). Referências a dois ou mais artigos do(s) mesmo(s) autor(es), no mesmo ano, serão discriminadas com letras minúsculas (Ex.: Silva, 1975a,b).

7. Os quadros deverão ser numerados com algarismos arábicos, sempre providos de um título claro e conciso e construídos de modo a serem auto-explicativos. Não usar linhas verticais. As linhas horizontais devem aparecer para separar o título do cabeçalho e este do conteúdo, além de uma ao final do quadro. O quadro deve ser feito por meio de uma tabela (MICROSOFT WORD/TABELA/INSERIR TABELA), no qual cada valor deve ser digitado em células distintas, estando centralizado e alinhado.

8. Os gráficos deverão ser preparados, utilizando-se "Softwares" compatíveis com "Microsoft Windows" ("Excel", "Power Point", "Sigma Plot", etc.). Para fotos e mapas coloridos utilizar resolução de 150 a 300 DPI. Não serão aceitas figuras que repitam informações de quadros.

9. Fotos coloridas, quando imprescindíveis, a critério da Comissão Editorial serão, também, aceitas. Os custos adicionais deverão ser cobertos pelos autores.

10. Para publicação de artigos na RBCS serão cobrados por página editorada (forma final na Revista): para sócios da SBCS (primeiro autor e, ou, autor correspondente) R\$ 25,00, até oito páginas, e R\$ 50,00 por página adicional, para não-sócios (primeiro autor e, ou, autor correspondente): R\$ 50,00 por página até oito páginas e R\$ 100,00 por página adicional.

Envio de manuscritos

Os trabalhos submetidos à publicação somente poderão ser enviados por correio eletrônico, acessando o site www.sbcs.org.br (E-mail: autores@sbcs.org.br), e não mais em papel