

ZILDA MACHADO DE OLIVEIRA

**RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE
CRESCIMENTO VEGETAL ISOLADAS DE CANA-
DE-AÇÚCAR SOB FERTILIZAÇÃO ORGÂNICA
E/OU CONVENCIONAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor.

**São Paulo
2009**

ZILDA MACHADO DE OLIVEIRA

**RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE
CRESCIMENTO VEGETAL ISOLADAS DE CANA-
DE-AÇÚCAR SOB FERTILIZAÇÃO ORGÂNICA
E/OU CONVENCIONAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor.

Orientadora:
Profa. Dra. Heloiza Ramos Barbosa

**São Paulo
2009**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Oliveira, Zilda Machado.

Rizobactérias promotoras de crescimento vegetal, isoladas de cana-de-açúcar sob fertilização orgânica e/ou convencional. / Zilda Machado Oliveira. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Heloíza Ramos Barbosa.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Fisiologia de microrganismos.

Versão do título para o inglês: Rhizobacteria plant growth promoting isolated from sugar cane under organic and/or conventional fertilization.

Descritores: 1. Rizobactéria 2. Cana-de-açúcar 3. Nitrogenase 4. Fosfato 5. AIA 6. Promoção crescimento de planta I. Barbosa, Heloiza Ramos II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0150/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Zilda Machado Oliveira.

Título da Tese: Rizobactérias promotoras de crescimento vegetal, isoladas de cana-de-açúcar sob fertilização orgânica e/ou convencional.

Orientador(a): Heloíza Ramos Barbosa.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

AGRADECIMENTOS

- A Deus pelo cumprimento de sua palavra.
- A Professora Dra. Heloiza Ramos Barbosa, por ser mediadora do conhecimento, fazendo assim, que eu alcançasse este objetivo.
- As Professoras Dras. Cristina Cruz e Sandra Chaves, pelo acolhimento, amizade, e aprendizado em seus laboratórios de Lisboa.
- A Professora Dra. Eny Floh pela atenção, e por colocar a minha disposição os equipamentos de seu laboratório.
- Aos Professores Drs. do ICB II: Gabriel Padilha, Flávio Althertum, Carlos Winter, Carlos F. M. Menk, Irmã Rivera, Claudete de Paula, Benedito Correa, José Gregório Gomez e Elizabete Vicente, por estarem sempre dispostos a tirar minhas duvidas e me auxiliarem nas soluções dos problemas.
- As técnicas de Laboratório Íris, Leonor, Rosa e Amanda, pela ajuda, orientação e amizade.
- Aos colegas do Laboratório de Microbiologia, aos que estão e aos que já passaram.
- As meninas da secretaria, Alice, Aninha e Naíde.
- A CAPES pela bolsa concedida.
- A FAPESP pelo auxílio financeiro ao Projeto.
- A minha família: queridas filhas, meus pais e irmãos, que me deram força, apoio, incentivo, compreensão e amor.
- Ao Ito, pela paciência, pelo carinho e atenção dispensada em todos os meus “chiliques”.

As coisas que não vemos são muito mais poderosas do que as que vemos. O que está embaixo do solo gera o que está em cima dele, o que é invisível cria o que é visível. Como seres humanos, não estamos acima da natureza, somos parte dela. Portanto, quando respeitamos as suas leis e cuidamos das nossas raízes a vida flui. É inútil concentrarmos a atenção nos frutos que já estão maduros. Não temos como mudar aqueles que já estão pendendo dos galhos, mas podemos modificar os que ainda vão nascer. Para isso, precisamos cavar a terra e reforçar as nossas raízes (**OS SEGREDOS DA MENTE MILIONÁRIA** - Eker, T. H. 2006).

RESUMO

OLIVEIRA, Z M. **Rizobactérias Promotoras de Crescimento Vegetal Isoladas de Cana-De-Açúcar Sob Fertilização Orgânica e/ou Convencional.** Tese - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Neste trabalho avaliamos o possível efeito da adubação (orgânica e convencional) sobre a fisiologia de bactérias da rizosfera da cana-de-açúcar. Para isto, selecionamos cinco gêneros rizobacterianos (*Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Pseudomonas*) prevalentes em canaviais e descritos como promotores de crescimento vegetal. As bactérias selecionadas foram isoladas e identificadas por meio de testes bioquímicos e por análise do seqüenciamento do gene 16S rDNA, e os parâmetros investigados foram: capacidade de redução de acetileno, produção de fitormônios (AIA e etileno), capacidade de solubilização de fosfato, excreção de aminoácidos, e antagonismo a fungos fitopatogênicos. As rizobactérias escolhidas demonstraram seu potencial como promotoras de crescimento vegetal. As linhagens do gênero *Burkholderia* foram as que se destacaram para a solubilização de fosfatos e antagonismo a fungos. As linhagens do gênero *Pseudomonas* se destacaram na produção de etileno e as linhagens do gênero *Beijerinckia*, na redução do acetileno, evidenciando grande capacidade de fixação de N₂. Os gêneros *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Pseudomonas*, foram os melhores produtores de AIA. *In vitro* não detectamos a influência da adubação (tratamento de origem), exceto para a solubilização de fosfato inorgânico, pois nossos resultados mostraram que as bactérias oriundas do tratamento orgânico onde o P era abundante não evidenciaram potencial para solubilização de P inorgânico. Entretanto, *in vivo* é possível que a adubação orgânica, juntamente com a rizosfera, potencialize e controle esses fenótipos bacterianos promotores de crescimento em plantas. Nossos resultados evidenciaram o grande potencial dessas bactérias como ferramentas naturais para a sustentabilidade da cultura, que visa reduzir custos, promover eficiência e aumento da produtividade.

Palavras-Chave: Cana-de-açúcar. Adubação Orgânica. Rizobactérias. Nitrogenase. Fosfato. Aminoácidos. AIA. Etileno. Biocontrole.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Z M. **Plant Growth Promoting Rhizobacteria Isolated of Sugarcane Under Organic or Conventional Fertilization**. Tese - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

In this work we evaluated the possible effect of fertilization (organic and conventional) on the rhizobacteria physiology from the sugarcane. For that, we selected five rhizobacterial genera (*Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* and *Pseudomonas*) prevalent in sugarcane crops and described as plant growth promoters. The selected bacteria were isolated and identified by biochemical tests and by sequence analysis of the 16S rDNA gene, and the parameters investigated were: capacity of acetylene reduction, phytohormones production (IAA and ethylene), capacity of phosphate solubilization, amino acid release, and antifungal activity. The selected rhizobacteria showed their potential as plant growth promoters. The *Burkholderia* strains showed the better results in phosphate solubilization and antifungal activity. The *Pseudomonas* were prominent in the production of ethylene and *Beijerinckia* strains showed a greater N₂ fixation capacity. *Enterobacter*, *Klebsiella* and *Pseudomonas* strains were the better IAA producers. *In vitro*, the influence of the fertilization (treatment of the crop) was not detected, except for the inorganic phosphate solubilization. Our results showed that bacteria isolated from plants submitted to organic treatment, where phosphate was in excess, did not show potential for inorganic phosphate solubilization. However, *in vivo* it is possible that organic fertilization, together with the rhizosphere, improves and controls the growth promoting bacteria traits. Our results evidenced the great potential of these bacteria as natural tools for the culture sustainability, which it aims at to reduce costs, to promote efficiency and increase of the productivity.

Key words: Sugarcane. Organic fertilization. Rhizobacteria. Nitrogenase. Phosphate. Amino acids. IAA. Ethylene. Biocontrol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Biossíntese do ácido 3 indol acético (AIA).	43
Figura 2: Percentual de bactérias isoladas de solos com os diferentes tipos de tratamentos.	64
Figura 3: Eficiência da extração de DNA genômico.	72
Figura 4: Análise do produto de amplificação do gene 16S rDNA de alguns isolados.	73
Figura 5: Árvore filogenética das linhagens <i>Beijerinckia</i> sp.e <i>Pseudomonas</i> sp.	77
Figura 6 : Árvore filogenética das linhagens <i>Klebsiella</i> sp. e <i>Burkholderia</i> sp.	78
Figura 7: Árvore filogenética das linhagens <i>Enterobacter</i> sp.	78
Figura 8: Perfil da curva de crescimento de crescimento e atividade da enzima nitrogenase das linhagens <i>Beijerinckia</i> sp.	81
Figura 9: Perfil da curva de crescimento de crescimento e atividade da enzima nitrogenase de uma estirpe da linhagem <i>Burkholderia</i> sp.	81
Figura 10: Perfil da curva de crescimento de crescimento e atividade da enzima nitrogenase de uma estirpe da linhagem <i>Enterobacter</i> sp.	82
Figura 11: Perfil da curva de crescimento de crescimento e atividade da enzima nitrogenase de uma estirpe da linhagem <i>Klebsiella</i> sp.	82
Figura 12: Perfil da curva de crescimento de crescimento e atividade da enzima nitrogenase de uma estirpe da linhagem <i>Pseudomonas</i> sp.	83
Figura 13: Análise do produto de amplificação do gene <i>nifH</i> .	85
Figura 14: Concentrações de aminoácidos liberados pela linhagem <i>Beijerinckia</i> .	86
Figura 15: Concentrações de aminoácidos liberados pela linhagem <i>Burkholderia</i> .	86
Figura 16: Concentrações de aminoácidos liberados pela linhagem <i>Enterobacte</i> .	86
Figura 17: Concentrações de aminoácidos liberados pela linhagem <i>Klebsiella</i> .	87
Figura 18: Concentrações de aminoácidos liberados pela linhagem <i>Pseudomonas</i> .	87
Figura 19: Solubilização de fosfato mostrada pelos halos em torno das colônias em placa de Petri	88
Figura 20: Média da produção de AIA pelas linhagens rizobacterianas.	91
Figura 21: Produção de etileno pelas linhagens rizobacterianas isoladas do controle.	93
Figura 22: Produção de etileno pelas linhagens rizobacterianas isoladas do tratamento orgânico.	93

Figura 23: Produção de etileno pelas linhagens rizobacterianas isoladas do tratamento convencional.	94
Figura 24: Percentual de antagonismo produzidos pelas linhagens rizobacterianas contra cinco fungos testados.	94
Figura 25: A- <i>R. solani</i> controle B- <i>R. solani</i> na presença de 3 rizobactérias diferentes C- <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> controle D- <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> na presença de 3 rizobactérias diferentes.	95
Figura 26: Ácido 3-indol acético e ácido 3-indol butírico, respectivamente.	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição dos meios de cultura LGD, LGI, LG, NFb, JNFb e JMV.	50
Tabela 2: Meio MS pH 7, 0 (Murashige e Skoog, 1962).	51
Tabela 3: Reações testadas no kit API-20E para enterobactérias	56
Tabela 4: Reações testadas no kit Api 20NE para não enterobactérias.	57
Tabela 5: Números de colônias diferentes obtidos em meios de cultura seletivos.	65
Tabela 6: Características bioquímicas e fisiológicas das rizobactérias oriundas do controle.	66
Tabela 7: Características bioquímicas e fisiológicas das rizobactérias oriundas do tratamento orgânico.	67
Tabela 8: Características bioquímicas e fisiológicas das rizobactérias oriundas do tratamento convencional.	68
Tabela 9 - Perfil bioquímico das RBFN controle segundo o sistema API-20E.	69
Tabela 10: Perfil bioquímico das RBFN controle segundo o sistema API-20 NE.	69
Tabela 11: Perfil bioquímico das RBFN do tratamento Orgânico segundo o sistema API-20E.	70
Tabela 12: Perfil bioquímico das RBFN do tratamento Orgânico segundo o sistema API-20 NE.	70
Tabela 13: Perfil bioquímico das RBFN do tratamento Convencional segundo o sistema API20E.	71
Tabela 14: Perfil bioquímico das RBFN tratamento Convencional segundo o sistema API-20NE.	71
Tabela 15: Distribuição taxonômica das rizobactérias isoladas da cana-de-açúcar.	74
Tabela 16: Percentual de identidade e similaridade com as seqüências do GenBank .	75
Tabela 17: Atividade da enzima nitrogenase.	80
Tabela 18: Estirpes rizobacterianas e os respectivos oligonucleotídeos que amplificaram o gene <i>nifH</i>	84
Tabela 19: Solubilização de PO ₄ , pelas rizobactérias controle.	89
Tabela 20: Solubilização de PO ₄ , pelas rizobactérias tratamento orgânico	89
Tabela 21: Solubilização de PO ₄ , pelas rizobactérias tratamento convencional.	89
Tabela 22: Produção de AIA pelas rizobactérias controle	91
Tabela 23: Produção de AIA pelas rizobactérias oriundas do tratamento orgânico	91
Tabela 24: Produção de AIA pelas rizobactérias oriundas do tratamento convencional.	92
Tabela 25: Atividade pelas linhagens rizobacterianas oriundas do Controle.	96
Tabela 26: Atividade antifúngica pelas linhagens rizobacterianas oriundas do tratamento Orgânico.	97
Tabela 27: Atividade antifúngica pelas linhagens rizobacterianas oriundas do tratamento Convencional.	98

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Objetivos	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1.1 Cana-de-açúcar	18
2.1.2 Cana-de-açúcar e sua importância econômica para o Brasil	19
2.1.3 Fertilização	20
2.2 Rizobactérias Diazotróficas Promotoras de Crescimento Vegetal	24
2.2.1 Isolamento e identificação de Rizobactérias Diazotróficas	28
2.2.2 Taxonomia	29
2.2.3 Métodos fenotípicos e genotípicos de taxonomia	30
2.2.4 Estudos de homologia de rRNA	30
2.2.5 RNAs ribossomais	31
2.2.6 Taxonomia e filogenia de bactérias	32
2.3 Mecanismos de promoção de crescimento vegetal	32
2.3.1 Fixação biológica de nitrogênio atmosférico	32
2.3.1.1 Nitrogenase	34
2.3.1.2 Genes da fixação de nitrogênio	36
2.3.2 Liberação de Aminoácidos em Meio de Cultura	37
2.3.3 Solubilização de fosfato inorgânico (Pi).	39
2.3.4 Produção de fitormônios.	40
2.3.4.1 Liberação de Ácido-indol-acético (AIA)	40
2.3.4.2 Liberação de Etileno	44
2.3.5 Biocontrole	45

3 MATERIAL E MÉTODOS	49
3.1 Meios de Cultura e Soluções	49
3.2 Material Biológico	51
3.3 Tratamentos	52
3.4 Processo de Isolamento de Rizobactérias	52
3.4.1 Teste de redução de acetileno	53
3.4.2 Isolamento das colônias	53
3.4.3 Características das colônias	53
3.4.4 Coloração de Gram.	54
3.4.5 Preservação das bactérias	54
3.5 Identificação Bioquímica	54
3.5.1 Crescimento em meio TSI	54
3.5.2 Teste da catalase	54
3.5.3 Teste do citocromo oxidase	55
3.5.4 Teste para distinção do gênero Beijerinckia	55
3.5.5 Testes bioquímicos via sistemas API-20E e API-20NE	55
3.6 Identificação Molecular	57
3.6.1 Extração de DNA genômico	57
3.6.2 Amplificação do gene 16S rDNA	58
3.6.3 Purificação de produtos de PCR	58
3.6.4 Reação de sequenciamento do 16S rDNA	59
3.6.5 Tratamento das amostras após reação de sequenciamento	59
3.6.6 Análises das seqüências	59
3.6.7 Filogenia	60
3.7 Atividade específica da enzima nitrogenase	60

3.7.1 Detecção do gene <i>nifH</i>	60
3.8 Determinações de aminoácidos excretados ao meio pelas rizobactérias.	61
3.9 Solubilização do fosfato	61
3.10 Ácido-indol-acético (AIA)	62
3.11 Determinações de etileno liberado ao meio pelas rizobactérias.	62
3.12 Teste de antagonismo antifúngico.	62
3.13 Análise Estatística.	63
4 RESULTADOS	64
4.1. Isolamento de rizobactérias de cana-de-açúcar.	64
4.1.2 Coloração de Gram.	65
4.2 Características bioquímicas dos isolados.	65
4.3 Identificação fenotípica.	68
4.4 Caracterização molecular dos isolados	72
4.4.1 Análise da eficiência da extração do DNA genômico dos isolados.	72
4.4.2 Análise da eficiência da amplificação do gene 16S rDNA.	72
4.4.3 Sequenciamento parcial do gene 16S rDNA	73
4.4.4 Filogenia molecular	76
4.5 Atividade da enzima nitrogenase	79
4.5.1 Detecção do gene <i>nifH</i>	83
4.6 Liberação de aminoácidos em meio de cultura	85
4.7 Solubilização de fosfato inorgânico	87
4.8 Liberação de Fitormônios	90
4.8.1 Liberação de ácido-indol-acético (AIA)	90
4.8.2 Liberação de etileno	92

4.9 Atividade antagônica (antifúngica).	94
5 DISCUSSÃO	99
5.1 Isolamento das rizobactérias da cana-de-açúcar	99
5.2 Identificação das estirpes	100
5.2.1 Caracterização bioquímica das estirpes	100
5.2.2 Análises do Sequenciamento do gene 16S rDNA	101
5.2.3 Análises filogenéticas	101
5.3 Atividade específica da enzima nitrogenase	106
5.3.1 Detecção do gene <i>nifH</i>	109
5.4 Excreção de aminoácidos	110
5.5 Solubilização de fosfato	112
5.6 Produção de fitormônios	115
5.6.1 Produção de ácido-indol-acético	115
5.6.2 Produção de etileno	117
5.7 Antagonismo a fungos	119
6 CONCLUSÕES	123
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124
GLOSSÁRIO	154
ANEXOS	155
Anexo A - Tabela A.1 - Meios seletivos e os gêneros que nestes foram isolados.	155
Anexo B - Gráficos da atividade específica da enzima nitrogenase	156
B.1 Linhagem <i>Beijerinckia</i>	156
B.2 Linhagem <i>Burkholderia</i>	157
B.3 Linhagem <i>Enterobacter</i>	159
B.4 Linhagem <i>Klebsiella</i>	161

B.5 Linhagem <i>Pseudomonas</i>	162
Anexo C – Tabela C.1 - Número de gerações das rizobactérias	165

1. INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar apresenta grande importância econômica para o Brasil e o mundo. No Brasil ela é cultivada em 6,5 milhões de hectares, cuja safra 2008/09 foi estimada em 710 milhões de toneladas, com produção de 27 bilhões de litros de álcool. O custo com fertilização e defensivos agrícolas em 2008 foi em torno de 8,3 bilhões de dólares. É uma cultura em expansão e, segundo dados do IBGE, nos próximos seis anos, tende a aumentar mais de 50%. A expansão da cultura não consiste apenas em ampliar a área de produção, mas aumentar a produção em área já cultivável. O Brasil tem investido em tecnologia. Por exemplo: o desenvolvimento de novos cultivares (variedades adaptadas às diferentes condições brasileiras). No entanto, existem condições básicas obrigatoriamente necessárias para suprir os vegetais de qualquer tipo de cultura e solo.

Os fertilizantes químicos (sintéticos) há muito tempo têm exercido papel importante no desenvolvimento, entretanto também tem gerado conseqüências associadas a impactos ambientais, como a contaminação química de solos e de águas, contribuindo para alteração do clima na terra, além de demandar altos custos. Os resíduos orgânicos originados do setor sucroalcooleiro, se corretamente manejados, revertem-se em fornecedores de nutrientes para melhoramento das condições físicas, químicas e biológicas do solo, e podem ser uma alternativa aos fertilizantes químicos. A sustentabilidade de sistemas agrícolas pode ser definida como “o manejo adequado dos recursos para satisfazer as necessidades do homem, mantendo ou melhorando a qualidade do ambiente e os recursos naturais”.

Neste contexto os microrganismos estão diretamente associados 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, sendo de grande interesse agrônomo, particularmente no que se refere à agricultura orgânica. Uma forma de ampliar os conhecimentos sobre benefícios da adubação orgânica consiste no estudo de alguns parâmetros que revelem as conseqüências advindas da aplicação do tratamento. As rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs) vivem na rizosfera, ou seja, na região do solo sob influência da raiz e interferem positivamente no crescimento das plantas. Se dotadas da capacidade de fixar nitrogênio, as rizobactérias se tornam uma ferramenta poderosa para estudos que buscam aumentar e consolidar os conhecimentos a respeito dos processos interativos entre bactérias-planta, bem como para avaliar as conseqüências do tratamento (adubação) dos solos. As rizobactérias podem conferir às plantas: maior resistência a condições de estresse, alterações nas condições fisiológicas, proteção contra organismos patogênicos, e promoção de crescimento diretamente pela produção de

fitormônios, aumento da disponibilidade de nutrientes pela fixação assimbiótica de nitrogênio, solubilização de fosfato, dentre outros.

Os efeitos da adubação foram avaliados sobre as características fisiológicas de cinco gêneros diazotróficos: *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Pseudomonas*, selecionados por apresentarem prevalência em rizosfera de canaviais e reconhecidos por pertencerem ao grupo das Rizobactérias Promotoras de Crescimento Vegetal (RPCV). Constituem uma “amostra” da microbiota, passível de sofrer alterações e de fornecer importantes dados experimentais.

Os parâmetros utilizados no presente trabalho, que caracterizam a importância ecológica dessas bactérias, foram: atividade da nitrogenase, excreção de aminoácidos, produção de fitormônios (etileno e ácido 3-indol acético), solubilização de fosfatos e produção de substâncias antifúngicas.

1.1 Objetivos

Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivos:

- Isolar e identificar cinco gêneros rizobacterianos: *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Pseudomonas* de cana-de-açúcar submetida a fertilização orgânica, convencional e sem tratamento (controle).
- Avaliar suas potencialidades como promotores de crescimento vegetal: capacidade de fixação de nitrogênio, produção de fitormônios (AIA e etileno), solubilização de fosfato, excreção de aminoácidos e de produção de substâncias antifúngicas.
- Avaliar os efeitos da adubação orgânica sobre as potencialidades rizobacterianas acima especificadas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1.1 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta que pertence ao gênero *Saccharum*. Há pelo menos seis espécies do gênero, sendo que a cana-de-açúcar cultivada é um híbrido multiespecífico, recebendo a designação *Saccharum* spp. É uma planta da família *Poaceae*, representada pelo milho, sorgo, arroz e muitas outras gramíneas (CESNIK e MIOCQUE, 2004).

A cana é originária do sudeste da Ásia, onde é cultivada desde épocas remotas. A exploração canavieira assentou-se, no início, sobre a espécie *Saccharum officinarum*, e o surgimento de várias doenças e de tecnologias mais avançadas exigiram a criação de novas variedades, as quais foram obtidas pelo cruzamento da *S. officinarum* com as outras quatro espécies do gênero *Saccharum* e, posteriormente, através de recruzamentos com as ascendentes (CRISPIM, 2006).

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, seguido pela Índia e Austrália. Na média, 55% da cana brasileira são destinados à produção de álcool, e 45% açúcar. As perspectivas para o setor são animadoras, em médio prazo, devido à possível quebra dos subsídios do açúcar europeu e da conquista de novos mercados consumidores (COSTA e BURNQUIST, 2006). Aliado a isso, é crescente a preocupação da sociedade mundial em relação às condições do ambiente, a qual vem exercendo pressão sobre o uso de combustíveis fósseis responsáveis pela emissão de gases poluentes na atmosfera. Vários países estão buscando reduzir ao máximo o uso desses combustíveis, seja pela substituição do produto, seja pela adição de outros combustíveis nesses para diminuir sua carga poluidora. Das culturas usadas para produção industrial de etanol, a cana-de-açúcar, principalmente a brasileira, tem destaque no cenário internacional pela sua alta produtividade e eficiência fotossintética no ambiente tropical, o que lhe garante superioridade na competição com outras gramíneas, como exemplo: vantagem sobre o álcool de milho (RODRIGUES, 2004; FRANCO, 2008).

2.1.2 Cana-de-açúcar e sua importância econômica para o Brasil

A cultura de cana-de-açúcar estabeleceu no Brasil ciclos de grande importância econômica e social, pois é fonte de energia renovável e gera divisas para o país. O agronegócio sucroalcooleiro fatura, direta e indiretamente, cerca de R\$ 40 bilhões por ano, o que corresponde a aproximadamente 2,35% do PIB nacional. É, também, um dos setores

que mais empregam no país, com mais de 3,6 milhões de empregos diretos e indiretos, reunindo mais de 72.000 agricultores. O Brasil é o principal país do mundo a implantar, em larga escala, um combustível renovável alternativo ao petróleo. A expansão do mercado mundial de açúcar e álcool tem estimulado o aumento do investimento no setor em todo o país [Departamento Intersindical de Estatística e Estudos Socioeconômicos (DIEESE, 2007)].

O Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE) concluiu o levantamento da área cultivada com cana-de-açúcar nos principais estados produtores da região centro-sul na safra 2008/09. Os dados do projeto Canasat, baseados em imagens de satélites, mostram que foram cultivados 917,9 mil hectares a mais do que na safra anterior, o que corresponde a um aumento de 15,7%. A área total foi estimada em 6,53 milhões de hectares. Maior produtor de cana-de-açúcar, o Estado de São Paulo possui 4,45 milhões de hectares disponíveis para colheita, o que representa 66% de toda a área cultivada na região centro-sul. Em relação à safra anterior, São Paulo registrou crescimento de 12,2% , ou seja, 483,3 mil hectares (www.dsr.inpe.br/canasat).

O setor possui grande importância econômica, social e ambiental, sendo grande gerador de ocupação no meio rural, com geração de divisas e produção de energia renovável e limpa. Mundialmente, o álcool é reconhecido pelas suas vantagens ambientais, sociais e econômicas e vem despertando o interesse de países desenvolvidos na tecnologia deste combustível (UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA DE AÇÚCAR e UNIÃO DOS PRODUTORES DE BIOENERGIA, 2008).

A produção agrícola brasileira de cana-de-açúcar, provavelmente, acompanhará o crescimento da demanda mundial por açúcar e álcool. A safra de 2008/09 foi estimada em 710.280 milhões de toneladas, com produção de 27 bilhões de litros de álcool (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2009).

Essa produtividade ainda está distante do potencial produtivo dos cultivares plantados em solo brasileiro, o que faz com que as pesquisas se direcionem para solucionar as causas desse déficit produtivo. As maiores limitações do meio à produtividade da cana-de-açúcar, nas regiões canavieiras do Brasil, não se relacionam à radiação solar, à temperatura ou à água, mas à disponibilidade de quantidades adequadas de nutrientes minerais nos solos, com destaque ao nitrogênio (TRIVELIN, 2000).

A maior parte de toda fertilização usada na agricultura brasileira é importada equivalendo a elevados custos. Em 2008 o custo com fertilização e defensivos agrícolas foi em torno de 8,3 bilhões de reais. Novas alternativas têm sido procuradas, como exemplo: o

uso de bactérias diazotróficas promotoras de crescimento vegetal, o uso de resíduos derivados da indústria e da agricultura, dentre outros (PERIN et al., 2007).

2.1.3 Fertilização

A agricultura, em conjunto com outros elementos tais como água, energia, saúde e biodiversidade, tem uma função de grande relevância na conquista do desenvolvimento sustentado. Fertilizantes “químicos”, “artificiais” ou “sintéticos”, por sua vez, têm desempenhado, por mais de 150 anos, um papel fundamental no desenvolvimento da agricultura e no atendimento das necessidades nutricionais de uma população continuamente crescente. De fato, os fertilizantes podem ser responsáveis por cerca de um terço até metade da produção agrícola (BROWN, 1995).

O uso de fertilizantes é prática agrícola regular na maioria dos países da Europa, desde a metade do século dezenove, mas aumentos sensíveis do consumo nesses países ocorreram nas três décadas após a Segunda Guerra Mundial. O aumento de consumo nos países em desenvolvimento começou nos anos sessenta. Nesta década, 87% do consumo mundial de fertilizantes ocorreram nos países desenvolvidos, incluindo a União Soviética e os países da Europa. A principal função dos fertilizantes é suplementar a disponibilidade de nutrientes naturais do solo com a finalidade de satisfazer à demanda de culturas que apresentam um alto potencial de produtividade, tornando, destarte, as produções economicamente viáveis (PUGGINA, 2000).

Três dos nutrientes têm sido usados em grandes quantidades: nitrogênio, fósforo e potássio. Enxofre, cálcio e magnésio também são necessários em quantidades substanciais. Esses nutrientes são constituintes de muitos componentes das plantas, tais como proteínas, ácidos nucléicos e clorofila, e são essenciais para processos tais como obtenção e transferência de energia, manutenção da pressão interna e ação enzimática (MALAVOLTA, 1980).

O problema atual, relacionado ao N, é a grande ineficiência no seu uso. Decorrente disso ocorre várias perdas ao longo dos sistemas de produção, e seu destino é o meio ambiente. O solo, os lençóis de água e a atmosfera podem ser atingidos diretamente por esses produtos. O nitrogênio perdido por lixiviação chega aos rios, riachos e reservas de águas subterrâneas. Nas águas superficiais, o excesso de N causa o fenômeno da eutrofização, que é um aumento vigoroso de algas. As conseqüências são as reduções da quantidade de oxigênio dissolvido na água, alterações no sabor e odor e a liberação de toxinas produzidas

por algumas espécies de algas. Ao cessar essa produção maciça, as algas morrem e inicia-se o processo de decomposição e ocorre aumento na concentração da matéria orgânica e formação de compostos prejudiciais à saúde humana (DAVIDSON et al., 2007; TUNDISI, 2003).

As perdas por desnitrificação contribuem de forma efetiva para o efeito estufa e à depleção de ozônio na estratosfera. Os solos são a principal fonte global de N_2O , respondendo por cerca de 65% de todas as emissões, resultantes de processos microbianos. O óxido nitroso é um dos gases mais importantes na causa do efeito estufa. Ele pode absorver a radiação solar ao invés de permitir que o calor irradie para longe da terra. O óxido nitroso é considerado prejudicial à camada de ozônio. De acordo com peritos do *Intergovernmental Panel on Climate Change* [IPCC] (2001), o óxido nitroso é responsável por 7,5% do efeito estufa, calculado como decorrente da atividade humana. Sua concentração na atmosfera está aumentando a uma taxa de cerca de 0,2% por ano. O nitrogênio, na forma de amônia, também pode reagir na atmosfera com óxidos de enxofre para formar sulfato de amônio que chega ao solo com a chuva, causando acidificação. Fertilizantes nitrogenados podem ser fontes diretas ou indiretas de emissões de N_2O ; o IPCC assume, atualmente, um fator médio de emissão de N_2O do fertilizante nitrogenado de 1,25%, mas com uma amplitude de variação de nove vezes, ou seja, de 0,25 a 2,25%. Em geral, é provável que estratégias de manejo da adubação, que aumentem a eficiência de absorção de N pelas culturas, reduzam as emissões de N_2O para a atmosfera (BOCKMAN e OLFS, 1998; SMITH et al., 1997).

As perdas de nitrogênio para a atmosfera na forma de amônia, após a aplicação de uréia podem chegar a 20% ou mais. As perdas acontecem motivadas pela prática de plantio direto e/ou cultivo mínimo, pois a aplicação superficial de uréia aumenta as perdas. Estas podem ser ainda maiores, até 40% ou mais, sob condições tropicais, observadas em arroz inundado e em culturas perenes como: banana, cana-de-açúcar, dendê e seringueira (KORNDÖRFER e MOTTA, 1997).

O fósforo em corpos de água doce é normalmente um nutriente limitante, e mesmo concentrações muito baixas podem causar problemas de eutrofização. Águas superficiais podem ser enriquecidas com P de fontes pontuais (ex: tratamento de esgotos) ou fontes difusas (ex: áreas sob agricultura). Como a quantidade de P das fontes pontuais diminuiu em anos recentes, a contribuição percentual de fontes difusas aumentou. Mesmo que pequenas quantidades de P sejam perdidas do solo (menos de 1 kg de P_2O_5 hectare/ano) podem manter a concentração de P na água de drenagem, em níveis capazes de causar

problemas ambientais. Ignorando a remoção pelas culturas, os caminhos primários de perda de fósforo do solo são a erosão (vento e água) e o escoamento superficial (PUGGINA, 2000).

Até há alguns anos, acreditava-se que o fosfato (e potássio) acumulado no solo se tornava não disponível para as plantas, inerte e, conseqüentemente, em formas não utilizáveis. Houve, entretanto, uma mudança de percepção em anos recentes, pois experimentos mostraram que, em muitos solos, as reservas de P e K disponíveis para as plantas podem se acumular com o passar dos anos. Solos enriquecidos com estas reservas produziram mais do que aqueles sem as reservas, contudo não há razão para acumular esses resíduos desnecessariamente. Assim, existem concentrações ideais de fósforo e potássio, as quais, sendo baixas, resultam em diminuições apreciáveis no rendimento, representando uma perda financeira para o agricultor. Acumular P e K no solo acima de um nível ideal é um custo desnecessário para o agricultor. Isso pode representar, também, um risco ambiental, visto que o solo perdido por erosão hídrica ou eólica dispersa os nutrientes deste em ribeirões, rios e lagos (JOHNSTON, 1997). Pesquisas adicionais são necessárias para o estabelecimento de níveis ideais para diferentes condições, bem como para melhorar a absorção de P e K pelas plantas.

O fósforo apresenta efeitos diretos e indiretos sobre a vegetação. Seu aumento tem efeito positivo na quantidade e qualidade das produções agrícolas (efeitos diretos). Através dos efeitos das interações indiretas, o fósforo aumenta as respostas do nitrogênio e do potássio nas produções agrícolas e tem efeitos positivos na fixação de de nitrogênio, na manutenção da matéria orgânica, na capacidade de retenção de umidade, no controle da erosão e em outras propriedades físicas e químicas do solo. Todos esses efeitos positivos resultam em aumento da produção agrícola, produtividade contínua e conservação do solo (BANNANTE, 1998).

O aproveitamento integral e racional de todos os recursos disponíveis aumenta a estabilidade dos sistemas de produção existentes, bem como maximiza a eficiência dos mesmos, reduzindo custos e melhorando a produtividade. A associação dos diversos componentes em sistemas integrados, que preservem o meio ambiente, estabelece o princípio da reciclagem: o resíduo passa a ser insumo no sistema produtivo. A cultura da cana-de-açúcar dá origem a vários tipos de resíduos orgânicos, os quais, corretamente manejados e utilizados, revertem-se em fornecedores de nutrientes para melhoramento das condições físicas, químicas e biológicas do solo. Quando inadequadamente manuseados e

tratados, constituem fonte de contaminação e agressão ao meio ambiente, especialmente quando direcionados para os mananciais hídricos (ZUURBIER e VOOREN, 2008).

A vinhaça é um resíduo gerado na produção do álcool, produzida em grande quantidade pela indústria sucroalcooleira. Para cada litro de álcool são produzidos cerca de 10 a 18 litros de vinhaça, com diferentes concentrações de potássio, de acordo com o material de origem. A vinhaça ajuda na adubação, pois é uma excelente fonte de potássio, além de fornecer água em períodos secos (ROSSETO, 1987).

A torta de filtro é proveniente da filtração do caldo extraído das moendas no filtro rotativo na produção do açúcar. É uma importante fonte de fósforo e cálcio. A cada tonelada de cana processada para a fabricação de açúcar, são produzidos em média 35 kg de torta de filtro. Com o uso direcionado desses resíduos, o agricultor pode aumentar sua margem de lucro e ainda ajudar na conservação do meio ambiente. Por ser um resíduo rico em fósforo, sua aplicação no sulco de plantio pode substituir a adubação fosfatada mineral. Além disso, apresenta cerca de 1,5% de nitrogênio na matéria seca, dispensando a adubação nitrogenada (VITTI et al., 2005).

A utilização de compostos orgânicos, além de disponibilizar nutrientes ao solo, ainda melhora suas condições físicas, aumentando a capacidade de retenção de água e potencializando o metabolismo microbiano. Assim, a microbiota sendo favorecida, contribuirá para o crescimento da planta (PEACOCK et al., 2001).

As bactérias que vivem na rizosfera, ou seja, na região do solo sob influência das raízes, são capazes de promover o crescimento das plantas numa relação não simbiótica, trazem benefícios diretos para a produção agrícola e, ao mesmo tempo, uma alternativa de cultivo com menor uso de insumos agrícolas (SCHROTH e HANCOCK, 1982). A promoção de crescimento pode ser o resultado de diversos mecanismos como: controle biológico pela competição por nutrientes com o patógeno; produção de antibióticos; resistência induzida a doenças; promoção de crescimento diretamente pela produção de fitormônios e aumento da disponibilidade de nutrientes pela fixação de nitrogênio ou solubilização de fósforo (KLOPPER, 1993; NEHL et al., 1996; WHIPPS, 2001).

2.2 Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas

Rizosfera é a zona do solo ao redor da raiz que se encontra sob influência imediata do sistema radicular. Essa zona é rica em nutrientes, devido ao acúmulo de uma variedade de compostos orgânicos liberados pelas raízes por exsudação, e deposição. O crescimento e

atividade microbianos são intensos na rizosfera, porque os compostos orgânicos liberados pelas raízes podem ser utilizados como fonte de energia e carbono. Bactérias que se associam às plantas, colonizando suas raízes, são denominadas rizobactérias, e podem ser classificadas de acordo com seus efeitos sobre o crescimento vegetal: benéficas, deletérias ou neutras (DOBBELAERE et al., 2003).

Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs) formam um grupo heterogêneo de bactérias, que, em superfícies da raiz e em colaboração com as raízes, que podem promover o crescimento da planta. Nas últimas décadas, bactérias que incluem espécies de *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, tem sido reportadas por promover o crescimento de plantas (KLOEPPER et al., 1991; OKON e LABANDERA-GONZALES, 1994; GLICK, 1995).

A promoção direta do crescimento por RPCPs envolve fornecimento de substâncias promotoras de crescimento vegetal, que são sintetizadas por bactérias ou pela facilitação da tomada de determinados nutrientes de planta do ambiente. Os mecanismos exatos pelo quais as RPCPs promovem o crescimento de planta não são totalmente compreendidos, mas elas podem produzir consideráveis concentrações de reguladores de crescimento de planta como o ácido-indol-acético, giberelinas, citocininas, etileno, aminoácidos (ARSHAD e FRANKENBERGER, 1993; GLICK, 1995; GONZÁLEZ-LÓPEZ, 2005), fixação assimbiótica de nitrogênio (BODDEY e DÖBEREINER, 1995), solubilização de fosfato mineral e outros nutrientes (DE FREITAS et al., 1997; GAUR, 1990). Além disso, RPCPs são importantes agentes de controle biológico, pois podem suprimir microrganismos patogênicos na rizosfera, pela produção de β -1,3-glucanase (FRIDLENDER et al., 1993), antibióticos (RAAIJMAKERS et al., 1997), ácido cianídrico (OWEN e ZDOR, 2001) e sideróforos (PIDELLO, 2003). Sideróforos são compostos de baixo peso molecular, quelantes de ferro, produzidos pelas bactérias sob condições limitantes desse elemento (NEILANDS et al., 1984). A promoção de crescimento de plantas pela diminuição da incidência de doenças pode ocorrer pela inibição direta do crescimento do patógeno (OWEN e ZDOR, 2001) e pela indução de resistência sistêmica (FRIDLENDER et al., 1993; NANDAKUMAR et al., 2001), entre outras maneiras.

Em adição a essas características, linhagens de RPCPs têm que ter capacidade de sobreviver e colonizar o solo rizosférico (CATTELAN et al., 1999).

Estirpes isoladas de uma espécie vegetal são mais aptas a se restabelecerem nas raízes da mesma espécie vegetal, após inoculação, sendo denominadas de estirpes homólogas (BALDANI e BALDANI, 2005).

Pesaro e Widmer (2006) demonstraram que as populações de bactérias promotoras de crescimento pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, no solo, sob uma cultura de trigo, diferiram das populações encontradas sob uma cultura de trevo. Também, Germida et al. (1998) observaram que os grupos de bactérias encontrados dentro das raízes de plantas de canola não ocorriam nas plantas de trigo cultivadas na mesma localidade. Existe um consenso geral de que o genótipo da planta é um fator chave para obtenção dos benefícios propiciados por bactérias diazotróficas (REIS et al., 2000).

Miranda et al. (1990), utilizando 24 genótipos de *Panicum maximum*, demonstraram que as plantas diferiam quanto à capacidade de obter N pela fixação biológica, provavelmente, devido a diferenças dos genótipos na capacidade de associação com bactérias diazotróficas. Bhattarai e Hess (1998) também observaram que diferentes genótipos de trigo diferiram quanto ao aumento de produtividade propiciado por isolados de bactérias do gênero *Azospirillum* e que os maiores benefícios foram obtidos com genótipo e bactéria oriundos da mesma localidade.

O gênero *Beijerinckia* é uma diazotrófica de ocorrência em diversos estados brasileiros (Rio de Janeiro, São Paulo, Pernambuco, Paraná, etc). Foram as primeiras a serem reconhecidas como diazotróficas de vida livre (DÖBEREINER e RUSCHEL, 1958). São aeróbias, quimioheterotróficas, podendo crescer em solos ácidos (pH 3,0 e 4,0) (BECKING, 1991). Döbereiner (1959) coletou amostras em diferentes regiões do Brasil e mostrou a ocorrência predominante deste gênero em solos cultivados com cana-de-açúcar. Estas bactérias colonizam preferencialmente o rizoplane e a rizosfera de plantas de cana-de-açúcar, onde os exsudados, principalmente açúcares, estão envolvidos nesta associação. A quantificação de BFN (bactérias fixadoras de nitrogênio) na cana-de-açúcar baseada em dados da atividade do nitrogenase indicou uma contribuição significativa de N ao sistema de solo/planta (DÖBEREINER et al., 1973 apud BALDANI e BALDANI, 2005).

Esta bactéria é capaz de excretar grande variedade de aminoácidos assim como substâncias nitrogenadas reguladoras do crescimento vegetal (poliaminas e ácido 3-indol acético) ou não nitrogenadas [etileno] (THULER et al., 2003a). Também foi demonstrada a capacidade de armazenamento de substâncias nitrogenadas (MIYASAKA et al., 2003).

Klebsiella e *Enterobacter* da família *Enterobacteriaceae* são anaeróbias facultativas que fixam nitrogênio, porém requerem compostos nitrogenados para crescerem sob condições estritamente anaeróbias. Entretanto, as condições para fixação de N₂ em *K. pneumoniae*, descritas por Mahl et al. (1965), revelaram que quando o nitrato está presente no meio de cultura, este pode ser utilizado como aceptor final de elétrons da cadeia

respiratória, permitindo, dessa forma, a geração de energia suficiente para o processo de FBN (MARIN et al., 1999). Esses gêneros produzem fitormônios como AIA (RYU e PATTEN, 2008) e solubilizam fosfato (KIM et al., 1997). Segundo Baldani et al. (1997), a função das bactérias de vida livre na associação com as gramíneas é uma questão que ainda requer esclarecimento.

O gênero *Pseudomonas* é constituído de espécies que possuem uma grande diversidade metabólica e propriedades patogênicas. Este gênero tem sido extensamente revisto nos últimos 10 anos, sendo que várias espécies foram renomeadas, como é o caso de *Pseudomonas cepacea*, que formalmente era incluída no grupo II de homologia do rRNA de *Pseudomonas*, e agora é reconhecida como *Burkholderia* (PALLERONI, 1993).

A maioria do grupo II rRNA de *Pseudomonas* pertence à subclasse Beta de *Proteobacteria* e foi transferida para o novo gênero *Burkholderia* (YABUUCHI et al., 1992; URAKAMI et al., 1994; TRAN VAN et al., 1994; GILLIS et al., 1995), com base na sua composição celular, seqüenciamento do 16S rRNA, homologia DNA:DNA e características fenotípicas (YABUUCHI et al., 1992; YOHALEM e LORBEER, 1997). Esta bactéria foi originalmente descrita como agente causal da podridão mole em cebola (BURKHOLDER, 1950) e tem sido encontrada em diferentes tipos de solos e raízes. Atualmente esta bactéria é considerada de grande importância, pois é utilizada como controle biológico, por apresentar antagonismo a alguns fungos e patógenos de plantas existentes no solo (MCLOUGHLIN et al., 1992), assim como por degradar alguns pesticidas (JACOBSEN, 1997; MARS et al., 1996; PEÑALOZA-VAZQUEZ et al., 1995). Gillis et al. (1995) transferiram *P. andropogonis* e *P. cocovenenans* para o gênero *Burkholderia*, incluindo uma nova espécie *B. vietnamiensis* (TRAN VAN et al., 1994) para estirpes fixadoras de N₂ isoladas da rizosfera de arroz. Além disso, dois isolados do gênero *Burkholderia*, que fixam nitrogênio, foram obtidos de amostras de material humano e, de acordo com as características genéticas, foram incluídos na espécie *B. vietnamiensis*. Da mesma forma *B. cepacea* também foi isolada de pacientes com fibrose cística (GOLDMANN e KLINGER, 1986) e como contaminante de soluções empregadas em procedimentos hospitalares (BEVIVINO et al., 1994). Este microrganismo apresenta uma considerável versatilidade fisiológica incluindo atividade de pectinase (GONZALEZ e VIDAVER, 1979), biodegradação de pesticidas (CHATTERJEE et al., 1982; KARNS et al., 1983) e ampla resistência a antibióticos (SMIRNOV et al., 1982). Estudos de comparação fenotípica, entre estirpes de *Burkholderia cepacea*, isoladas de rizosfera e de ambientes hospitalares, revelaram que apenas os isolados de rizosfera foram capazes de

fixar nitrogênio, crescerem numa ampla faixa de temperatura, produzir ácido-indol-acético e sideróforos, além de apresentarem atividade antagônica contra vários fungos fitopatogênicos como *Fusarium* e *Rhizoctonia* (BEVIVINO et al., 1994). Estudos taxonômicos, conduzidos posteriormente, mostraram que uma das estirpes fixadoras de N₂, na realidade pertence à espécie *Burkholderia vietnamiensis*, que agrega um grande número de isolados de rizosfera de arroz (GILLIS et al., 1995). O outro isolado considerado fixador de nitrogênio foi confirmado como pertencente à espécie *B. cepacea*, porém não foi demonstrada a capacidade de fixar N₂ pela técnica de redução de acetileno (GILLIS et al., 1995). Outro aspecto intrigante no gênero *Burkholderia* refere-se a dois isolados obtidos de amostras de material humano, que fixam nitrogênio, e, de acordo, com as características genéticas foram incluídos na espécie *B. vietnamiensis* (GILLIS et al., 1995). Baldani (1996) descreveu uma série de isolados de mandioca (*Manihots sculentum*), batata-doce (*Ipomoeae batatas*), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) e arroz (*Oriza sativa*) como pertencentes a uma nova espécie do gênero *Burkholderia*, capaz de fixar N₂ em meio de cultura ácido (pH 4.0) e infectar raízes de arroz, sendo denominada de *B. brasilensis*. Oliveira et al. (1992) mostraram aumento de produção de grãos em plantas de arroz inoculadas com estirpe (M 130) dessa bactéria. Outros isolados de cana-de-açúcar não hibridizaram com a sonda desenvolvida para o grupo de *B. brasilensis* e podem vir a se constituir como uma nova espécie deste gênero (BALDANI, 1996).

O gênero *Pseudomonas* se destaca como promotor de crescimento vegetal. É um grupo de bactérias extremamente versáteis, sendo as mais estudadas dentro do grupo de rizobactérias capazes de promover o crescimento vegetal. Essas bactérias também são fortes competidoras na rizosfera pela variedade de substâncias que podem utilizar, havendo espécies do gênero em ambientes muito variados (NEHL et al., 1996; MISKO e GERMIDA, 2002).

Pseudomonas recebem especial atenção no meio científico, não só pela sua versatilidade metabólica, que lhes confere capacidade de se estabelecer, nos mais variados ambientes, pelo grande potencial de colonização radicular, mas também pela facilidade de cultivo *in vitro* e de manipulação genética (HAAS e KEEL, 2003). Sua atuação é relevante devido à capacidade de fixar nitrogênio atmosférico (HAAHTELA et al., 1983), de produzir fitormônios (HUSSAIN e VANCURD, 1970), de produzir poliaminas (GORIS et al., 1998), solubilização de fosfatos (RODRIGUEZ e FRAGA, 1999). Além de promoverem crescimento, atuam como agentes no controle biológico de várias pragas e doenças (MISKO e GERMIDA, 2002). Também foi demonstrado que algumas bactérias do

gênero *Pseudomonas* estimularam a nodulação de leguminosas por *Rhizobium* spp. e *Bradyrhizobium* spp. (GRIMES e MOUNT, 1987; POLONENKO et al., 1987). E ainda que isso não esteja diretamente ligado à sua atividade de promoção de crescimento, bactérias do gênero *Pseudomonas* já foram relatadas como eficientes na degradação de poluentes (YEE et al., 1998).

2.2.1 Isolamento e identificação de Rizobactérias Diazotróficas

Foi a partir das observações pioneiras de Döbereiner e Day (1975) de que o uso de meios semi-sólidos, sem N combinado, é a condição ideal para o isolamento de diazotróficos, pois são microaerófilos. Esse método tem sido empregado extensivamente no isolamento e caracterização de microrganismos fixadores associados a diferentes plantas e condições de clima e solo. Com o emprego de técnicas moleculares, estão sendo descritas novas espécies, associadas a diferentes vegetais, inclusive espécies de bactérias que dificilmente poderiam ser identificadas pelos métodos tradicionais dependentes de isolamento, por estarem presentes dentro dos tecidos vegetais em número reduzido de células (LODEWYCKX et al., 2002). Geralmente, são encontradas em maior número nas raízes (GOMES et al., 2005).

2.2.2 Taxonomia

Segundo Gevers et al. (2006) a taxonomia, é tradicionalmente dividida em três partes:

1. Classificação: ordenação dos organismos em grupos taxonômicos com base na similaridade entre eles.
2. Nomenclatura: rotulagem das unidades definidas na classificação.
3. Identificação dos organismos desconhecidos: determinações de quais organismos pertencem às unidades genômicas e ecológicas pré-existentes.

A espécie é a unidade básica da taxonomia bacteriana, definida como um grupo de estirpes, incluindo a estirpe tipo, que dividem 70% ou mais de hibridização DNA-DNA (WAYNE et al., 1987). Uma espécie é uma categoria que circunscreve um grupo de indivíduos (estirpes/isolados) coerentes genomicamente, que apresentam um alto grau de similaridade, em muitos aspectos independentes, testados comparativamente sob condições padronizadas (STACKEBRANDT et al., 2002). Análises de seqüências do gene que

codifica para o 16S rDNA são usadas para inferir relações filogenéticas entre espécies bacterianas, como critério mais utilizado: a homologia entre seqüências de 16S rDNA. Segundo Van Berkun et al. (2000) uma vantagem desta abordagem é que seqüências de DNA e produtos gênicos podem ser comparados em um contexto evolucionário (sistemática molecular). Uma opinião estabelecida é que a evolução de alguns genes de bactérias processa-se numa taxa constante por mutação e seleção darwiniana e que a história evolutiva do gene de 16S rRNA aproxima-se da história evolutiva do genoma total, tornando-se, desta forma, aceitável reconstruir relações evolucionárias entre bactérias a partir da divergência das seqüências entre seus genes de 16S rDNA (VAN BERKUN et al., 2000). Para avaliar a possibilidade de que genes de 16S rRNA em algumas bactérias pudessem ser produto de transferência lateral e eventos de recombinação Van Berkun et al. (2000) compararam filogenias de 16S rDNA e 23S rDNA para o mesmo conjunto de espécies bacterianas, obtendo topologias de árvores semelhantes. Desta maneira os autores concluíram que a transferência lateral não possui impacto na taxonomia bacteriana com relação a genes de rDNA.

2.2.3 Métodos fenotípicos e genotípicos de taxonomia

Todos os métodos não direcionados para as moléculas de DNA ou RNA são chamados métodos fenotípicos, mesmo os que se utilizam marcadores quimiotaxonômicos. Os métodos fenotípicos clássicos para tipagem bacteriana incluem a análise de características morfológicas (forma da célula ou da colônia), estruturais (coloração de Gram) e fisiológicas e bioquímicas: crescimento em fontes de carbono variadas, diferentes temperaturas, valores de pH, concentração de sal, condições atmosféricas etc (WOESE, 1987). Os métodos genotípicos de taxonomia, direcionados para moléculas de DNA ou RNA, são uma consequência do progresso tecnológico experimentado pela biologia molecular nas décadas recentes e atualmente dominam os estudos taxonômicos modernos (VANDAMME et al., 1996).

2.2.4 Estudos de homologia de rRNA

Os rRNA são tidos como o melhor alvo para se estudar relações filogenéticas, pois estão presentes em todas as bactérias, archaeas e eucariotos: são funcionalmente constantes e a maior parte da seqüência destes rRNAs é altamente conservada (WOESE, 1987; STACKENBRANDT e GOEBEL, 1994), sendo estas as principais características de um cronômetro molecular. Até alguns anos atrás não era possível se determinar seqüências de rRNA completas. Então, por mais de uma década os rRNAs foram caracterizados em termos de catálogos de oligonucleotídeos. Oligonucleotídeos curtos, de aproximadamente 20 bases eram produzidos por digestão de 16S rRNA com ribonuclease T1 (que cliva especificamente resíduos G). Uma coleção destes fragmentos de seqüências do rRNA constitui um catálogo de oligonucleotídeos: um padrão característico complexo e detalhado de uma espécie bacteriana (WOESE, 1987). A comparação entre estes catálogos permitia que agrupamentos filogenéticos fossem identificados (FOX, 1985). O catálogo era suficiente para definir a maior parte dos filos bacterianos, porém insuficiente para resolver as ordens e subdivisões, entre outras dificuldades. Atualmente esta técnica foi substituída pelo seqüenciamento direto do gene ou partes do gene 16S e 23S com técnicas de PCR e oligonucleotídeos iniciadores apropriados (VANDAMME et al., 1996).

2.2.5 RNAs ribossomais

Os ácidos ribonucléicos ribossomais (RNAr) são considerados os biopolímeros mais adequados para estudos de diversidade. Seus genes são universalmente distribuídos e apresentam elevado grau de conservação. Sua variabilidade pode apresentar-se em maior ou menor extensão, em diferentes regiões da molécula (LANE et al., 1985). Ao contrário de plantas e animais, bactérias possuem morfologias tão simples que não podem ser usadas para definir sua filogenia. A tecnologia de seqüenciamento de ácidos nucléicos hoje faz da filogenia bacteriana um problema tratável. De fato todas as relações filogenéticas podem agora ser determinadas muito mais facilmente e com muito mais detalhe e profundidade (LANE et al., 1985; QU et al., 1983). A informação genotípica, ou seja, a informação contida nas seqüências, é superior à informação fenotípica, que é tida como a base clássica para relacionar e classificar organismos, por duas razões: a informação genotípica é mais pronta, confiável, precisamente interpretada e inicialmente mais informativa de relações evolucionárias (WOESE, 1987). Um padrão de seqüência é unidimensional e pode ser medido de maneira simples, em termos de relações matemáticas. Os elementos de uma

seqüência, nucleotídeos ou aminoácidos, são restritos em números e bem definidos (quantificados) substituindo julgamentos subjetivos por julgamentos mais objetivos e relações definidas matematicamente (WOESE, 1987). As seqüências do rRNA mudam em taxas bastante diferentes, permitindo a medida da maioria das relações filogenéticas. Os rRNAs são moléculas grandes e consistem de muitos domínios. Há aproximadamente 50 hélices na estrutura secundária do 16S rRNA e aproximadamente o dobro na estrutura secundária do 23S rRNA, fazendo destas moléculas, cronômetros precisos. Os rRNAs puderam ser direta e rapidamente seqüenciados através da transcriptase reversa (QU et al., 1983; LANE et al., 1985), razão pela qual estas moléculas foram as mais usadas inicialmente como cronômetros moleculares.

2.2.6 Taxonomia e filogenia de bactérias

A taxonomia bacteriana moderna permitiu a construção de uma classificação hierárquica nos níveis taxonômicos mais altos, principalmente com base nos resultados obtidos pela análise filogenética usando seqüências de 16S rDNA. Descrições de novas espécies são determinadas principalmente com base nos resultados de hibridização DNA-DNA, que expõe uma avaliação quantitativa das relações inter e intra-espécies. Além do mais, a questão do quão apropriado é cada táxon, é validada incorporando-se vários perfis fenotípicos, quimiotaxonômicos e genotípicos na estrutura hierárquica baseados em critérios moleculares pelas técnicas citadas acima. Esta série de técnicas é chamada de Taxonomia polifásica (VANDAMME et al., 1996). Nesta abordagem uma árvore filogenética de 16S rDNA é a base para construir a classificação das bactérias e a validação multidimensional é feita examinando-se as várias características moleculares e fenotípicas dos organismos em questão. Esta metodologia é considerada a abordagem padrão na sistemática bacteriana moderna (BOONE et al., 2001; STACKENBRANDT et al., 2002).

2.3 Mecanismos de promoção de crescimento vegetal

2.3.1 Fixação biológica de nitrogênio atmosférico

Além do carbono e hidrogênio, o nitrogênio é o nutriente mais abundante na matéria viva, participando na composição de moléculas de ácidos nucleicos, proteínas e polissacarídeos entre outras (HUBBELL e KIDDER, 2003). Entretanto, apesar de ser requerido em quantidades significativas pelos seres vivos, na natureza, este elemento é encontrado em abundância em uma forma quimicamente muito estável, e, portanto, sua pronta assimilação pela maioria dos seres vivos é limitada, requerendo sua transformação para uma forma combinada que facilite sua assimilação (BRILL, 1977). O aumento da população no século XX foi suportado pelo processo de Haber-Bosch, que combina nitrogênio e hidrogênio, formando amônia ou produzindo outros compostos como uréia. As necessidades para essa síntese química são: hidrogênio (derivado de gás de petróleo); altas temperaturas (300 °C a 600 °C); altas pressões (200 atm a 800 atm) (SMITH, 2002). Conseqüentemente, o custo econômico para a síntese química de fertilizantes nitrogenados é elevado e, resultante principalmente, da necessidade de gasto de fontes de petróleo, ou seja, energia não renovável. Calcula-se que, para a síntese de uma tonelada de amônia, sejam necessários seis barris de petróleo. Práticas alternativas para diminuir esses custos têm sido procuradas, principalmente no Brasil, que importa fertilizante nitrogenado para satisfazer à demanda interna (HUNGRIA et al., 2000).

Portanto, considerando que a atmosfera terrestre é composta de 78% de gás dinitrogênio, a introdução do nitrogênio atmosférico no circuito dos ciclos biogeoquímicos (via fixação biológica de nitrogênio) gera efeitos positivos ao meio ambiente e na economia (STACEY et al., 1992).

O problema básico para a fixação do nitrogênio é a presença da tripla ligação $N\equiv N$, o que torna este gás extremamente estável à temperatura ambiente (SPRENT e SPRENT, 1990; EVANS e BURRIS, 1992). Apesar da abundância de N_2 na atmosfera terrestre, os organismos eucariotos não conseguem utilizar este elemento diretamente. Apenas uma porção dos organismos do grupo dos procariotos consegue converter ou reduzir enzimaticamente o nitrogênio da atmosfera. Este processo chamado fixação biológica do nitrogênio (FBN) consiste na conversão do N_2 atmosférico em amônia. Essa reação é catalizada pela enzima nitrogenase que é encontrada em todos os organismos diazotróficos. Quando o N_2 atmosférico é convertido em amônia, é então incorporado em diversas formas orgânicas que podem ser disponibilizadas para as plantas. Essas bactérias conseguem

quebrar a tripla ligação do N₂ pela ação de um complexo enzimático, chamado dinitrogenase (MORGANTE, 2003).

Com o emprego dessas bactérias na agricultura é possível economizar milhões em dólares de petróleo e gás natural (fontes energéticas não renováveis), simultaneamente contribuir para aumentos de produtividade (VARGAS e HUNGRIA, 1997) e diminuir a poluição de rios e lagos. Em termos globais, estima-se que a FBN contribua com 65% da entrada anual de N na terra, enquanto que a produção industrial contribui com 24% e a fixação não biológica com cerca de 10% (HUNGRIA et al., 2001).

Assim, FBN é o processo pelo qual a maior parte do nitrogênio atmosférico foi incorporado à matéria viva, ao longo da evolução do nosso planeta. Ainda hoje, este processo constitui a principal via de incorporação de nitrogênio ao ecossistema, que constantemente é reciclado principalmente pela ação de microorganismos fixadores de nitrogênio e desnitrificadores garantindo um reservatório inesgotável de nitrogênio na atmosfera, além de proporcionar um ecossistema em equilíbrio e contribuir para redução na aplicação de doses excessivas de compostos nitrogenados. (PEOPLES e CRASWELL, 1992).

Histórica e economicamente, vários diazotrófos têm sido amplamente utilizados como organismos modelos para investigações em laboratórios. *Clostridium pasteurianum*, *Azotobacter vinelandii* e *Azotobacter chroococcum* foram muito utilizados para o isolamento e caracterização da enzima nitrogenase. As espécies *Klebsiella pneumoniae*, *A. vinelandii*, *A. chroococcum* e *Anabaena* até hoje são utilizadas como organismos modelo para os estudos de genética e bioquímica da FBN (HASELKORN et al., 1985; POSTGATE, 1983). Segundo Evans e Burris (1992), podemos caracterizar três grupos de bactérias fixadoras de nitrogênio, ou diazotrófos: diazotrófos de vida livre, diazotrófos associativos, e os diazotrófos simbióticos.

2.3.1.1 Nitrogenase

Todas as bactérias diazotróficas possuem um complexo enzimático chamado nitrogenase, o qual, dentre outros substratos alternativos, reduz o nitrogênio atmosférico a amônia (DEAN e JACOBSON, 1992).

A enzima nitrogenase é o fator chave da fixação biológica de nitrogênio. Além de catalisar a redução de N₂ a amônio, reduz prótons a hidrogênio e também pequenas moléculas insaturadas como acetileno, azida e cianeto (ZHAO et al. 2006). A redução

alternativa do acetileno em etileno é frequentemente utilizada para estimar a FBN (SPRENT e SPRENT, 1990).

Bortels (1936) observou que a fixação de nitrogênio podia ocorrer na ausência de molibdênio (Mo). Até o início da década de 80, pesquisadores acreditavam que *Azotobacter vinelandii* e outros microrganismos fixadores de nitrogênio continham uma única nitrogenase, a nitrogenase dependente de Mo. Esta nitrogenase, ou nitrogenase clássica como é mais conhecida atualmente, é um complexo enzimático composto de duas metalo-proteínas, designadas Fe-proteína e MoFe-proteína, ambas requeridas para a catálise (DEAN e JACOBSON, 1992).

Entretanto, Bishop et al. (1980) e Robson et al. (1986) estudando sistemas alternativos da nitrogenase, estabeleceram que esses sistemas eram independentes geneticamente, sendo eles: nitrogenase 1 (clássica ou dependente de Mo – codificada por genes *nif*), nitrogenase 2 (dependente de Vanádio (V) – codificada por genes *vnf*) e nitrogenase 3 (alternativa ou apenas dependente de Ferro (Fe) – codificada por genes *anf*) (EVANS e BURRIS, 1992; TEIXEIRA, 1997).

- A nitrogenase 1, só é expressa em meio contendo Mo e é a que se encontra presente em todos os microrganismos diazotróficos estudados até o momento.

- A nitrogenase 2 ou dependente de V é um complexo enzimático contendo V na composição do cofator. Este cofator só é sintetizado quando V está presente em meio livre de N combinado e na ausência de Mo.

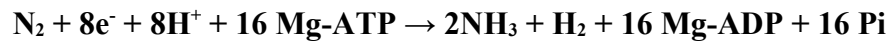
- A nitrogenase 3 não contém nem Mo nem V e é induzida apenas na presença de Fe, sob condições de deficiência de Mo e V .

Estirpes com deleções nos genes estruturais (*nifHDK*) facilitaram o isolamento das nitrogenases 1, 2 e 3 de *A. vinelandii* (BISHOP et al., 1980) e da nitrogenase 2 de *A. chroococcum* (ROBSON et al., 1986). Desde então, a existência de nitrogenases alternativas deixou de ser um dogma e já foram identificadas em diversos grupos de microrganismos diazotróficos, tais como: *Anabaena variabilis*, *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter capsulatus*, *Methanosarcina barkeri* e *Clostridium pasteurianum* (ZINONI et al., 1993).

A nitrogenase clássica ainda é a mais estudada, e predomina nos microrganismos diazotróficos estudados até o momento (REES e HOWARD, 2000).

Considerando a nitrogenase clássica como padrão, a molibdênio ferro proteína hidrolisa 16 adenosinas trifosfatos (ATP) e transfere oito elétrons por molécula de N₂ fixado, sendo um dos processos metabólicos que mais demandam energia da célula. Em

função do seu alto custo energético (duas moléculas de ATP para cada elétron transferido para o sítio catalítico), é uma enzima fortemente regulada. Diversos fatores regulam a expressão e atividade das nitrogenase, como por exemplo, a concentração de oxigênio, disponibilidade energética da célula, idade fisiológica, nitrogênio, principalmente na forma de amônio, entre outros (SIMPSON e BURRIS, 1984). A reação geral de redução do N₂, catalisada por esta enzima, está tipicamente representada a seguir:



A atividade da nitrogenase em vários microrganismos diazotróficos é inibida de forma rápida e reversível pela adição de amônio. Em bactérias do gênero *Azospirillum* a adição de amônio de 1 a 10 mM em meio de cultura, reduz a atividade da nitrogenase para 10% ou menos da atividade inicial, além de cessar a síntese da enzima. Em outros organismos é observado um declínio gradual da atividade, porém sem inibição reversível das enzimas presentes (REIS e TEIXEIRA, 2005).

Várias nomenclaturas têm sido usadas para designar as proteínas que formam o complexo da nitrogenase. Por exemplo, Fe-proteína = componente II = dinitrogenase redutase e MoFe proteína = componente I = dinitrogenase. Essas diferentes nomenclaturas têm uma variedade de origens e cada nomenclatura tem relação no contexto para qual foi usada (DEAN e JACOBSON, 1992).

As Fe e FeMo proteínas, se referem à metalo-composição dos respectivos componentes, enquanto componente I e componente II referem-se à sequência de eluição das proteínas durante a cromatografia (BULEN e LECOMTE, 1966). Com base na ligação do substrato e redução, Hageman e Burris (1978), propuseram os termos dinitrogenase redutase e dinitrogenase, entretanto, é importante ressaltar que esta nomenclatura reflete o caráter funcional destes componentes apenas quando o complexo nitrogenase está formado. Porém, na nomenclatura mais utilizada atualmente, as proteínas são designadas pelas iniciais do gênero e da espécie do microrganismo, seguidos de 1 ou 2 para indicar a MoFe-proteína (componente I) ou a Fe-proteína (componente II), respectivamente. Por exemplo, Fe-proteína de *Azotobacter vinelandii* é indicada como Av2 (DEAN e JACOBSON, 1992).

2.3.1.2 Genes da fixação de nitrogênio

A fixação biológica de nitrogênio é um processo complexo que requer a expressão de um conjunto de genes denominados genes *nif* (nitrogen fixing), os quais codificam para proteínas envolvidas diretamente no processo de FBN. O estudo da genética de *Klebsiella pneumoniae* levou à descoberta dos 20 genes envolvidos na FBN. Neste microrganismo, os genes *nif* encontram-se organizados em 7-9 “operons”, ocupando uma região de aproximadamente 24 Kb entre os genes *shiA* e *hisD* (ARNOLD et al., 1998). Desses 20 genes *nif* identificados em *K. pneumoniae* 14 foram encontrados na maioria das bactérias diazotróficas. O gene *nifH* codifica para a unidade estrutural da dinitrogenase redutase e os genes *nifD* e *nifK* para as subunidades estruturais da dinitrogenase. Os genes *nif*, principalmente o gene *nifH*, tem sido utilizado como marcador no estudo de organismos fixadores de nitrogênio. O estudo da seqüência desses genes também pode ser empregado para caracterizar a diversidade genética de bactérias diazotróficas. De acordo com Poly et al. (2001), a estrutura do gene *nifH* reflete a adaptação às variações de diversas condições do meio ambiente, tais como temperatura, composição do solo, etc.

Em algumas bactérias diazotróficas outros genes tais como: *ntrA*, *ntrB*, *fix*, *fdx*, *mf* e *nod* codificam para proteínas que, indiretamente, desempenham função essencial para a FBN como: a regulação no nível de metabolismo geral de compostos nitrogenados, sensoriamento e sinalização do nível de N-celular, transporte de elétrons para a nitrogenase e até o estabelecimento da interação bactéria-planta (BALDANI et al., 2002).

O tipo de organização dos genes *nif* não é universal, e estudos de caracterização em bactérias diazotróficas de vida livre ou em associação têm resultado em um quadro muito complexo da organização estrutural desses genes (MERRICK, 1993).

2.3.2 Liberação de Aminoácidos em Meio de Cultura

Ao longo dos últimos anos, a utilização de aminoácidos na agricultura do Brasil e nos demais países vem aumentando de forma bastante acentuada, devido aos inúmeros benefícios que estas substâncias orgânicas vêm proporcionando às plantas. A utilização de aminoácidos aumenta a produtividade das mais diversas culturas e a qualidade dos produtos agrícolas (KIKUTI e TANAKA, 2005).

A produção de aminoácidos por rizobactérias se destaca como promotor de crescimento vegetal, pois são os constituintes básicos das proteínas, macromoléculas complexas que desempenham funções específicas nas plantas (TAIZ e ZEIGER, 2004).

A importância dos aminoácidos, para a nutrição de plantas em muitos tipos de agricultura e ecossistemas naturais levou a estudos sobre as interações da planta-microbiota, disponibilidade de N nos solos e as implicações ecológicas do uso de aminoácidos por plantas considerando as mudanças de clima e poluição de N (LIPSON 2001; DAVIDSON et al., 2007).

Ruschel et al. (1984) sugeriu que o sistema da raiz da cana-de-açúcar é o local apropriado para a atividade de fixação de nitrogênio, resultando na liberação de muitos compostos nitrogenados. A concentração elevada de sacarose no exsudato da raiz da cana é a fonte principal de C para rizobactérias. A absorção de aminoácidos do solo por plantas, implica na competição direta com a microbiota. O estudo da competição entre planta-microbiota, tem sido um tópico de grande interesse (EVINER e CHAPIN 1997; KAYE e HART 1997). As bactérias liberam aminoácidos no solo por vários de mecanismos: as bactérias acumulam aminoácidos tais como γ -ácido aminobenzóico (GABA), prolina e ácido glutâmico como soluto compatível constituinte ou durante stress osmótico. Estes aminoácidos são liberados durante a lise celular, ou pela excreção das células na substituição ou acumulação da trealose na fase de ajuste osmótico (CSONKA e HANSON, 1991). Salmeron-Lopez et al., 2004 e Gonzalez-Lopez et al., 2005, mostraram que a produção e a liberação ativa de aminoácidos na rizosfera, são comuns por diversos gêneros fixadores de nitrogênio e influenciam muitos parâmetros favorecendo o crescimento de plantas. Estes aminoácidos são absorvidos eficientemente por muitas famílias de plantas. Esta versatilidade das plantas na aquisição do N tem gerado novos desafios para compreender o ciclo do nitrogênio terrestre (PERSSON e NÄSHOLM, 2001).

No Brasil, uma das culturas mais promissoras à utilização dos aminoácidos é a cana-de-açúcar. É uma cultura de ciclo longo, susceptível a uma série de estresses ambientais e induzidos pelo homem (ex: herbicidas) e é altamente dependente da fotossíntese para a síntese de carboidratos que serão acumulados nos colmos na forma de sacarose (ROSSETO, 1987). Os aminoácidos em cultura de campo se comportam como ativadores do metabolismo, como por exemplo, o aminoácido triptofano que em quantidades extremamente pequenas atua como precursor do hormônio mais importante para o crescimento das plantas, o ácido-indol-acético (TAIZ e ZEIGER, 2004). O aminoácido metionina é o precursor do hormônio etileno, responsável pela maturação em cana-de-açúcar (MOHR e SCHOPFER, 1995). Os aminoácidos tirosina e fenilalanina são os precursores dos compostos fenólicos como o ácido cinâmico, o ácido cumárico e flavonas,

envolvidos com a defesa das plantas, são também precursores da síntese de lignina na planta, que aumenta a resistência ao acamamento (SINHA, 2004).

Já o ácido glutâmico desempenha papel fundamental na eficiência do metabolismo do nitrogênio, pois é o primeiro composto formado na assimilação desse elemento, formando as amidas glutamina e asparagina, e a partir desses, o transporte para os diferentes órgãos da planta e a síntese de clorofila e outros aminoácidos (TAIZ e ZEIGER, 2004).

2.3.3 Solubilização de fósforo inorgânico (Pi)

O fósforo (P) é um importante macronutriente, constituindo cerca de 0,2% do peso seco das plantas. É um componente estrutural de macromoléculas, como ácidos nucleicos e fosfolipídios, e também da adenosina trifosfato (ATP), sendo um elemento chave de várias vias metabólicas e reações bioquímicas tais como inúmeras etapas das vias C₃ e C₄ do ciclo de Calvin e da glicólise (MARTINS, 2004).

Depois do nitrogênio, o fósforo é o macronutriente que mais limita o desenvolvimento dos vegetais. Embora a quantidade total de fósforo no solo possa ser relativamente alta, na maioria das vezes, não se encontra na sua forma lábil ou no alcance da rizosfera (GYANESHWAR et al., 2002). Nos diversos sistemas de produção agrícola, principalmente nos tropicais, são necessárias aplicações de fósforo inorgânico (Pi) no solo para garantir a produtividade. A recuperação do fósforo durante o ciclo da produção é limitada. Cerca de 80% do total de Pi aplicado no solo torna-se indisponível para as plantas, sendo imobilizado, adsorvido e/ou transformado em uma forma orgânica. A dinâmica do P no solo é complexa, este nutriente pode ser adsorvido nos hidróxidos de Fe e Al e sua retenção também se dá pela precipitação com estes elementos (Fe e Al) em solos ácidos e com Ca em solos alcalinos (GYANESHWAR et al., 2002; REICHARDT e TIMM, 2004).

Dessa forma, a disponibilidade de Pi na solução do solo e a eficiência da adubação fosfatada são reduzidas em solos tropicais, que geralmente apresentam altos teores de hidróxidos de Fe e Al e alta atividade de Al³⁺ na solução do solo (NOVAIS e SMYTH, 1999). Portanto, muitos tipos de solos são deficientes em fósforo livre (a forma disponível para as plantas), e mesmo em solos férteis é encontrado em baixíssimas concentrações (0,1 a 1,0 mg L⁻¹ de H₂PO₄⁻). As reservas de P encontradas no solo são, em parte, rochas e

outros depósitos minerais (Pi), sendo que 30% a 50% do P total do solo é de origem orgânica (REIS et al., 2008).

O fósforo orgânico está geralmente na forma de fosfato inositol (fitato); outras formas são fosfomonoésteres, fosfodiésteres, fosfolipídios, ácidos nucleicos e fosfotriésteres (RODRÍGUEZ e FRAGA, 1999; GYANESHWAR et al., 2002).

Os microrganismos, bactérias e fungos, exercem um papel central no ciclo natural do P. Os microrganismos solubilizadores de fósforo são responsáveis pela liberação de ácidos orgânicos, como o glucônico, cítrico, glutâmico, oxálico láctico, fumárico, tartárico e succínico, os quais atuam como doadores de prótons e agentes quelantes dos íons Ca, Al e Fe, favorecendo a solubilização do fosfato inorgânico do solo (RODRÍGUEZ e FRAGA, 1999). Estes microrganismos constituem cerca de 5 a 10% da microbiota total dos solos e são encontrados na maioria destes. A diversidade e as populações de solubilizadores de fósforo são consideravelmente superiores em solos rizosféricos (NAUTIYAL, 1999; VAZQUEZ et al., 2000; VASSOLEV; VASSILEVA, 2003). As bactérias são as que se destacam com o maior potencial entre os microrganismos para obtenção de fosfatos solúveis também como inoculantes para as culturas. Os principais gêneros bacterianos descritos são: *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Azotobacter* e *Erwinia* (GOLDSTEIN et al., 1999; RODRÍGUEZ e FRAGA, 1999; VERMA et al., 2001), os quais são hábeis na solubilização de fosfato inorgânico, promovendo o crescimento de plantas juntamente com a produção de fitormônios, vitaminas e antibióticos. Além disso, a população e a atividade dos microrganismos estão relacionadas com o manejo e tipo do solo, sendo consideradas indicadores microbiológicos associados ao ciclo do P no solo (KUCEY, 1983; NAHAS et al., 1994; CARNEIRO et al., 2004), contribuindo na adoção de práticas agrícolas menos impactantes ao ambiente.

A utilização de microrganismos solubilizadores de fósforo é uma alternativa viável ao uso da adubação convencional para o melhor aproveitamento do fósforo já existente no solo (SILVA FILHO e VIDOR, 2001).

2.3.4 Produção de fitormônios

Hormônios vegetais, tais como ácido-indol-acético (AIA), etileno e giberelinas (LYNCH, 1986), são produzidos por bactérias que se estabelecem na rizosfera, onde se multiplicam e sobrevivem, obtendo vantagem competitiva sobre a pressão antagônica do restante da microbiota do solo (CATTELAM et al., 1999).

2.3.4.1 Liberação de Ácido-indol-acético (AIA)

Os mecanismos propostos para os efeitos benéficos causados por RPCPs incluem a síntese de fitormônios de plantas como ácido 3-indol acético (AIA) que regula o crescimento em plantas (LAMBRECHT et al., 2000). O AIA é um hormônio vegetal do grupo das auxinas que apresenta um papel fundamental no enraizamento e crescimento apical dos vegetais através de estímulos na alongação, na divisão e diferenciação das células recém-formadas nos meristemas. Esse efeito depende, no entanto, da concentração do hormônio. Em concentrações muito altas a auxina inibe a alongação celular e, portanto, o crescimento do órgão. A sensibilidade das células à auxina varia nas diferentes partes da planta. O caule, por exemplo, é menos sensível à auxina que a raiz (TAIZ e ZEIGER, 2004; MARCHIORO, 2005).

Muitos dos microrganismos que interagem com plantas possuem a capacidade de sintetizar hormônios semelhantes aos vegetais. Muitas rizobactérias são capazes de sintetizar alguns fitormônios e seus análogos, tais como: auxinas, giberelinas e citocininas (MELO, 1998). O hormônio auxina é importante nos processos de iniciação de raízes laterais e adventícias e na alongação radicular (GASPAR et al., 1996; YANG et al., 1993). Após inoculação da planta com algumas rizobactérias promotoras de crescimento, podem ocorrer dois efeitos relacionados à auxina: o primeiro é direto, devido à produção do AIA pelos microrganismos na rizosfera; o outro devido ao estímulo à síntese desse hormônio pela própria planta (GAUDIN et al., 1994). O ácido 3-indol acético (AIA) a auxina mais comumente produzida na natureza, é sintetizado principalmente em rotas bioquímicas dependentes do triptofano. Bactérias promotoras de crescimento de plantas são favorecidas indiretamente, pois dependem dos metabólitos liberados por seus hospedeiros na rizosfera, assim, a produção de fitormônios por bactérias pode aumentar a quantidade de produtos exsudatos e a área de exsudação da planta (GLICK et al., 1999).

A interação bactéria-planta envolve vários mecanismos associados à planta e/ou aos microrganismos, e o conhecimento destes processos pode permitir a exploração desta interação para aumento de produtividade agrícola e/ou interesses industriais, além de fornecer informações para um melhor entendimento da ecologia microbiana e ambiental. Neste contexto, a produção de reguladores de crescimento vegetal (ou fitormônios) tem um papel importante, pois estes fitormônios podem favorecer o crescimento ou alterar

mecanismos fisiológicos da planta hospedeira, beneficiando a colonização desta por alguns microrganismos em detrimento de outros.

Patten e Glick (2002) verificaram que *Pseudomonas putida* aumentou de 35 % a 50 % o crescimento primário das raízes de canola (*Brassica campestris*), devido à produção de AIA. Eles demonstraram diretamente que o fito-regulador bacteriano tem um papel importante na alongação da raiz, quando a bactéria produtora está associada à planta hospedeira. Efeito semelhante foi obtido por Cattelan (1999), com diferentes isolados de *Pseudomonas* spp. em soja.

Barazani e Friedman (1999) estudaram a promoção de crescimento de plantas de alface por substâncias secretadas por rizobactérias e verificaram que o crescimento das plantas foi mediado pela produção de auxinas.

O AIA pode ser sintetizado a partir do triptofano. Esta transformação pode ser realizada por microrganismos, que produzem uma conversão oxidativa quando o triptofano se encontra em presença de peroxidases e de radicais livres. As vias de sínteses do AIA se baseiam na evidência obtida a partir da presença de intermediários (Figura 1), atividade biológica e enzimas capazes de converter “*in vivo*” estes intermediários em AIA. Além da produção em tecidos da planta, a síntese de AIA é difundida entre bactérias associadas à planta e fornecem mecanismos com influência ao crescimento de plantas. A biossíntese do AIA em algumas bactérias é mostrada através de diferentes rotas biossintéticas, expostas na (Figura 1). A biossíntese do AIA Trp-dependente ocorre por diversas vias, que são nomeadas geralmente após um intermediário. Foram propostas: 1) - A via ácido indol-3-pirúvico (AIPy), 2) - A via indol-3-acetamida (IAM) e 3) - A via triptamina indol-3-acetaldoxima (IAOx).

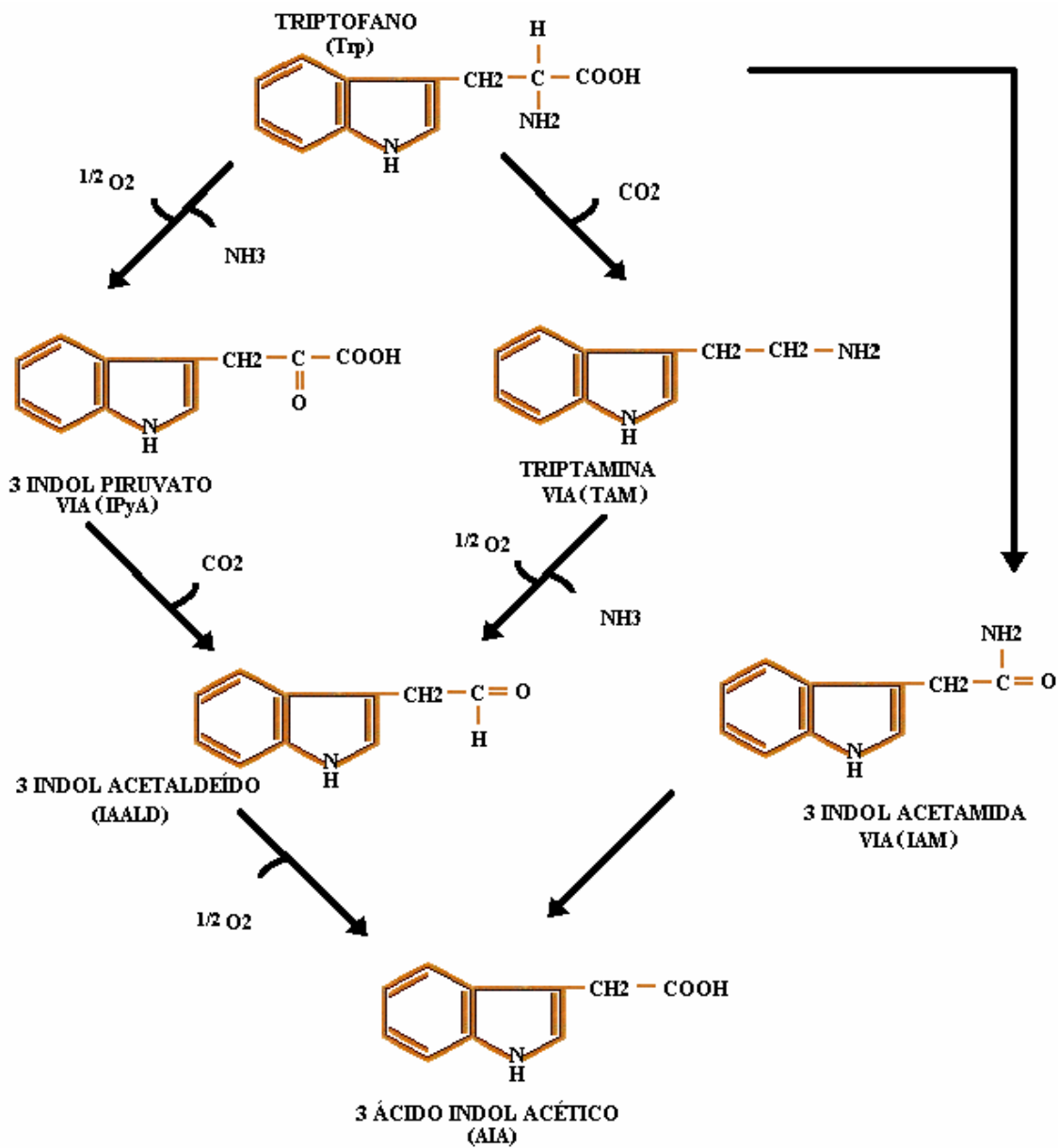


Figura 1: Biossíntese do ácido 3-indol acético (AIA), a partir do aminoácido triptofano (MARCHIORO, 2005).

2.3.4.2 Liberação de Etileno

O etileno é uma substância bem conhecida por seus efeitos no crescimento vegetal, é um composto orgânico (endógeno ou exógeno) simples e, aparentemente, o único gás que participa da regulação dos processos fisiológicos das plantas. É considerado um hormônio, pois é um produto natural do metabolismo, atua em concentrações muito baixas e participa de praticamente todos os processos de crescimento, desenvolvimento e senescência das plantas (PIERIK et al., 2006).

Os efeitos do etileno são acompanhados por aumento na síntese de enzimas. Quando o etileno estimula a abscisão de folhas, muitas enzimas aparecem na camada de abscisão. Na senescência de flores e durante o amadurecimento de frutos, outras enzimas também são produzidas (TAIZ e ZEIGER, 2004). Quando as células são danificadas, ocorre a síntese da fenilamonioliasa (PAL), que é uma enzima importante na formação dos compostos fenólicos envolvidos. Também, quando certos fungos infectam plantas, o etileno induz na planta a formação de duas enzimas que degradam a parede celular dos fungos, a β -1,3-glucanase e a quitinase (RAMAMOORTHY et al., 2001). O etileno induz aumentos nas quantidades de mRNAs que codificam essas enzimas, e estimula a transcrição de vários genes (ARSHAD e FRANKENBERGER, 1990), envolvidos com o amadurecimento de frutos, provocando uma série de transcrições metabólicas que levam a mudanças na textura, na cor e no sabor do fruto. O aumento da atividade da celulase e da poligalacturonase, que catalisam a hidrólise de celulose e de pectina da parede celular, provoca o amolecimento do fruto (YAO et al., 2002).

O etileno pode exercer efeitos ubíquos na planta. Em cana-de-açúcar, baixas concentrações de etileno no seu desenvolvimento favorecem processos fisiológicos que promovem a formação de raízes e de pêlos radiculares, aumentam o número de perfilhos, estimulam a emergência e a brotação da soqueira (RODRIGUES e LEITE, 2004). Segundo Segato (2006), na planta adulta, o etileno, em maiores concentrações, em contato com tecido vegetal, liga-se a um receptor protéico (hidroxiprolina) associado à membrana

plasmática. A ATPase tem sua atividade afetada, alterando a permeabilidade celular, o que possibilita reações que levam à senescência (antecipando a maturação). No meristema subapical o metabolismo do DNA é diretamente bloqueado, alterando o transporte e o metabolismo de auxinas (promotoras de crescimento), o que inibe a florescência e aumenta o teor de sacarose no colmo. Nos quatro meses que antecedem a colheita, a porcentagem de sacarose pode aumentar de 4,5 para 13,7, enquanto que a massa do colmo aumenta de 95 para 99 t/ha.

Assim, o etileno é o hormônio vegetal mais usado na agricultura, em função de seus efeitos sobre muitos processos fisiológicos. Por ser um gás e difundir-se rapidamente, desempenha um papel fundamental no metabolismo celular das plantas (YAO et al., 2000).

2.2.5 Biocontrole

Controle Biológico é o controle natural de organismos vivos, utilizando-se de outros organismos vivos. “Todos os seres vivos possuem um complexo de inimigos naturais que mantêm, em equilíbrio, o seu nível populacional. Todas as vezes que as pragas são favorecidas, seus inimigos naturais são desfavorecidos, ocorrendo, assim, desequilíbrio biológico, acarretando um aumento populacional da praga. O uso de agrotóxicos, de forma indiscriminada, é um dos fatores de desequilíbrio” (AZEVEDO, 2000; ARAÚJO et al., 2002).

O uso de químicos sintéticos como fungicidas é um método primário de controle de doenças causadas por fungos em plantas e animais, incluindo humanos (COOK e GRANADOS, 1991). A opinião pública, com respeito aos efeitos prejudiciais dos pesticidas químicos ao ambiente e à saúde humana, tem estimulado pesquisas que objetivem garantir alternativas de controle menos agressivas ao ambiente (OLIVEIRA-SILVA et al., 2001). As pesquisas referentes a práticas do controle biológico e o desenvolvimento de abordagens de manejo integrado amplificaram o interesse econômico no controle biológico, cuja premissa básica é manter a densidade populacional das espécies de pragas associadas à agricultura, em níveis econômicos e ecologicamente aceitáveis. O controle biológico ocorre sob dois aspectos: (a) o natural, sendo um fator efetivo que determina o balanço ecológico entre patógenos e seus antagonistas, sem a interferência humana, e (b) o aplicado, que consiste na introdução e manipulação de inimigos naturais, com a interferência do homem (WELBAUM et al., 2004).

Atualmente o controle biológico é considerado uma alternativa ou um suplemento para reduzir o uso de produtos químicos na agricultura, conseqüentemente isto promoverá a sustentabilidade da lavoura (WELBAUM et al., 2004; POSTMA et al., 2003; DE WEGER et al., 1995). RPCPs estão associadas a todas as espécies de vegetais e estão presentes em todos os ambientes (BASHAN e HOLGUIN, 1998). As bactérias promotoras de crescimento em plantas, mais extensamente estudadas, são aquelas que colonizam as superfícies das raízes e estão intimamente aderidas à rizosfera (KLOEPPER et al., 1999).

Cook et al. (1995) documentou que muitas espécies de plantas desenvolvem estratégias de defesa contra patógenos do solo, que envolvem o estímulo e a sustentação seletiva das populações de microrganismos antagonistas na rizosfera. Para o agente de biocontrole ter competência na rizosfera, é necessária a efetiva colonização da raiz, combinada com a habilidade de sobreviver e proliferar durante o crescimento das raízes das plantas por um período considerável de tempo, na presença da microbiota indígena (LUGTENBERG et al., 1999; PARKE, 1991; WELLER, 1988; WHIPPS, 1997).

Assim, para um efetivo controle biológico, é necessário entender as interações entre raiz e microbiota: como são afetadas por determinantes genéticos (BAIS et al., 2004; PING et al., 2004; KILIC-EKICI et al., 2004; OKUBARA et al., 2004), ambientais (PETTERSSON et al., 2004) espaciais (BAIS et al., 2004) e contextos temporais (CHATTERTON et al., 2004), contribuirá significativamente para melhorar a eficácia destes agentes de biocontrole.

Pesquisas sobre os mecanismos de promoção do crescimento de planta por RPCPs têm fornecido um grande entendimento sobre as múltiplas facetas da supressão de doença por estes agentes de biocontrole. As pesquisas estão focadas nas linhagens de bactérias de vida livre. (COMPANT et al., 2005).

Estes diferentes mecanismos além da competição por nutrientes e espaço (ELAD e CHET, 1987), incluem: a antibiose pela produção de antibióticos como: pirrolnitrina, piocianina, 2,4 diacetilfloroglucinol (PIERSON e THOMASHOW, 1992) produção de sideróforos como: pseudobactina que limita a disponibilidade de ferro necessário para crescimento de patógenos (LEMANCEAU et al., 1992). Outros mecanismos importantes incluem a produção de enzimas líticas tais como os quitinases e as β -1,3-glucanases que degradam quitina e glucana presente na parede de células fúngicas (POTGIETER e ALEXANDER, 1996; VELAZHAHAN et al., 1999), produção de ácido cianídrico [HCN] (HASS e DÉFAGO, 2005) e degradação das toxinas produzidas pelos patógenos (BOROWITZ et al., 1992; DUFFY e DEFAGO, 1997).

A cultura de cana-de-açúcar tem passado por grandes transformações ao longo do tempo. Mais recentemente, alterações em seu manejo têm ocorrido a partir da adoção da colheita mecanizada, sem a utilização da queima. Este tipo de manejo pode favorecer a disseminação fúngica, pois seus esclerócitos, esporos e conídios podem ser disseminados pelo solo aderidos às máquinas, implementos, ferramentas utilizadas nos tratos culturais e mudas infectadas. (REIS et al., 1995; REIS e CASA, 1996).

Entre vários fatores limitantes à produção, destacam-se a ocorrência e a severidade de doenças, que constituem importantes justificativas para estudo de bactérias produtoras de antagonismo a fungos (SANGUINO, 1998).

Entre as doenças fúngicas que trazem preocupações e podem trazer prejuízos ao setor canavieiro podem ser citados, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium moniliforme*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Colletotrichum falcatum* e *Verticillium dahliae*.

Rhizoctonia solani é um habitante do solo que comumente causa doenças nas raízes, podendo atingir partes aéreas de plantas. As doenças causadas por *Rhizoctonia* são amplamente distribuídas pelo mundo (SNEH et al., 1996). A infecção pelo fungo *R. solani* pode resultar em diferentes sintomas como as podridões e cancos de caules e raízes, tombamentos de pré e pós-emergência, queima e morte de plantas, podridões em tubérculos, degeneração de frutos e grãos, além de manchas e queima das folhas e brotos, na parte aérea. O controle do *R. solani* é difícil por causa da habilidade de sobreviver como esclerócitos sob condições ambientais adversas por muitos anos no solo, sua habilidade e atividade saprófito, e seu espectro extremamente largo de hospedeiro (OGOSHI, 1987).

Fusarium moniliforme (sin. *F. verticillioides*), atinge sempre via sistema radicular, principalmente através das raízes secundárias, posteriormente atingem o xilema, ocorre esporulam, sendo os conídios transportados pelo fluxo de seiva. Rizomas e pseudocaules de plantas doentes e ou mortas são importantes fontes de inóculo, responsáveis pela infestação do solo, onde o patógeno pode sobreviver na ausência do hospedeiro por longo período (GALLO et al., 2002). Pode ser também disseminado pela água de irrigação, drenagem, solo aderido a máquinas, implementos, ferramentas utilizadas nos tratos culturais e mudas infectadas (REIS et al., 1995; REIS e CASA, 1996). Externamente, observa-se nas folhas um amarelamento progressivo e quebra junto ao pseudocaulo, murcha e, em alguns casos, estreitamento das folhas mais novas. Internamente verifica-se descoloração do sistema vascular das raízes, rizoma, pseudocaulo e nervura principal das folhas (RAID, 2006; BEVIVINO et al., 2005).

Sclerotinia sclerotiorum causador do mofo branco uma das doenças de alto poder destrutivo nas culturas, em plantios instalados em solos contaminados e úmidos. Os sintomas aparecem normalmente em reboleiras, e na época do florescimento das plantas, quando já ocorre completa cobertura do solo. As partes da planta mais próximas ao solo ficam apodrecidas e, sob alta umidade, forma-se um micélio branco nas partes infectadas. À medida que a doença se desenvolve, o caule fica seco e toma uma coloração de palha. No seu interior são encontrados escleródios pretos e irregulares, semelhantes a fezes de rato (BOLAND et al., 1987).

Colletotrichum falcatum é o causador da antracnose ou podridão vermelha, doença que pode causar perdas significativas de produtividade em culturas de cana-de-açúcar no Brasil. A antracnose foliar, aparece geralmente 30-40 dias após a emergência, se caracteriza por amarelamento e secagem das folhas da margem ao núcleo. Conforme a doença progride, os tecidos internos tornam-se escuros e secos resultando em cavidades longitudinais no caule. A doença também causa a podridão do colmo e da haste, as lesões avermelhadas no caule são sintomas externos da doença de apodrecimento vermelho. O *Colletotrichum* pode sobreviver como micélio, conídio e microescleródio por até 18 meses em restos de colheitas, ou na superfície do solo, e pode infectar diferentes variedades de plantas (VISWANATHAN e SMIYAPPAN, 2001; WELLER, 1988; MALATHI, 2006).

O *Verticillium dahliae* é considerado um importante patógeno de distribuição mundial em diferentes culturas, sendo mais comum em zonas tropicais e nas áreas semitropicais. O *Verticillium* causa murchas vasculares podendo algumas vezes se desenvolver em plântulas, que normalmente morrem logo após a infecção (SCHNATHORST, 1981). Os sintomas se apresentam como clorose marginal e necrose das folhas, descoloração no talo, diminuição da fotossíntese e redução da biomassa. O controle de *V. dahliae* é difícil, pois esse fungo pode sobreviver por muitos anos no solo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Meios de cultura e soluções

Todos os meios que foram utilizados para os isolamentos são seletivos, isentos de fonte de nitrogênio combinado, próprios para o cultivo de bactérias fixadoras de nitrogênio (DÖBEREINER et al., 1995).

Os meios líquidos, sólidos e semi-sólidos (acrescidos, respectivamente, de 15 g.L⁻¹ ou 1,8 g.L⁻¹ de Agar) foram assim empregados: NFb, JNFb (DÖBEREINER et al., 1995), LGD, LGI (CAMPELO e DOBEREINER, 1970), para selecionar e manter os gêneros *Klebsiella* e *Enterobacter*, JMV para isolar *Burkholderia* (BALDANI et al., 2000), LG (CAMPELO e DOBEREINER, 1970) para isolar e manter *Beijerinckia*, (Tabela 1), e King-modificado (KING; WARD; RANEY, 1954), para *Pseudomonas*.

Além dos meios de cultura descritos acima, neste trabalho foram usados: Ágar Nutriente (Difco[®]), para a detecção de possíveis contaminantes; Meio Tryptic Soy Broth (Difco[®]), para a preservação dos isolados já purificados, Meio Triple Sugar Iron Agar (Difco[®]) para a distinção de isolados fermentadores de não fermentadores e Agar Batata Dextrose (BDA) (Difco[®]) para avaliação de atividade antifúngica.

**A solução de micronutrientes (Tabela 1) é composta por: 0,04 CuSO₄.5H₂O, 1,2 ZnSO₄.7H₂O, 1,4 H₃BO₃, 1 Na₂MoO₄.2H₂O, 1,175 MnSO₄.1H₂O (em g.L⁻¹).

* solução de vitaminas (em mg.100 ml); 10 biotina e 20 piridoxol-HCl (Tabela 1).

Aos meios sólidos foram acrescentadas 20mg.L⁻¹ de extrato de levedura como “starter” (DOBEREINER et al., 1995; BALDANI et al., 1996).

A composição do meio King-modificado em g.l⁻¹ é: 2 Peptona, 1,4 MgCl₂, 10 K₂SO₄, 0,01 FeCl₃, 0,3 CTAB, 10 ml Glicerol (1%), e pH 7.

Tabela 1: Composição dos meios de cultura LGD, LGI, LG, NFb, JNFb e JMV.

Composto	Concentrações /litro					
	LGD	LGI	LG	NFb	JNFb	JMV
Manitol	-	-	-	5 g	5 g	5 g
Glicose	20 g	-	-	-	-	-
Sacarose	-	5 g	10 g	-	-	-
K ₂ HPO ₄	0,05 g	0,2 g	0,05 g	0,5 g	0,6 g	0,6 g
KH ₂ PO ₄	0,15 g	0,6 g	0,15 g	-	1,8 g	1,8 g
CaCl ₂	0,01 g	-	0,02 g	-	-	-
CaCl ₂ .2H ₂ O	-	0,02 g	-	0,02 g	0,02 g	0,02 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,20 g	0,2 g	0,20 g	0,2 g	0,2 g	0,2 g
NaCl	-	-	-	0,1 g	0,1 g	0,1 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,002 g	0,002 g	0,002 g	-	-	-
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,01g	-	0,01 g	-	-	-
CaCO ₃	-	-	1,00 g	-	-	-
Azul de Bromotimol (0,5% em 2N de KOH)	-	5 ml	-	2 ml	2 ml	2 ml
FeEDTA (solução a 1,64%)	-	4 ml	-	4 ml	4 ml	4 ml
Solução de Vitaminas *	-	1 ml	-	1 ml	1ml	1ml
Solução Micronutrientes**	-	-	-	2 ml	2 ml	2 ml
NaHCO ₃	0,01 g	-	-	-	-	-
KOH	-	-	-	4,5 g	4,5 g	-
pH	7	6	7	6,8	5,8	4,2

Meio de cultura para determinação da produção de fitohormônios: MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) sem fonte de nitrogênio combinado (Tabela 2) acrescido de triptofano (0,5 g.L⁻¹) para a produção de ácido 3-indol acético (ZIMMER e BOTHE, 1988) ou metionina (0,4 g.L⁻¹) para produção de etileno (THULER et al., 2003) .

Para a determinação da solubilização de fosfatos foi usado o meio Pi sólido com a seguinte composição: em g.L⁻¹: Ca₃(PO₄)₂ = 0,8; NH₄Cl = 5; NaCl = 1; MgSO₄.7H₂O = 1; glicose =10; Agar = 15; pH = 7,2 e água destilada q.s.p 1000 ml (VERMA et al., 2001).

Tabela 2: Meio MS pH 7, 0 (Murashige e Skoog, 1962).

Composto	Concentração
----------	--------------

	Final g.L ⁻¹
NH ₄ NO ₃	1,65
KNO ₃	1,9
K ₂ HPO ₄	0,17
H ₃ BO ₃	0,0062
KI.....	0,00083
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O.....	0,00025
CoCL ₂ .6H ₂ O.....	0,000025
CaCL ₂ .2H ₂ O.....	0,44
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,37
MnSO ₄ .H ₂ O.....	0,0169
ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	0,0086
CuSO ₄ .5H ₂ O.....	0,00025
Na ₂ EDTA.2H ₂ O.....	0,0373
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	0,0278
Tiamina-HCL.....	0,0001
Piridoxina-HCL.....	0,0005
Ácido nicotínico.....	0,0005
Glicina.....	0,002
Mio-inositol.....	0,1
Sacarose.....	20
pH.....	7,0

Todos os meios de cultura foram autoclavados a 121 °C por 20 minutos a pressão de 1 atmosfera. Antes de sua utilização os meios foram previamente incubados por 24 horas em estufa a 30 °C para o teste de esterilidade.

O tampão TE (Tris HCl (1 M) pH 7,5 = 10 mM e EDTA (0,5 M) pH 8,5= 1 mM).

O tampão TAE 50X (Tris-base 240g, ácido acético gálcial 57 ml e EDTA 0,5M (pH 8,0) 100 ml), autoclavado por 20 minutos a 121 °C foi diluído adicionando-se água deionizada autoclavada q.s.p. para a obtenção da concentração e volume desejado necessário.

3.2 Material Biológico

O material biológico, rizosfera de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum sp*) variedade SP801816, cana-de-ano (12 meses) cultivadas no mesmo tipo de solo e sob o mesmo clima, submetidas a dois tipos de tratamento (orgânico e convencional) e sem tratamento (controle), foram obtidas de canaviais no Estado de São Paulo – Brasil (localização: 21° 9'S e 48° 9'N no município de Sertãozinho-SP). A coleta do material foi realizada durante a safra de 2006, em diferentes fases de crescimento da cultura, num total de 18 amostragens, 6 para cada tipo de tratamento incluindo o controle.

3.3 Tratamentos (fertilização)

O tratamento orgânico à que foi submetida a cana-de-açúcar é composto de: torta de filtro (resíduo da indústria açucareira composto de P, Ca, Cu, Zn, Fe, C e N e deficiente em K), vinhaça (resíduo produzido em grande quantidade nas destilarias de álcool com elevados teores de K, a vinhaça ainda contém N, S), rocha fosfato (fonte de P) e rocha basalto (fonte de Si, Ca, Fe, Mg e K), o dióxido de silício é um dos elementos encontrados em maior quantidade, contribui para o controle de pragas e doenças. O tratamento convencional baseia-se no uso de adubos químicos sintéticos (produzidos pela indústria) e de agrotóxicos. Composta principalmente de N, P e K. O controle não recebeu nenhum dos tratamentos anteriores.

3.4 Processo de Isolamento de Rizobactérias

Um grama de raízes contendo solo aderido foi colocado em 10 ml de água destilada e esterilizada (acrescida de 30 mg.ml⁻¹ de Mycostatin®) e submetida a sonicação por 15 minutos (UltraSom Thornton Inpec eletrônica Ltda, modelo T7 S/1 potência 50Watts). A sonicação tem por objetivo desagregar as bactérias da região rizosférica. As extremidades das raízes cortadas foram seladas com parafina a fim de evitar contaminação com as bactérias endofíticas. Após sonicação, a suspensão foi deixada em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente para decantação do solo. A seguir 100 µl do sobrenadante foram inoculados em 4 ml dos meios semi-sólidos descritos (item 3.1) contidos em frascos com capacidade para 10 ml (cada meio foi inoculado em triplicata). As culturas foram incubadas a 30 °C por até 120 h e/ou quando foi observado crescimento bacteriano. Após este tempo, os frascos onde houve desenvolvimento bacteriano foram submetidos ao teste de redução de acetileno para seleção das diazotróficas (item 3.4.1).

3.4.1 Teste de redução de acetileno - *Acetylene Reduction Assay* (ARA)

Com a finalidade de selecionar bactérias diazotróficas, os frascos que apresentaram desenvolvimento bacteriano foram vedados com tampa de borracha e lacre de alumínio. Na fase gasosa foram adicionados 10% de acetileno (substituindo o ar atmosférico) e as culturas foram incubadas sem agitação a 30 °C por 72 horas. A produção de etileno foi testada injetando-se 0,1 ml da fase atmosférica da cultura em cromatógrafo de fase gasosa Shimadzu GC-14A, com coluna Poropak-N 80/100 – INOX a 70 °C, injetor a 180 °C e

detector de ionização de chama a 230 °C. As concentrações das amostras foram calculadas comparando-se com curva padrão de etileno e aplicando-se a equação geral dos gases: $n = RT/PV$ onde n = número de moles de etileno, R = constantes dos gases = 0,082 atm.L.mol⁻¹.K⁻¹, T = temperatura em K, P = pressão em atm e V = volume da amostra em litros (TURNER e GIBSON, 1980).

3.4.2 Isolamento das colônias

As culturas capazes de redução de acetileno foram semeadas no meio sólido de igual composição ao do meio semi-sólido no qual haviam se desenvolvido. Esta semeadura teve por objetivo isolar as diferentes bactérias diazotróficas presentes na primeira cultura. As culturas foram mantidas a 30 °C por um tempo que variou de 15 a 120 h, devido às diferenças de velocidade de crescimento das diversas bactérias isoladas. Após crescimento visível a olho nu, as colônias foram analisadas e isoladas.

3.4.3 Características das colônias

Os critérios utilizados para distinguir as colônias foram: tamanho, forma (redonda ou amorfa), bordas (lisas ou irregulares), cor e textura (“seca” ou mucosa). Para melhor distinção, as colônias foram analisadas a olho nu e com auxílio de lupa. As diferentes colônias isoladas foram semeadas em meio semi-sólido, incubadas por 72 h a 30 °C e novamente submetidas ao teste de redução de acetileno, para assim discriminar as fixadoras de nitrogênio já isoladas.

3.4.4 Coloração GRAM

As células das colônias isoladas foram submetidas à coloração de Gram. Foram observados: retenção ou não do corante de Gram (G+ ou G-), morfologia celular e arranjo em microscópio óptico (Olympus, modelo CH-2, made in Japan) com aumento de 1000 vezes.

3.4.5 Preservação das bactérias

Os isolados capazes de redução de acetileno (ARA positivas), o que indica capacidade de fixar N₂, foram preservados por congelamento a -80 °C em glicerol a 20%. As bactérias foram preservadas nos meios: TSB e seletivo líquido (isento de N-combinado) usado no processo de isolamento. Para tanto, a 500 µl de cultura (24 h de incubação em meio TSB e 72 h de incubação em meio seletivo) foram adicionados 500 µl glicerol a 40%. Cada cultura obtida foi colocada inicialmente durante duas horas a -20 °C e finalmente preservadas a -80 °C (DÖBEREINER et al., 1995).

3.5 Identificação bioquímica

3.5.1 Crescimento em meio TSI

O crescimento em meio TSI (*Triple Sugar Iron Agar*) (Difco®) é utilizado para diferenciação entre: fermentadores e não fermentadores de açúcares (glicose, lactose e sacarose), produção de gases e a produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S).

3.5.2 Teste da catalase

O teste da catalase consiste em adicionar uma gota de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), em uma colônia bacteriana com 24 horas de crescimento sobre uma lâmina de vidro (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005). A formação de bolhas indica a reação de catalase positiva. Foi usado *Staphilococcus aureus* ATCC 25923 como controle positivo e *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 como controle negativo.

3.5.3 Teste do citocromo oxidase

Esta prova diferencia as Enterobacteriáceas (oxidase negativa) das *Pseudomonas sp.*(oxidase positivas). O teste foi realizado seguindo orientações do fabricante (Newprov®).

3.5.4 Testes para distinção do gênero *Beijerinckia*

As colônias que apresentaram morfologia e características do gênero *Beijerinckia* (EPS - polissacarídeos extracelulares) foram testadas em meio contendo peptona, e também foram incubadas em seus meios de isolamento à temperatura de 37 °C, pois a inibição do crescimento nestas condições é indicativa deste gênero (BECKING, 1984).

3.5.5 Testes bioquímicos via sistemas API-20E e API-20 NE

Os isolados bacterianos foram submetidos aos testes bioquímicos usando os *kits* API - 20E e API - 20NE (BioMérieux), que fornecem identificações fenotípicas. O sistema permite a avaliação de vinte características fenotípicas e bioquímicas (Tabelas 3 e 4). Os procedimentos foram realizados conforme as recomendações do fabricante e os resultados foram computados e analisados com o auxílio do programa *apiweb*TM (<https://apiweb.biomerieux.com/>).

Para as bactérias com características de Enterobacteriaceae foram usados os *kits* API-20E e as leituras dos testes foram realizadas após 24 horas de incubação (Tabela 3). O API-20NE foi utilizado para isolados pertencentes à família Pseudomonaceae e Burkolderiaceae (Tabela 4).

Tabela 3: Reações testadas no kit API-20E (Biomérieux) para enterobactérias.

Testes	Componentes ativos	Característica bioquímica
ONPG	2-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo	β-galactosidase
ADH	L-arginina	Arginina dihidrolase
LDC	L-lisina	Lisina descarboxilase
ODC	L-ornitina	Ornitina descarboxilase
CIT	Citrato de sódio	Utilização do citrato
H ₂ S	Tiosulfato de sódio	Produção de H ₂ S
URE	Uréia	Uréase
TDA	L-triptofano	Triptofano Desaminase
IND	L-triptofano	Produção de Indol
VP	Piruvato de Sódio	Produção de acetoina
GEL	Gelatina	Gelatinase
GLU	D-glucose	Fermentação Glucose
MAN	D-manitol	Fermentação

INO	Inositol	Fermentação Inositol
SOR	D-sorbitol	Fermentação Sorbitol
RHA	L-ramnose	Fermentação Ramnose
SAC	D-sacarose	Fermentação Sacarose
MEL	D-melibiose	Fermentação Melibiose
AMY	Amigdalina	Fermentação Amigdalina
ARA	L-arabinose	Fermentação Arabinose

Tabela 4: Reações testadas no kit Api 20 NE (Biomérieux) para bacilos Gram negativos não enterobacterias.

Testes	Componentes ativos	Característica bioquímica
NO ₃	Nitrato de potássio	Redução de nitratos em nitritos
		Redução dos nitratos em azoto
TRP	L-triptofano	Formação de indol TRiptofano
GLU	D-glucose	Fermentação de GLIcose
ADH	L-arginina	Arginina DiHidrolase
URE	Urea	UREase
ESC	Esculina citrato de ferro	Hidrólise (Beta-glucosidase) (ESCuлина)
GEL	Gelatina (origem bovina)	Hidrólise (protease) (GELatina)
PNG	4-nitrofenil-Beta-D galactopiranosido	Beta-galactosidase (Para-Nitrofenil-Beta-D-Galacto piranosidase)
GLU	D-glucose	Assimilação (GLIcose)
ARA	L-arabinose	Assimilação (ARABinose)
MNE	D-manose	Assimilação (ManosE)
MAN	D-manitol	Assimilação (MANitol)
NAG	N-acetil-glucosamina	Assimilação (N-Acetil-Glucosamina)
MAL	D-maltose	Assimilação (MALtose)
GNT	Potássio gluconato	Assimilação (potássio GlucoNaTo)
CAP	Ácido caprato	Assimilação (ácido CAPrato)
ADI	Ácido adipato	Assimilação (ácido ADIpató)
MLT	Ácido malato	Assimilação (MaLaTo)
CIT	Citrato de trisódio	Assimilação (CITrato de trisódio)
PAC	Ácido fenil-acetato	Assimilação (ácido fenil-Acetato)

3.6 Identificação molecular

3.6.1 Extração de DNA genômico

A extração do DNA foi realizada com uso do “kit” de extração “*Wizard Genomic DNA Purification*” (Promega®), seguindo instruções do fabricante.

A eficiência da metodologia foi comprovada através da visualização do DNA por eletroforese em gel de agarose (1,0% p/v) em tampão 1X TAE (Tris-Acetate-EDTA), foi utilizado o marcador de peso molecular de 1 kb ladder (Gibco BRL); o gel foi corado em solução com brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) e os produtos da amplificação com aproximadamente 1.500pb foram visualizados e fotografados em equipamento *Multi Doc-It Digital Imaging System – M20 Transilluminator* – Cambridge –UK.

3.6.2 Amplificação do gene 16S rDNA

A amplificação do gene 16S rDNA foi realizada utilizando-se a técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Foram utilizados 3 conjuntos universais de oligonucleotídeos iniciadores diferentes: 27f (consenso) com a seguinte seqüência (5'AGAGTTTGATCMTGGCTAAG3'), 1401r (5'CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3'), e 1525r (5'-AAGGAGGTGWTCCARCC-3') contendo as degenerações: M = A, C; W = A, T; R = A, G (LANE et al., 1991; STACKEBRANDT e GOODFELLOW, 1991; NUBEL et al., 1996). Os componentes da reação foram: DNA molde 4,0 μl (30 – 50 ng), 0,6 μM dos oligonucleotídeos iniciadores senso 27f. e iniciadores antisense 1525r ou 1401r (Invitrogen, EUA), 25 μl Master Mix PCR 2X, (Promega, EUA) e água deionizada q.s.p. 50 μl seguindo orientações do fabricante. Em todas as reações foi utilizado um controle negativo sem o DNA molde.

A reação de amplificação foi feita em termociclador (Eppendorf, Master Cycler 5330) programado para realizar uma desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, 30 ciclos de: desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 55 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 3 minutos, seguida de extensão final a 72 °C por 10 minutos. Após a amplificação, 5 μl da reação de PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose (1,0% p/v) em tampão 1X TAE (Tris-Acetate-EDTA), foi utilizado o marcador de peso molecular de 1 Kb ladder (Gibco BRL); o gel foi corado em solução com brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) e os produtos da amplificação com aproximadamente 1,500 pb foram visualizados e fotodocumentados.

3.6.3 Purificação de produtos de PCR

A purificação de produtos de PCR do 16S rDNA para posterior seqüenciamento foi realizada utilizando *kit Concert Rapid PCR Purificaton System*, seguindo instruções do fabricante (Gibco BRL). Após a purificação do produto de PCR, 5 µl da reação foram avaliados por eletroforese em gel de agarose como descrito no item 3.6.1. O DNA foi quantificado em equipamento Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer, seguindo orientações do fabricante.

3.6.4 Reação de seqüenciamento do 16S rDNA

Para reação de seqüenciamento foram utilizados aproximadamente 150 ng do DNA purificado, 3 µl de tampão "Save-Money" (MgCl₂ 1M; Tris-HCl 1M pH= 9,0; água q.s.p. 200 ml) 2 µl de "BigDye" (Applied Biosystems™) e 3,2 pmols do oligonucleotídeo iniciador antisenso 782r (5'-ACCAGGGTATCTAATCCTGT-3') (CHUN, 1995) ou 27f senso (LANE et al., 1985) e água deionizada e autoclavada q.s.p. 15 µl. A reação foi feita utilizando-se um termociclador "PTC-100 TM MJ Research. Inc." estabelecendo o programa de 40 ciclos de 10s a 96 °C, 20 minutos a 52 °C e 4 minutos 60 °C.

3.6.5 Tratamento das amostras após reação de seqüenciamento

O produto da reação de sequenciamento foi precipitado com isopropanol a 75%, lavado com etanol a 70%, dissolvido em 4 µl de "Formamide Loading Dye" (Applied Biosystems), desnaturado por 4 minutos a 96 °C, colocado no gelo e submetido à eletroforese em seqüenciador automático de DNA da ABI-PRISM 377 (Applied Biosystems).

3.6.6 Análises das seqüências

As seqüências de nucleotídeos obtidas foram analisadas e editadas manualmente utilizando o programa BioEdit Sequence Alignment Editor versão v 7.0.5 (HALL, 2005).

Em seguida foi feita uma busca de similaridade no banco de dados do GenBank através do programa BLASTn (ALTSCHUL, 1997) . Esse programa está disponível no site do NCBI (National Center for Biotechnology Information - www.ncbi.nlm.nih.gov). Foi determinada a identidade das seqüências dos isolados com seqüências existentes no banco de dados.

3.6.7 Filogenia

As seqüências do gene 16S rDNA foram analisadas utilizando o programa *Seqmatch* que usa o banco de dados RDP (Ribosomal Data Project - www.rdp.cme.edu), para mostrar a distribuição taxonômica das rizobactérias deste estudo. Também foram alinhadas pelo SeqMan e ClustalW (www.ebi.ac.uk/Clustalw). A partir dos alinhamentos foram construídas árvores filogenéticas utilizando-se o método de *Neighbour-Joining* e foram analisadas pelo bootstrap (FELSENSTEINS, 1985) usando 1000 réplicas.

3.7 Atividade específica da enzima nitrogenase

A atividade da enzima nitrogenase foi determinada pelo ARA (item 3.4.1). A atividade da nitrogenase foi acompanhada em função do tempo. Cada isolado rizobacteriano foi inoculado em 24 frascos para perfazerem 6 pontos de análise (em tempos diferentes). Os frascos com capacidade para 10 ml contendo 4,0 ml de cultura e as rizobactérias foram vedados com tampa de borracha e lacre de alumínio. Após observarmos crescimento bacteriano, foi adicionado á fase gasosa 10% de acetileno (substituindo o ar atmosférico) e a cultura foi incubada (sem agitação) a 30 °C. Destas culturas foram retiradas amostras periodicamente (no tempo zero hora e a cada 15 horas). Para cada ponto do teste foram usados 4 frascos da cultura rizobacteriana, um para o ensaio da UFC (BARBOSA et al., 1995) e três (réplicas) para a determinação da atividade da enzima nitrogenase (item 3.4.1).

3.7.1 Amplificação do gene *nifH*

As rizobactérias foram submetidas a PCR para verificar presença do gene *nifH*. As reações de amplificação foram realizadas utilizando-se os iniciadores PolF e PolR ou PPf e

PPr. Os oligonucleotídeos PolF (5' TGC GAY CCS AAR GCB GAC TC 3') e PolR (5'ATS GCC ATC ATY TCP CCG GA 3') foram usados para amplificar um fragmento de aproximadamente 360 pb, descrito por Poly et al. (2001) para *nifH* de *Azotobacter vinelandii*, e os oligonucleotídeos PPf (5' GCA-AGT-CCA-CCA-CCT-CC3') e PPr (5' TCG CGT GGA CCT TGT TG 3') foram usados para amplificar um fragmento de aproximadamente 700pb descrito por Reinhardt et al. (2008) para *nifH* de *Azospirillum brasiliense*. Adquiridos da Invitrogen, EUA. As reações foram realizadas conforme descrito no item 3.6.2.

3.8 Determinações de aminoácidos excretados ao meio pelas rizobactérias

As linhagens estudadas foram cultivadas em 250 ml meio MS líquido isento de nitrogênio combinado e incubadas em estufa a 30 °C sem agitação: após 100 h de crescimento, alíquotas de 15 ml em triplicata e foram centrifugadas (14000 g por 30 minutos). Os sobrenadantes foram filtrados em filtros com poros de 0,22 µm (Millipore®) e usados para a detecção dos aminoácidos. Os aminoácidos foram submetidos à técnica da derivatização com Oftalaldeído (OPA), segundo a metodologia descrita por Astarita et al. (2004). Foram preparados 21 ml de solução homogênea de OPA-Borato, contendo 140 mg de OPA; 18,2 ml de tampão borato pH = 9,5; 166,2 µl de β-mercaptoetanol; e 2,8 ml de metanol. A derivatização foi feita misturando-se 400 µl da solução OPA-borato e 200 µl da amostra. Os aminoácidos assim derivatizados foram identificados e quantificados por cromatografia líquida de alto desempenho em HPLC de fase reversa com coluna C18 (Shimadzu Shim-pack CLC ODS) e detector de fluorescência (excitação 250 nm e emissão de 480 nm). As áreas, tempos de retenção e concentração de cada aminoácido foram avaliados por comparação com os aminoácidos padrões com concentrações conhecidas. As concentrações das amostras foram calculadas utilizando-se as áreas de concentrações conhecidas como padrão.

3.9 Solubilização do fosfato

Para a detecção da capacidade de solubilização de fosfato, as rizobactérias foram inoculadas em meio de cultura sólido contendo fosfato insolúvel $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. As culturas (triplicata) foram incubadas a 28 °C por 48 h e, em seguida, realizadas as leituras que

consistem na identificação da presença de um halo claro em torno da colônia que indica a solubilização do fosfato (VERMA et al., 2001).

3.10 Ácido-indol-acético (AIA)

Para a análise do AIA seguiu a metodologia de Kojima (2001) adaptada para dosagem em culturas de microrganismos. As linhagens rizobacterianas foram cultivadas em 250 ml de meio MS (descrito no item 3.1 Tabela 2) e foram incubadas em estufa a 30°C sem agitação. Após 100 e 200 h de crescimento foram coletadas alíquotas de 5 ml em triplicata, que foram centrifugadas (14000 g por 30 minutos). Os sobrenadantes, filtrados em filtros com poros de 0,22 µm (Millipore®), foram usados para detecção do AIA. Ao sobrenadante foram adicionados 100 µl de [³H] AIA como padrão interno para determinar o rendimento da amostra. As amostras foram particionadas em funil de separação, com éter dietílico, a fase orgânica foi seca em “*speed vac*” e ressuspenida em 300 µl de metanol 100%. As análises de AIA foram realizadas por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC de fase reversa), com coluna C18 (Shimadzu Shim-pack CLC ODS) e detector de fluorescência (excitação 250 nm e emissão de 480 nm), 40 µl da amostra foram injetados na coluna. A estimativa de perdas para cada amostra é avaliada através da determinação da radiatividade das amostras por cintilação.

3.11 Determinações de etileno liberado ao meio pelas rizobactérias

Em frascos de 20 ml contendo 10 ml de meio MS acrescido de 0.4g/L⁻¹ metionina foram inoculadas as rizobactérias (em triplicata), os frascos foram fechados com tampas de borracha e lacre de alumínio e incubados a 30 °C por 220 h. Após a incubação, 1 ml da fase atmosférica foi retirado e analisado por cromatografia gasosa como descrito no item 3.4.1 (THULER et al., 2003).

3.12 Teste de antagonismo antifúngico

As linhagens rizobacterianas foram testadas "*in vitro*" quanto ao potencial de controle de fitopatógenos. A confrontação foi realizada em placas de Petri, com meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar) (em triplicata), para verificação da ocorrência de antagonismo. Os fungos *Sclerotinia sclerotiorum* ou *Rhizoctonia solani* ou *Verticillium*

dahliae sedidos pelo Instituto Biológico – São Paulo, ou *Fusarium moniliforme* sedido pelo Laboratório de Micologia –ICB –USP- São Paulo, ou *Colletotrichum falcatum* sedido pelo laboratório de Sanidad Vegetal de Santiago de Cuba de la Universidad de Orient – Facultad Cienc. Naturales, foram inoculados no centro das placas e incubados a 25 °C. Assim que o fungo apresentava crescimento três diferentes rizobacterias foram semeadas em cada placa que continha o fungo, em três pontos equidistantes entre si, e, do centro da placa. As placas contendo o fungo e as rizobacterias foram incubadas a 28 °C por um tempo que variou de 3 a 10 dias, conforme o fungo. A avaliação foi feita qualitativamente pela ocorrência ou não de antagonismo, o qual é evidenciado pela presença de halo de inibição do crescimento do fungo. Para controle utilizou-se placas de Petri onde apenas o fungo crescia.

3.13 Análise Estatística

Os dados foram analisados por programas estatísticos, usando ANOVA e teste de Tukey ($P < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Isolamento de rizobactérias de cana-de-açúcar

Os isolamentos de rizobactérias fixadoras de nitrogênio foram realizados em 6 coletas durante a safra de 2006.

Os primeiros testes para o isolamento bacteriano consistiram na determinação do melhor veículo para suspensão de solos aderidos às raízes; foram avaliadas soluções salina (0,9% NaCl) ou água destilada esterilizada. O número de isolados foi 2 vezes maior quando se utilizou a água destilada esterilizada. Em cada coleta foram isoladas cerca de 150 colônias, diferenciadas entre si morfologicamente, perfazendo um total de aproximadamente 900 isolados no final do experimento. Para determinar quais eram capazes de reduzir acetileno, todos foram submetidos ao teste do ARA. Sessenta e quatro por cento foram excluídas por serem negativos, restando 323 culturas, caracterizadas como rizobactérias diazotróficas (Tabela 5). Das 323 culturas, a figura 2 mostra o percentual de isolados dos diferentes tipos de tratamentos: controle 26%, tratamento orgânico 39% e tratamento convencional 35%.

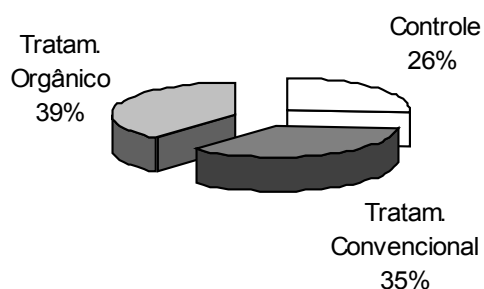


Figura 2: Percentual de bactérias isoladas de solos com os diferentes tipos de tratamentos.

A tabela 5 mostra o número de colônias aparentemente diferentes, obtidas nos meios de cultura seletivos. Do controle foram 112 colônias, do tratamento orgânico 126 e do convencional 85. Não houve diferenças significativas entre os tratamentos. Em relação aos meios de cultura, os dados indicam que meios que contêm malato como fonte de energia e carbono favoreceram o crescimento de maior número de isolados.

Tabela 5: Números de colônias diferentes obtidos em meios de cultura seletivos. Os isolados de rizobactérias diazotróficas foram provenientes de cana-de-açúcar submetida a diferentes tratamentos.

Tratamentos	Meios de Cultura						
	NFb	JNFb	LGI	LG	LGD	JMV	King Mod
Controle	28	21	15	11	15	12	10
Orgânico	32	24	16	7	21	9	17
Convencional	22	20	8	9	11	8	7
Total	82	65	39	27	47	29	34

4.1.2 Coloração de Gram

Pela coloração de Gram selecionamos todas as bactérias Gram negativas, uma vez que todos os gêneros escolhidos para estudos neste trabalho são deste grupo. Foram analisamos: morfologia da célula (forma e arranjo), produção intensa de EPS e inclusões formadas por grânulos muito característicos, presentes no citoplasma de *Beijerinckia*. Também foi determinado o tempo para crescimento de colônias isoladas, o diâmetro médio das colônias, produção de EPS, cor, consistência, forma e elevação da borda das colônias.

4.2 Características bioquímicas das estirpes

As tabelas 6, 7 e 8 apresentam os resultado dos testes que serviram para indicar a série bioquímica a ser empregada (API 20E ou API 20NE) separando as fermentadoras ou não de açúcares e as produtoras de catalase, de oxidase, de gás e H₂S.

Vinte e oito estirpes que apresentaram características do gênero *Beijerinckia* foram testadas em meio contendo peptona e foram incubadas em seus meios de isolamento à temperatura de 37 °C. Destas, apenas nove (ICBR 48, 55, 88, 91, 119, 136, 170, 176 e 177) amostras apresentaram a inibição do crescimento. Estas provas que demonstraram incapacidade de crescer a 37°C e em meio contendo peptona, são indicativas do gênero *Beijerinckia* (BECKING, 1984).

Tabela 6: Características bioquímicas e fisiológicas das rizobactérias oriundas do controle (sem tratamento), submetidas aos testes de fermentação de açúcares, produção de gás e de H₂S com utilização do meio TSI, testes da catalase e oxidase.

Estirpe ICB	MEIO TSI				Catalase	Oxidase
	Lac/Sac	Glic	H ₂ S	Prod. Gás		
3	+	+	-	+	+	-
15	-	-	-	-	+	-
23	-	-	-	-	+	+
79	-	+	-	+	+	-
82	-	-	-	-	+	+
98	-	+	+	+	+	-
110	-	+	+	+	+	+
111	-	-	-	-	+	+
131	-	-	-	-	-	-
187	-	+	+	+	+	-
188	+	+	-	+	+	-
189	-	+	+	-	+	-
199	-	+	+	+	+	-

Tabela 7: Características bioquímicas e fisiológicas das rizobactérias oriundas do tratamento orgânico, submetidas aos testes de fermentação de açúcares, produção de gás e de H₂S com utilização do meio TSI, testes da catalase e oxidase.

Estirpe ICBR	MEIO TSI				Catalase	Oxidase
	Lac/Sac	Glic	H ₂ S	Prod. Gás		
38	-	-	-	-	+	-
39	-	-	-	-	-	-
63	-	+	+	+	+	-
73	-	-	-	-	+	-
115	-	-	-	-	+	+
123	-	+	+	+	+	-
143	-	-	-	-	+	+
183	-	+	+	+	+	-
190	-	-	+	-	+	-
193	+	+	-	+	+	-
195	-	-	-	-	+	+
198	-	+	-	+	-	-
200	+	+	-	+	+	-
201	-	-	-	-	+	+
203	-	-	-	-	+	+

Tabela 8: Características bioquímicas e fisiológicas das rizobactérias oriundas do tratamento convencional, submetidas aos testes de fermentação de açúcares, produção de gás e de H₂S com utilização do meio TSI, testes da catalase e oxidase.

Estirpe ICB	MEIO TSI				Catalase	Oxidase
	Lac/Sac	Glic	H ₂ S	Prod. Gás		
2	-	-	-	-	+	+
19	-	+	+	+	+	-
37	+	+	-	-	+	-
44	+	-	-	+	+	-
46	-	+	+	-	+	-
53	-	-	-	-	+	+
56	-	-	-	-	+	+
83	+	-	-	-	+	-
109	+	-	-	-	+	+
117	-	-	-	-	+	+
129	+	+	-	+	+	-
141	+	-	-	-	+	+
147	+	-	-	-	+	-
161	-	+	+	+	+	-
174	-	+	+	-	+	-
191	-	-	+	-	+	+
192	-	-	-	-	+	+
194	-	-	-	-	+	-
210	-	+	-	+	-	-

4.3 Identificação fenotípica

O resultado do perfil bioquímico das bactérias identificadas via sistema API 20E e 20NE são apresentados nas tabelas 9, 10, 11, 12, 13 e 14, que foram comparados com as identificações moleculares.

Tabela 9 - Perfil bioquímico das RBFN **controle** segundo o sistema **API-20E**.

Estirpe	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	
3	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Klebsiella</i>
79	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	<i>Enterobacter</i>
98	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Enterobacter</i>
188	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Klebsiella</i>
189	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	<i>Enterobacter</i>
199	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Klebsiella</i>

Tabela 10 - Perfil bioquímico das RBFN **controle** segundo o sistema **API-20 NE**.

Estirpe	NO ₃	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC	
15	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Burkholderia</i>
23	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	<i>Pseudomonas</i>
82	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	<i>Pseudomonas</i>
110	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	<i>Pseudomonas</i>
111	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	<i>Pseudomonas</i>
131	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	<i>Burkholderia</i>
187	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	<i>Pseudomonas</i>

Tabela 11 - Perfil bioquímico das RBFN submetidas a **tratamento Orgânico** segundo o sistema **API-20E**.

Estirpe	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	
63	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	<i>Klebsiella</i>
115	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	<i>Klebsiella</i>
123	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	<i>Enterobacter</i>
183	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	<i>Klebsiella</i>
190	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	<i>Enterobacter</i>
193	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	<i>Enterobacter</i>
198	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	<i>Enterobacter</i>
200	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	<i>Enterobacter</i>

Tabela 12 - Perfil bioquímico das RBFN submetidas a **tratamento Orgânico** segundo o sistema **API-20 NE**.

Estirpe	NO ₃	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC	
38	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Burkholderia</i>
39	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Burkholderia</i>
73	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Burkholderia</i>
143	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Burkholderia</i>
195	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Pseudomonas</i>
201	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	<i>Pseudomonas</i>

203	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	<i>Pseudomonas</i>
-----	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--------------------

Tabela 13 - Perfil bioquímico das RBFN submetidas à **tratamento Convencional** segundo o sistema **API-20E**.

Estirpe	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	
19	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	<i>Enterobacter</i>
46	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Klebsiella</i>
129	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Klebsiella</i>
147	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	<i>Enterobacter</i>
161	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Enterobacter</i>
174	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	<i>Enterobacter</i>
210	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Klebsiella</i>

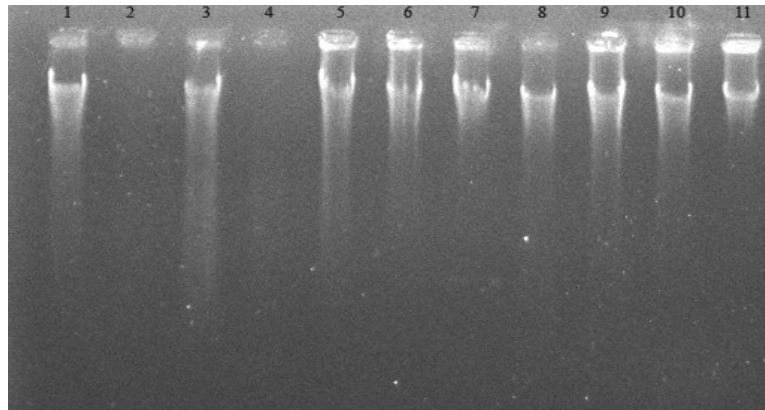
Tabela 14 - Perfil bioquímico das RBFN submetidas à **tratamento Convencional** segundo o sistema **API-20 NE**.

Estirpe	NO ₃	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC	
2	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Pseudomonas</i>
37	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Burkholderia</i>
44	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	<i>Pseudomonas</i>
53	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Burkholderia</i>
56	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>Pseudomonas</i>
83	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Burkholderia</i>
109	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	<i>Pseudomonas</i>
117	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	<i>Pseudomonas</i>
141	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	<i>Pseudomonas</i>
191	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	<i>Pseudomonas</i>
192	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	<i>Pseudomonas</i>
194	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	<i>Pseudomonas</i>

4.4 Caracterização molecular das estirpes

4.4.1 Análise da eficiência da extração do DNA genômico das estirpes

A figura 3 mostra foto do gel de agarose contendo bandas de DNA genômico. No caso de ausência de DNA (linhas 2 e 4) a extração foi repetida. As células que apresentavam excesso de polissacarídeo extracelular tiveram que ser lavadas com tampão TE por até 5 vezes para que a extração fosse bem sucedida.



4.4.2 Análise da eficiência da amplificação do

gene 16S rDNA

Figura 3: Eficiência da extração de DNA genômico. As bandas são mostradas nas linhas de 1 a 11, exceto nas linhas 2 e 4.

O gene 16S rDNA é amplificado pela técnica da reação de PCR (reação em cadeia da polimerase). Essa reação foi realizada com os pares de oligonucleotídeos 27f, 1401r e/ou 1525r, conforme descrito item 3.6.2. Foram obtidos fragmentos com aproximadamente 1500 pb (Figura 4).

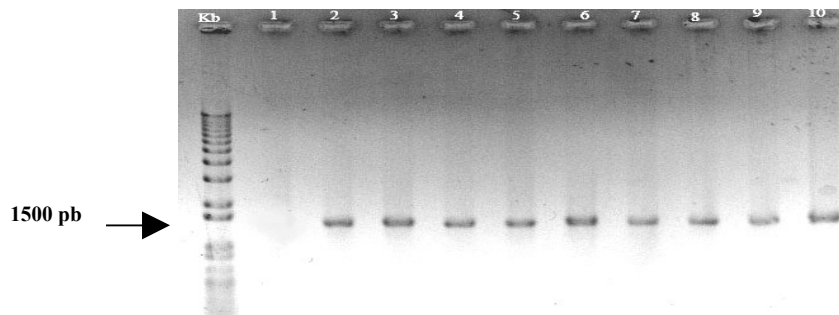


Figura 4: Análise do produto de amplificação do gene 16S rDNA de alguns isolados. Kb - Marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder, 1-Controle negativo, 2 ao 10- clones analisados.

4.4.3 Seqüenciamento parcial do gene 16S rDNA

Os produtos das reações de PCR foram purificados e submetidos à reação de seqüenciamento com os oligonucleotídeos 27f e 782r como descrito item 3.6.4. As seqüências obtidas do gene 16S rRNA foram analisadas utilizando o programa *Seqmatch* que usa o banco de dados RDP (Ribosomal Data Project - www.rdp.cme.edu). Essa análise resultou na distribuição das seqüências em três grupos (Tabela 15) e na distribuição taxonômica das rizobactérias deste estudo.

As estirpes do grupo I pertencem à sub-divisão Gama-Proteobacteria, ordem Enterobacteriales, família Enterobacteriaceae e compreendem os dois gêneros *Enterobacter* e *Klebsiella*. O número de estirpes foi de, respectivamente: 12 do gênero *Enterobacter* e 09 do gênero *Klebsiella*. Nesta sub-divisão também estão alocadas as estirpes da ordem Pseudomonales, família Pseudomonaceae, gênero *Pseudomonas* com 15 estirpes.

O grupo II da sub-divisão Beta-Proteobacteria, compreende a ordem Burkholderiales, a família Burkholderiaceae com 11 estirpes do gênero *Burkholderia*. As estirpes do grupo III pertencem à sub-divisão Alpha-Proteobacteria, da ordem Rhizobiales, família Beijerinckiaceae, gênero: *Beijerinckia*, constituído neste trabalho por 09 estirpes.

Na busca dos cinco gêneros escolhidos para este trabalho, foram identificados outros doze gêneros, são eles: *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Bosea*, *Bradyrhizobium*, *Brucella*, *Cohnella*, *Erwinia*, *Gluconacetobacter*, *Rhizobium*, *Stenotrophomonas*, *Variovorax* e *Xanthomonas*.

Tabela 15: Distribuição taxonômica das rizobactérias isoladas da cana-de-açúcar.

Domínio: Bactéria					
Divisão: Proteobacteria			Sub-divisão: Gama-proteobactéria		
Grupo: I	Ordem: Enterobacteriales		Família: Enterobacteriaceae		
Gênero: Enterobacter			Gênero: Klebsiella		
1) ICBR -019	5) ICBR -147	9) ICBR -190	1) ICBR -003	4) ICBR -115	7) ICBR -188
2) ICBR -079	6) ICBR -161	10) ICBR -193	2) ICBR -046	5) ICBR -129	8) ICBR -199
3) ICBR -098	7) ICBR -174	11) ICBR -198	3) ICBR -063	6) ICBR -183	9) ICBR -210

4) ICBR -123	8) ICBR -189	12) ICBR -200			
Ordem: Pseudomonales				Família: Pseudomonaceae	
Gênero: <i>Pseudomonas</i>					
1) ICBR -002	4) ICBR -082	7) ICBR -111	10) ICBR -191	13) ICBR -195	
2) ICBR -023	5) ICBR -109	8) ICBR -117	11) ICBR -192	14) ICBR -201	
3) ICBR -056	6) ICBR -110	9) ICBR -141	12) ICBR -194	15) ICBR -203	
Grupo: II			Sub-divisão: Beta-proteobactéria		
Ordem: Burkholderiales			Família: Burkholderiaceae		
Gênero: <i>Burkholderia</i>					
1) ICBR -015	4) ICBR -039	6) ICBR -053	8) ICBR -083	10) ICBR -143	
2) ICBR -037	5) ICBR -044	7) ICBR -073	9) ICBR -131	11) ICBR -187	
3) ICBR -038					
Grupo: III			Sub-divisão: Alfa-proteobactéria		
Ordem: Rhizobiales			Família: Beijerinckiaceae		
Gênero: <i>Beijerinckia</i>					
1) ICBR -048	3) ICBR -088	5) ICBR -119	7) ICBR -170	9) ICBR -177	
2) ICBR -055	4) ICBR -091	6) ICBR -136	8) ICBR -177		

As seqüências das estirpes ICBR também foram comparadas com as seqüências do GenBank através do programa BLASTn (NCBI- www.ncbi.nih.gov).

Na tabela 16 são mostradas as estirpes ICBR e suas respectivas identificações por similaridade da seqüência do 16S rDNA que variou de 97 a 100% com 555 à 904 pb. Os números de depósito das seqüências ICBR no GenBank são: FJ441064 a FJ441070, FJ441072 e FJ441073, FJ912853 a FJ912899.

Tabela 16: Isolados ICBR, percentual de identidade, similaridade com as seqüências do GenBank e número de acesso das seqüências depositadas.

Estirpe ICBR	% Identidade	Nr .pb	Nr. acesso melhor similaridade	Nr. de acesso das seqüências ICBR no GenBank	Linhagem melhor similaridade no Blast
48	100	667	AJ 563.931.1	FJ441073	<i>Beijerinckia indica</i>
55	99	679	AB119207.1	FJ441065	<i>Beijerinckia</i> sp.
88	99	679	AB119199.1	FJ441066	<i>Beijerinckia indica</i>
91	99	697	CP001016.1	FJ441067	<i>Beijerinckia indica</i>
119	97	592	CP001016.1	FJ441068	<i>Beijerinckia indica</i>
136	98	586	AB119196.1	FJ441069	<i>Beijerinckia indica</i>
170	99	677	CP001016.1	FJ441070	<i>Beijerinckia indica</i>
176	100	667	CP001016.1	FJ441064	<i>Beijerinckia indica</i>
177	100	573	AB119199.1	FJ441072	<i>Beijerinckia indica</i>
15	99	683	EU827472.1	FJ912871	<i>Burkholderia tropica</i>

37	98	727	FJ608711.1	FJ912886	<i>Burkholderia cepacea</i>
38	98	720	EU678361.1	FJ912895	<i>Burkholderia gladioli</i>
39	98	683	EU090891.1	FJ912887	<i>Burkholderia gladioli</i>
44	97	715	AY586519.1	FJ912873	<i>Burkholderia caribensis</i>
53	98	735	EF471225.1	FJ912894	<i>Burkholderia</i> sp.
73	97	732	FJ608711.1	FJ912872	<i>Burkholderia cepacea</i>
83	98	622	FJ608711.1	FJ912877	<i>Burkholderia cepacea</i>
131	97	582	EU399932.1	FJ912875	<i>Burkholderia</i> sp.
143	99	613	EF090940.1	FJ912874	<i>Burkholderia tropica</i>
187	98	711	EU677416.1	FJ912896	<i>Burkholderia</i> sp.
19	97	699	DQ923474.1	FJ912863	<i>Enterobacter</i> sp.
79	98	717	EU784139.1	FJ912898	<i>Enterobacter</i> sp.
98	98	720	AB308444.1	FJ912897	<i>Enterobacter</i> sp.
123	97	560	DQ923475.1	FJ912879	<i>Enterobacter</i> sp.
147	97	611	FJ646662.1	FJ912889	<i>Enterobacter</i> sp.
161	98	659	EU784139.1	FJ912878	<i>Enterobacter</i> sp.
174	99	588	EU301779.1	FJ912876	<i>Enterobacter radicincitans</i>
189	99	707	EU784139.1	FJ912865	<i>Enterobacter</i> sp.
190	98	728	AJ506159.2	FJ912899	<i>Enterobacter asburiae</i>
193	99	718	AY683044.1	FJ912864	<i>Enterobacter</i> sp.
198	98	700	AJ506159.2	FJ912892	<i>Enterobacter asburiae</i>
200	97	582	DQ821729.1	FJ912888	<i>Enterobacter</i> sp.
3	97	857	EU617332.1	FJ912860	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
46	99	733	EU078620.1	FJ912866	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
63	97	904	EU302848.1	FJ912869	<i>Klebsiella</i> sp.
115	98	635	EU931550.1	FJ912867	<i>Klebsiella oxytoca</i>
129	99	556	FJ711774.1	FJ912868	<i>Klebsiella</i> sp.
183	97	719	AF130983.1	FJ912870	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
188	99	667	FJ711774.1	FJ912861	<i>Klebsiella</i> sp.
199	98	615	FM164637.2	FJ912862	<i>Klebsiella</i> sp.
210	99	685	FJ796201.1	FJ912859	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
2	99	665	FJ598322.1	FJ912854	<i>Pseudomonas</i> sp.
23	98	738	AJ551156.1	FJ912853	<i>Pseudomonas</i> sp.
56	98	687	AJ551156.1	FJ912855	<i>Pseudomonas</i> sp.
82	99	555	EF204235.1	FJ912884	<i>Pseudomonas putida</i>
109	97	576	AB369341.1	FJ912883	<i>Pseudomonas</i> sp.
110	98	576	FJ646635.1	FJ912885	<i>Pseudomonas</i> sp.
111	97	729	FJ719329.1	FJ912891	<i>Pseudomonas</i> sp.
117	98	784	AB461692.1	FJ912880	<i>Pseudomonas</i> sp.
141	98	720	FJ646634.1	FJ912890	<i>Pseudomonas</i> sp.
191	97	627	AM184269.1	FJ912882	<i>Pseudomonas</i> sp.
192	98	572	EU747694.1	FJ912881	<i>Pseudomonas</i> sp.
194	98	720	FJ646634.1	FJ912893	<i>Pseudomonas</i> sp.
195	97	605	FJ493140.1	FJ912858	<i>Pseudomonas</i> sp.
201	99	661	FJ493140.1	FJ912856	<i>Pseudomonas</i> sp.
203	99	665	FJ227303.1	FJ912857	<i>Pseudomonas azelaica</i>

4.4.4 Filogenia molecular

As análises filogenéticas foram realizadas e as seqüências de melhor similaridade do Genbank, como descrito itens 3.6.6 e 3.6.7. A tabela 16 mostra as percentagens de semelhança entre as seqüências obtidas das estirpes deste trabalho comparadas com as seqüências do banco de dados e os números de acessos das seqüências identificadas.

As árvores filogenéticas foram construídas pelo método Neighbor-Joining a partir de uma região de 500 pb que engloba regiões hipervariáveis e mostra as relações filogenéticas entre as sequências de genes 16S rRNA obtidas das estirpes rizobacterianas e sequências disponíveis no GenBank. A distância filogenética entre sequências foi calculada com algoritmo Jukes Cantor. Os valores de Bootstrap superiores a 70% foram obtidos de um total de 1000 réplicas (valor de Bootstrap = 1000).

A primeira árvore (Figura 5) foi elaborada com:

1 - As sequências parciais do gene 16S rDNA das estirpes identificadas como *Beijerinckia* sp. ICBR 48, 55, 88, 91, 119, 136, 170, 176, 177;

2 - As sequências do Genbank de maior similaridade *Beijerinckia* sp. AB119207, *Beijerinckia indica* AJ563931, AB119196 e ATCC.19361,

3 - As sequências das estirpes identificadas como *Pseudomonas* sp. ICBR 02, 23, 56, 82, 109, 110, 111, 117, 141, 191, 192, 194, 195, 201, 203;

4 - E as sequências do Genbank de maior similaridade *Pseudomonas* sp AB461692, AB369341, FJ 493140, EU 747694, *P. azelaica* FJ227303 e *Pseudomonas* sp FJ64663.

A segunda árvore (Figura 6) foi elaborada com:

1- As sequências parciais do gene 16S rDNA das estirpes identificados como *Burkholderia* ICBR 15, 37, 38, 39, 44, 53, 73, 83, 131, 143, 187;

2 - As sequências do Genbank de maior similaridade *Burkholderia* sp EU 399932, EU677416, *B. caribensis* AY586519, *B. tropica* EU827472, *B. cepacea* AY741352-ATCC53267, *B. gladioli* EU678361;

3 - As sequências das estirpes identificadas como *Klebsiella* sp. ICBR 03, 46, 63, 115, 129, 183, 188, 199, 210;

4 - E as sequências do Genbank de maior similaridade *Klebsiella* sp. FM164637 e EU302848, *K. oxytoca* EU931550, *K. pneumoniae* FJ 796201 e AJ508695.

A terceira árvore (Figura 7) foi elaborada com:

1 - As sequências parciais do gene 16S rDNA das estirpes identificados como *Enterobacter* sp. ICBR 19, 79, 98, 123, 147, 161, 174, 189, 190, 193, 198, 200;

2 - E as sequências do Genbank de maior similaridade *Enterobacter* sp AB308444, DQ923475, DQ923474, EU784139, *E. asburiae* EU301774 e AJ506159.

Estas análises agruparam os gêneros, confirmando os resultados de homologia das seqüências.

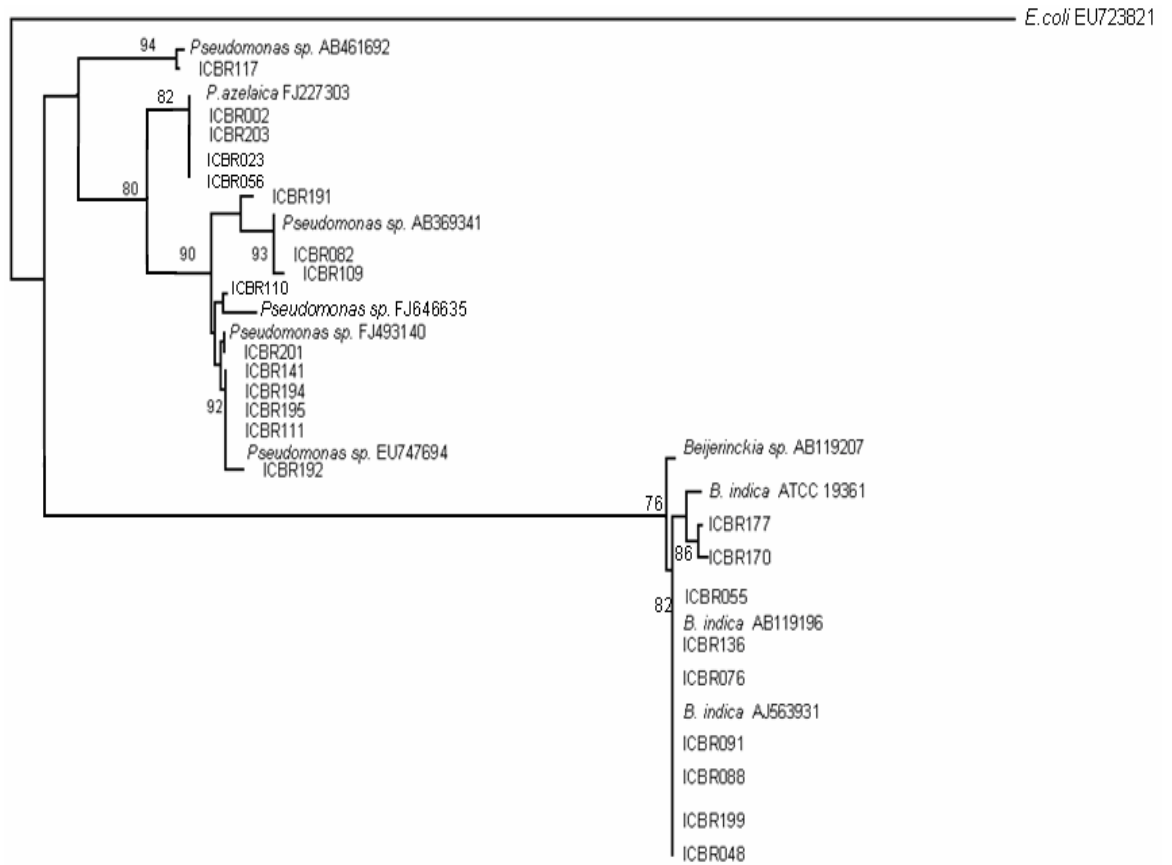


Figura 5: Árvore filogenética construída a partir de seqüências do gene 16S rDNA das linhagens rizobacterianas identificadas como *Beijerinckia* e *Pseudomonas*.

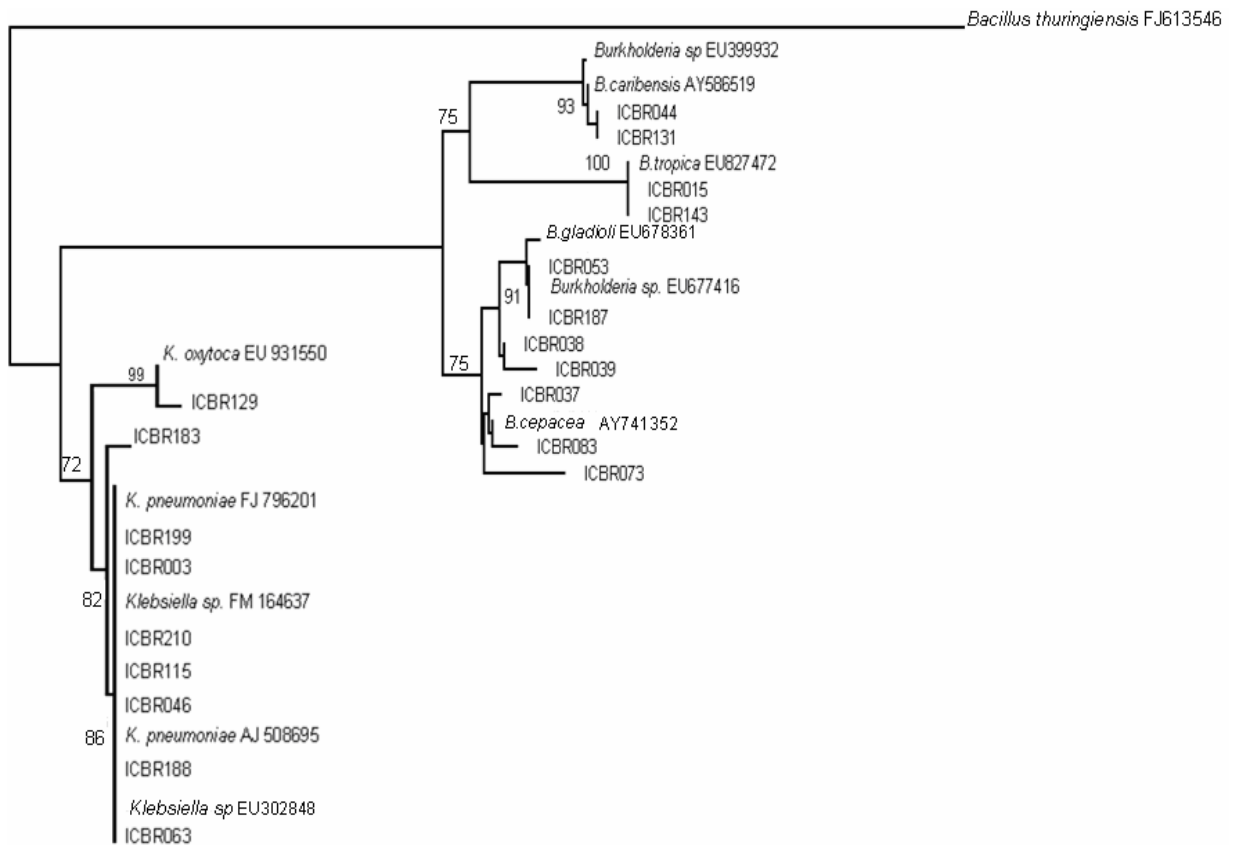


Figura 6: Árvore filogenética construída a partir de seqüências do gene 16S rDNA das linhagens rizobacterianas identificadas como *Klebsiella* e *Burkholderia*.

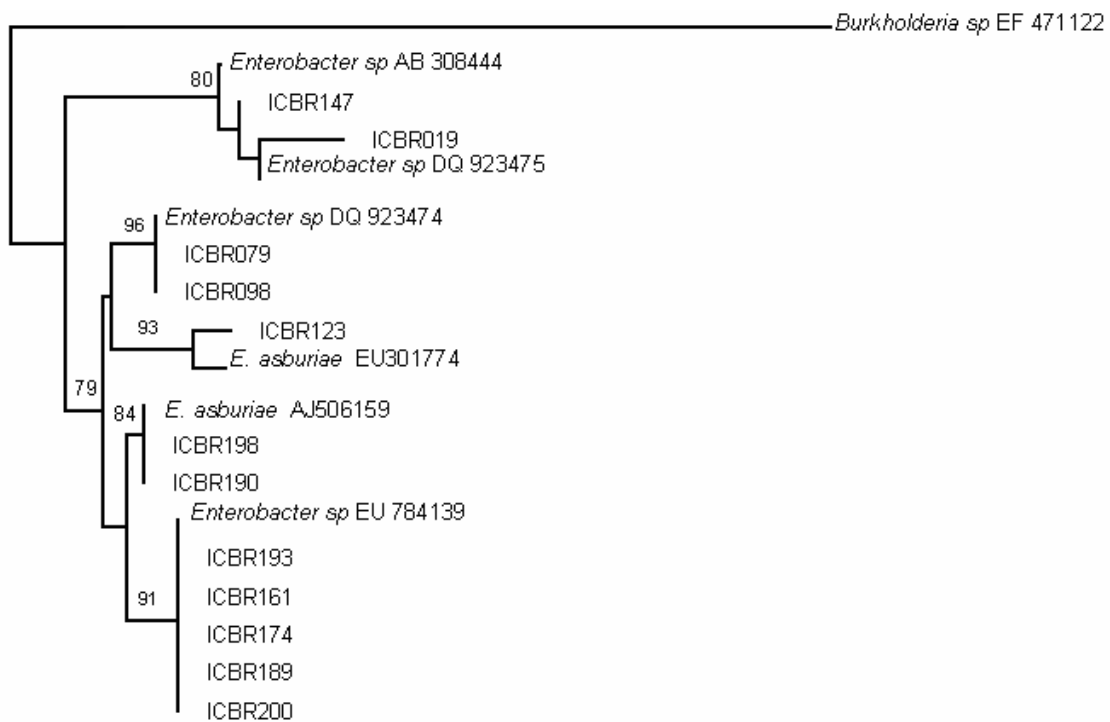


Figura 7: Árvore filogenética construída a partir de seqüências do gene 16S rDNA das linhagens rizobacterianas identificadas como *Enterobacter*.

4.5 Atividade da enzima nitrogenase

A atividade da nitrogenase foi determinada em função do tempo. Em cada ponto de análise eram realizadas contagens do número de unidades formadoras de colônia para calcular a atividade específica da enzima.

Das 56 rizobactérias provenientes de cana-de-açúcar submetidas ao controle e aos tratamentos orgânico e convencional 52% das rizobactérias foram capazes de reduzir o acetileno. Quarenta e oito por cento não reduziram esse substrato, embora tenham sido selecionadas por esta metodologia logo em seguida ao isolamento. As medidas de crescimento, determinadas por UFC, mostraram que a fase exponencial das culturas iniciou-se com um número de 10^4 UFC ml⁻¹ e variou até 10^8 UFC ml⁻¹ em meio carente de N-combinado, mesmo nas culturas que não apresentaram atividade da enzima nitrogenase pela metodologia aplicada. Os tratamentos de origem não influenciam nestes resultados.

As linhagens que apresentaram capacidade de redução do acetileno estão apresentadas na tabela 17. Os resultados mostram os picos de maior atividade específica da enzima expresso em fmol C₂H₄ h⁻¹.CFU. A duração média de atividade foi de 30 horas, ou seja, todo o tempo do experimento.

O perfil de cada gênero rizobacteriano, que apresentou atividade da enzima nitrogenase, está apresentado nas figuras 8, 9, 10, 11 e 12.

A figura 8 mostra o perfil da curva de crescimento e da atividade da nitrogenase das linhagens *Beijerinckia*. Todas as linhagens deste grupo foram capazes de reduzir o acetileno. Os valores de atividade apresentados pelo gênero *Beijerinckia* se destacaram dos demais e foram significativamente diferentes daqueles dos demais gêneros.

A figura 9 mostra o perfil da curva de crescimento e atividade da enzima nitrogenase de uma estirpe da linhagem *Burkholderia*. Neste grupo composto por 11 linhagens apenas a ICBR 187 apresentou capacidade de redução do acetileno.

A figura 10 mostra o perfil da curva de crescimento e atividade da enzima nitrogenase de uma estirpe da linhagem *Enterobacter*, este grupo é composto por 12 linhagens, 5 linhagens apresentaram atividade da enzima nitrogenase.

A figura 11 mostra o perfil da curva de crescimento e atividade da enzima nitrogenase de uma estirpe da linhagem *Klebsiella*. Neste grupo, composto por 9 linhagens, 7 apresentaram atividade da enzima nitrogenase.

A figura 12 mostra o perfil da curva de crescimento e atividade da enzima nitrogenase de uma estirpe da linhagem *Pseudomonas*, 15 linhagens estão neste grupo, 7 linhagens apresentaram atividade da enzima nitrogenase.

Tabela 17: Atividade da enzima nitrogenase em fentomol, das linhagens ICBR *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Pseudomonas*, oriundas do controle, tratamento orgânico e convencional.

Controle		Orgânico		Convencional	
ICBR	Atividade Nitrogenase f _{mol} -1	ICBR	Atividade Nitrogenase f _{mol} -1	ICBR	Atividade Nitrogenase f _{mol} -1
<i>Beijerinckia</i>					
91	216,3	48	151,88	55	244,17
170	164,74	136	123,33	88	95,59
177	246,11	176	107,43	119	175,44
<i>Burkholderia</i>					
187	13,06				
<i>Enterobacter</i>					
189	14,5	161	0,37	200	0,66
				123	66,02
				193	14,6
<i>Klebsiella</i>					
188	93,75	210	29,57	63	49,79
3	99,96	129	7,94	183	0,02
		46	0,98		
<i>Pseudomonas</i>					
23	0,04	203	0,3	109	2,56
110	4,02			141	10,58
				192	7,85
				194	14,15

As curvas de crescimento e atividade da enzima nitrogenase são mostradas no anexo B. Também estão apresentados no anexo C os números de gerações mostrando crescimento das rizobactérias na ausência de nitrogênio combinado (Tabela C.1).

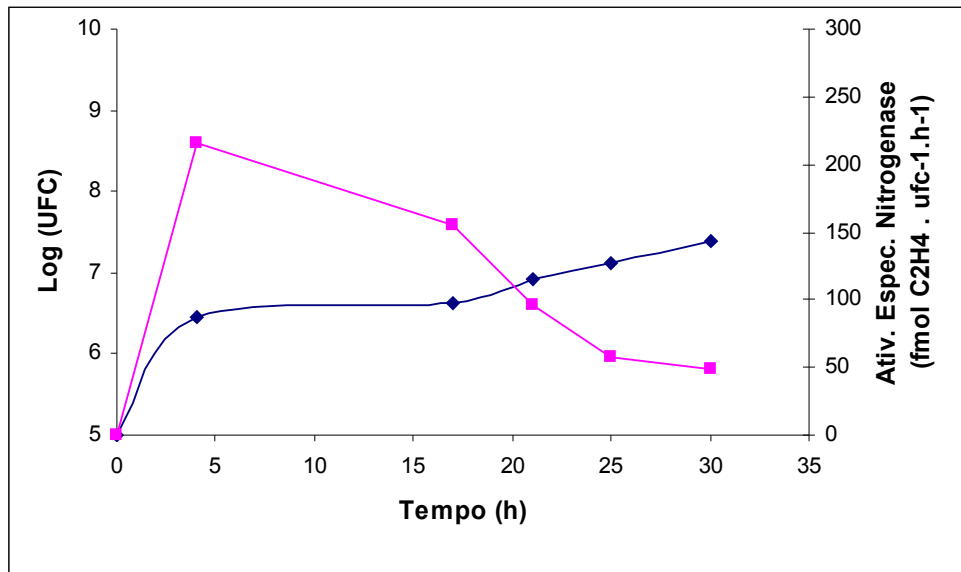


Figura 8: Perfil da curva de crescimento de crescimento e atividade da enzima nitrogenase $\text{fmol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{CFU}$ das linhagens *Beijerinckia*.

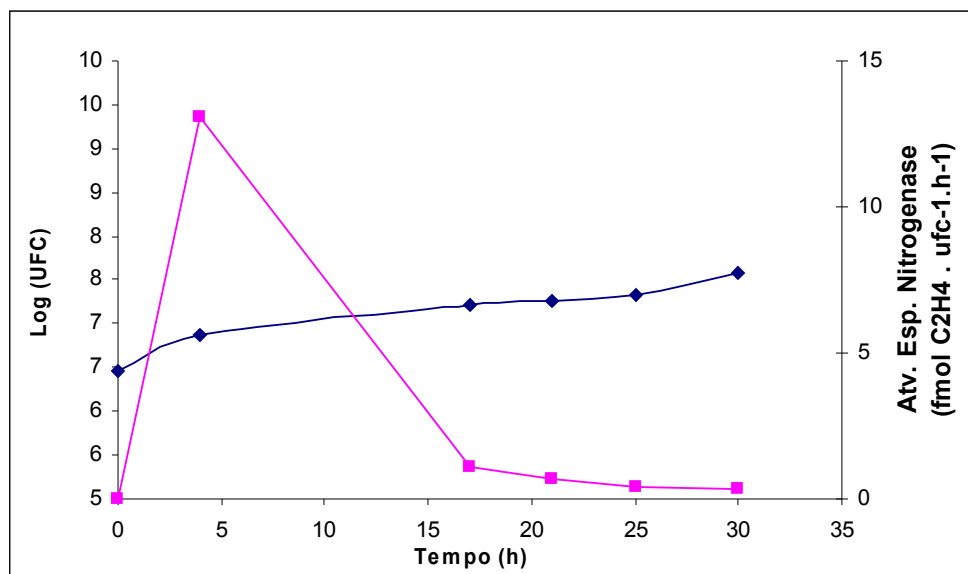


Figura 9: Perfil da curva de crescimento de crescimento e atividade da enzima nitrogenase $\text{fmol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{CFU}$ de uma estirpe das linhagens *Burkholderia*

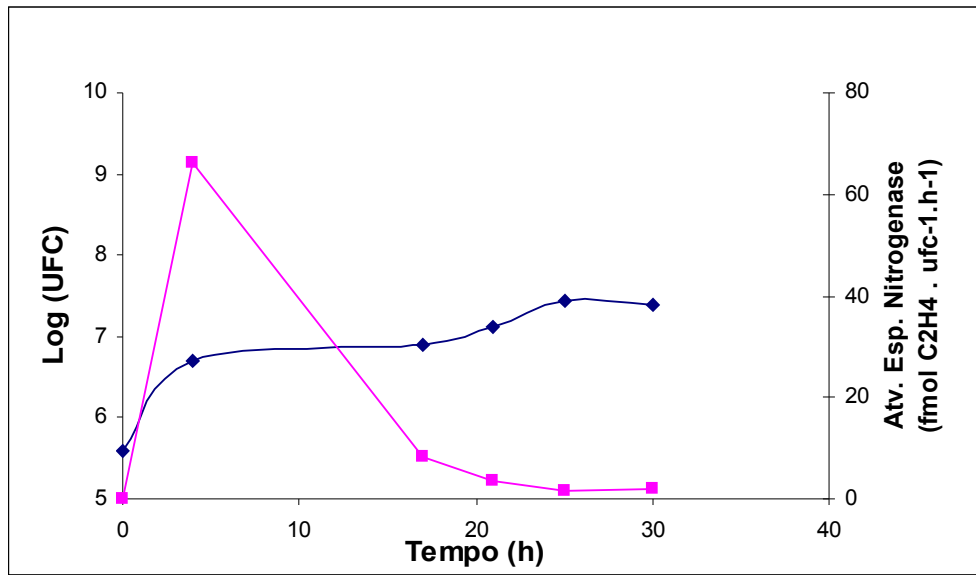


Figura 10: Perfil da curva de crescimento e atividade da enzima nitrogenase fmol C₂H₄ · h⁻¹ · CFU de uma estirpe das linhagens *Enterobacter*.

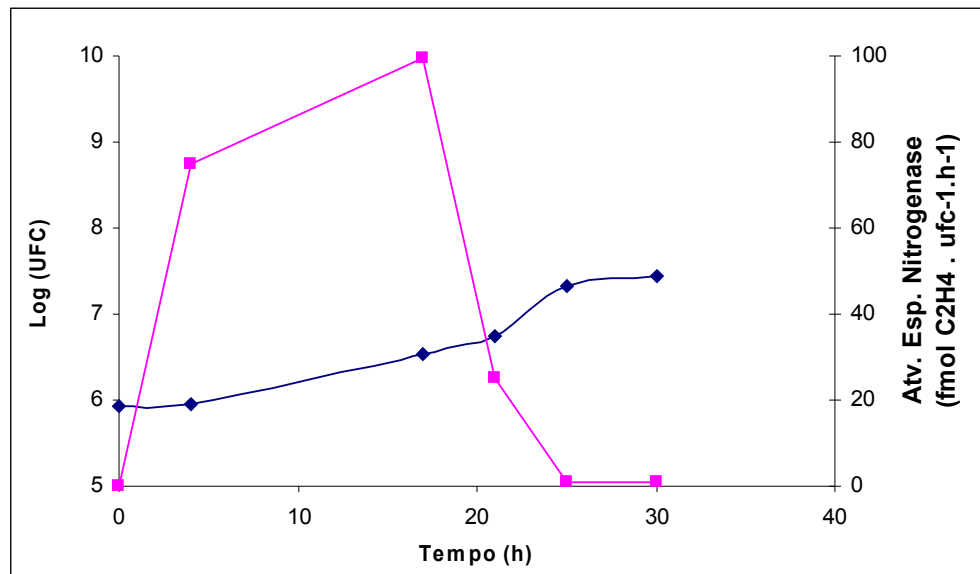


Figura 11: Perfil da curva de crescimento e atividade da enzima nitrogenase fmol C₂H₄ · h⁻¹ · CFU de uma estirpe das linhagens *Klebsiella*.

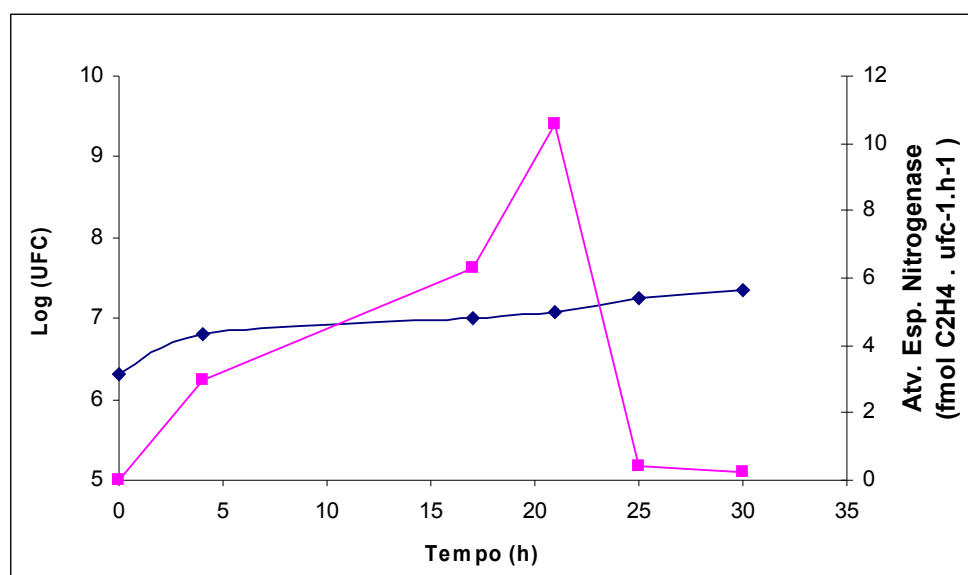


Figura 12: Perfil da curva de crescimento e atividade da enzima nitrogenase $\text{fmol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{ufc}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ de uma estirpe das linhagens *Pseudomonas*.

4.5.1 Detecção do gene *nifH*

A detecção do gene *nifH* em todas as linhagens deste estudo, confirmou os ensaios de ARA, feitos (em 2006) quando as rizobactérias foram isoladas.

Na tabela 18, podemos observar todas as estirpes e os respectivos oligonucleotídeos que amplificaram o gene *nifH* como descrito item 3.7.1.

Com a utilização dos oligonucleotídeos PP-f e PP-r foram amplificados os genes *nifH* de vinte linhagens, sendo: sete *Burkholderia* ICBR 37, 38, 39, 53, 73, 83 e 187; uma *Enterobacter* ICBR 174; e doze *Pseudomonas* ICBR 2, 23, 82, 109, 111, 117, 141, 191, 192, 194, 195 e 201.

Com a utilização dos oligonucleotídeos Pol-f e Pol-r foram amplificados os genes *nifH* de trinta e seis linhagens, sendo: nove *Beijerinckia* ICBR 48, 55, 88, 91, 119, 136, 170, 176 e 177; quatro *Burkholderia* ICBR 15, 44, 131 e 143; onze *Enterobacter* ICBR 19, 79, 98, 123, 147, 161, 189, 190, 193, 198 e 200; nove *Klebsiella* ICBR 3, 46, 63, 115, 129, 183, 188, 199 e 200; e três *Pseudomonas* ICBR 56, 110 e 203.

Na figura 13 podemos analisar a eficiência da amplificação do gene *nifH* pela técnica da PCR, com utilização dos oligonucleotídeos Pol-f e Pol-r, com obtenção de fragmentos com 361pb.

Tabela 18: Estirpes rizobacterianas e os respectivos oligonucleotídeos que amplificaram o gene *nifH*.

ICBR NR.	Gênero	Oligon. PPf e PPr	Oligon. PolF e Polr
48	<i>Beijerinckia</i>		+
55	<i>Beijerinckia</i>		+
88	<i>Beijerinckia</i>		+
91	<i>Beijerinckia</i>		+
119	<i>Beijerinckia</i>		+
136	<i>Beijerinckia</i>		+
170	<i>Beijerinckia</i>		+
176	<i>Beijerinckia</i>		+
177	<i>Beijerinckia</i>		+
15	<i>Burkholderia</i>		+
37	<i>Burkholderia</i>	+	
38	<i>Burkholderia</i>	+	
39	<i>Burkholderia</i>	+	
44	<i>Burkholderia</i>		+
53	<i>Burkholderia</i>	+	
73	<i>Burkholderia</i>	+	
83	<i>Burkholderia</i>	+	
131	<i>Burkholderia</i>		+
143	<i>Burkholderia tropica</i>		+
187	<i>Burkholderia</i> sp	+	
19	<i>Enterobacter</i> sp		+
79	<i>Enterobacter</i> sp		+
98	<i>Enterobacter</i> sp		+
123	<i>Enterobacter</i> sp		+
147	<i>Enterobacter</i> sp		+
161	<i>Enterobacter</i> sp		+
174	<i>Enterobacter radicitans</i>	+	
189	<i>Enterobacter</i> sp		+
190	<i>Enterobacter asburiae</i>		+
193	<i>Enterobacter</i> sp		+
198	<i>Enterobacter asburiae</i>		+
200	<i>Enterobacter</i> sp		+
3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		+
46	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		+
63	<i>Klebsiella</i> sp		+
115	<i>Klebsiella oxytoca</i>		+
129	<i>Klebsiella</i> sp		+
183	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		+
188	<i>Klebsiella</i> sp		+
199	<i>Klebsiella</i> sp		+
210	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		+
2	<i>Pseudomonas</i> sp.	+	
23	<i>Pseudomonas</i> sp.	+	
56	<i>Pseudomonas</i> sp.		+
82	<i>Pseudomonas putida</i>	+	
109	<i>Pseudomonas</i> sp.	+	
110	<i>Pseudomonas</i> sp.		+
111	<i>Pseudomonas</i> sp.	+	
117	<i>Pseudomonas</i> sp.	+	
141	<i>Pseudomonas</i> sp.	+	
191	<i>Pseudomonas</i> sp.	+	
192	<i>Pseudomonas</i> sp.	+	
194	<i>Pseudomonas</i> sp.	+	
195	<i>Pseudomonas</i> sp.	+	
201	<i>Pseudomonas</i> sp.	+	
203	<i>Pseudomonas azelaica</i>		+

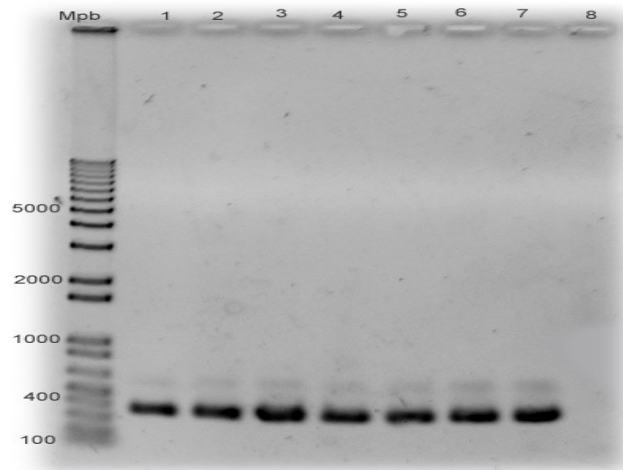


Figura 13: Produtos de ampliações do gene *nifH*. Mpb (1Kb), canaletas 1 a 7 DNAs amplificados e 8 controle negativo.

4.6 Liberação de aminoácidos em meio de cultura

Das 56 linhagens analisadas, 41% excretaram aminoácidos em meio de cultura. As medidas de crescimento, determinadas por UFC (unidades formadoras de colônia), mostraram que a fase exponencial das culturas iniciou-se com um número médio de 10^3 UFC ml⁻¹, após com 100 h o número determinado foi em média 10^7 UFC ml⁻¹ e após 200 h, 10^8 UFC ml⁻¹.

As figuras 14, 15, 16, 17 e 18 mostram as concentrações de diferentes aminoácidos liberados em meios de cultura após 100 h de incubação, respectivamente pelos gêneros *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Pseudomonas*. Após 200 h, nenhum aminoácido foi detectado nos meios de cultura.

A soma dos aminoácidos excretados foi maior no tratamento orgânico quando comparado com controle e convencional. Os aminoácidos mais liberados foram valina (liberado por 16 rizobactérias), alanina (liberado por 12 rizobactérias) e glicina (liberado por 8 rizobactérias). Os dados obtidos não são significativamente diferentes, houve equivalência tanto quanto aos gêneros rizobacterianos liberadores de aminoácidos quanto aos tratamentos de origem a que foi submetida a cana-de-açúcar.

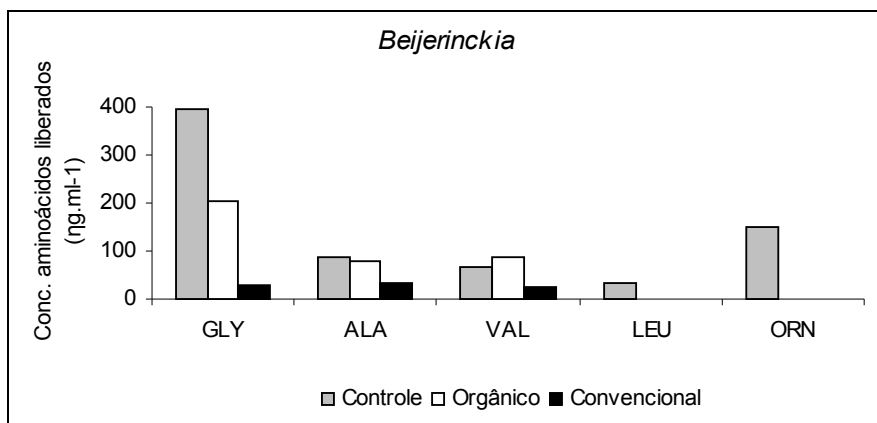


Figura 14: Concentrações de aminoácidos liberados (ng.ml^{-1}) pelas linhagens do gênero *Beijerinckia*, e respectivos tratamentos de origem.

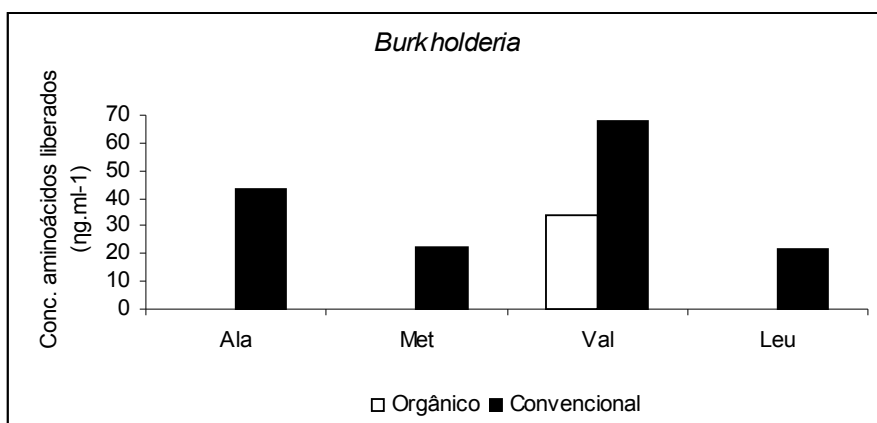


Figura 15: Concentrações de aminoácidos liberados (ng.ml^{-1}) pelas linhagens do gênero *Burkholderia*, e respectivos tratamentos de origem.

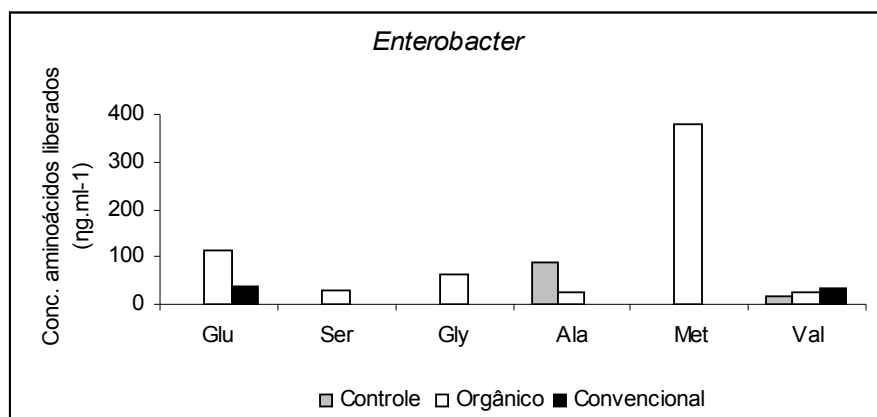


Figura 16: Concentrações de aminoácidos liberados (ng.ml^{-1}) pelas linhagens do gênero *Enterobacter*, e respectivos tratamentos de origem.

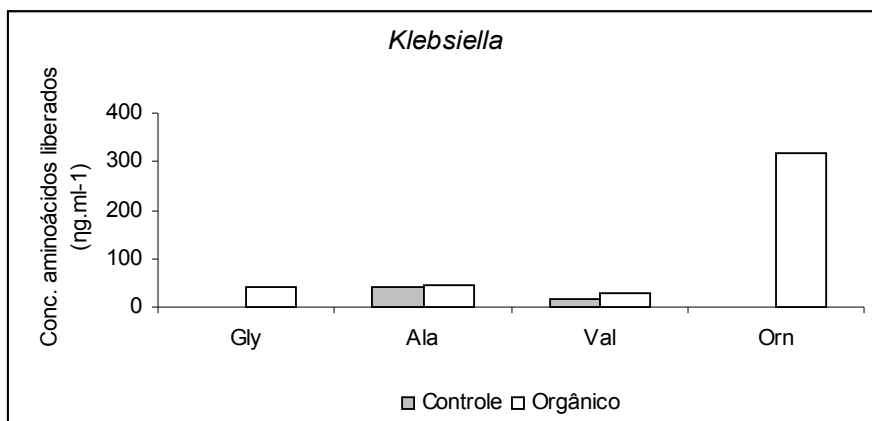


Figura 17: Concentrações de aminoácidos liberados (ng.ml⁻¹) pelas linhagens do gênero *Klebsiella*, e respectivos tratamentos de origem.

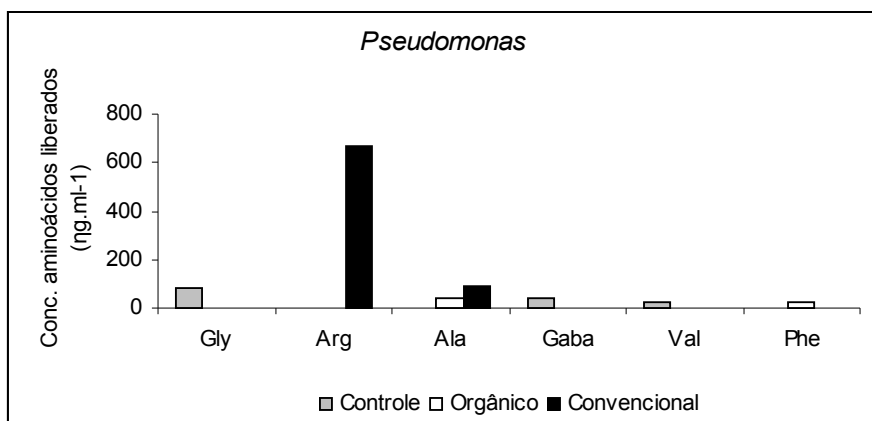
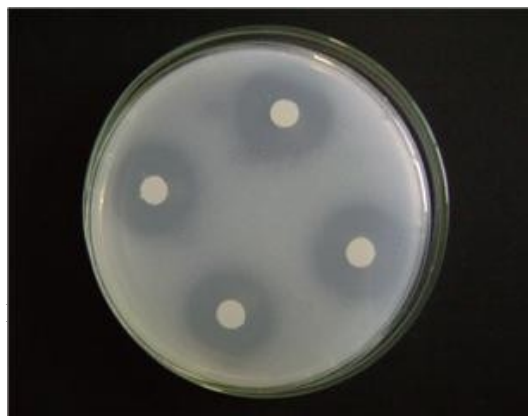


Figura 18: Concentrações de aminoácidos liberados (ng.ml⁻¹) pelas linhagens do gênero *Pseudomonas*, e respectivos tratamentos de origem.

4.7 Solubilização de fosfato inorgânico

As cinquenta e seis linhagens rizobacterianas foram avaliadas quanto à capacidade de solubilização de fosfato em meio sólido $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Vinte e nove linhagens apresentaram halo em torno das colônias, conforme exemplo mostrado na figura 19 indicando o potencial de solubilização de fosfato.



A solubilização de fosfato pelas rizobactérias provenientes do tratamento convencional diferiu significativamente das rizobactérias do tratamento orgânico e do controle. As rizobactérias provenientes da cana-de-açúcar sob tratamento orgânico (Tabela 20) apresentaram potencial de solubilização de fosfato de 28%. Somente 5 linhagens solubilizaram fosfato, sendo 4 *Burkholderia* e 1 *Enterobacter*. Sob tratamento convencional (Tabela 21) foram 64% que apresentaram este potencial, sendo 6 *Pseudomonas*, 3 *Burkholderia*, 3 *Enterobacter* e 2 *Klebsiella*. Das RPCPs provenientes do controle (Tabela 22) 62,5% solubilizaram fosfato, sendo 3 *Burkholderia*, 3 *Enterobacter*, 3 *Klebsiella* e 1 *Pseudomonas*. O gênero *Burkholderia* seguido pelo gênero *Enterobacter* foram os que se destacaram neste experimento, diferindo significativamente do gênero *Beijerinckia* que não solubilizou fosfato.

Tabela 19: Solubilização de PO₄, pelas rizobactérias controle

Isolado ICBR	Gênero Bacteriano	Solubilização PO ₄
91	<i>Beijerinckia</i>	-
170	<i>Beijerinckia</i>	-
177	<i>Beijerinckia</i>	-
15	<i>Burkholderia</i>	+
131	<i>Burkholderia</i>	+
187	<i>Burkholderia</i>	+
79	<i>Enterobacter</i>	+
98	<i>Enterobacter</i>	+
189	<i>Enterobacter</i>	+
3	<i>Klebsiella</i>	+
188	<i>Klebsiella</i>	+
199	<i>Klebsiella</i>	+
23	<i>Pseudomonas</i>	-
82	<i>Pseudomonas</i>	-
110	<i>Pseudomonas</i>	+
111	<i>Pseudomonas</i>	-

Isolado ICBR	Gênero Bacteriano	Solubilização PO ₄
55	<i>Beijerinckia</i>	-
88	<i>Beijerinckia</i>	-
119	<i>Beijerinckia</i>	-
38	<i>Burkholderia</i>	+
39	<i>Burkholderia</i>	+
73	<i>Burkholderia</i>	+
143	<i>Burkholderia</i>	+
123	<i>Enterobacter</i>	-
190	<i>Enterobacter</i>	-
193	<i>Enterobacter</i>	+
198	<i>Enterobacter</i>	-
200	<i>Enterobacter</i>	-
63	<i>Klebsiella</i>	-
115	<i>Klebsiella</i>	-
183	<i>Klebsiella</i>	-
195	<i>Pseudomonas</i>	-
201	<i>Pseudomonas</i>	-
203	<i>Pseudomonas</i>	-

Tabela 21: Solubilização de PO₄, pelas rizobactérias tratamento convencional.

Isolado ICBR	Gênero Bacteriano	Solubilização PO ₄
48	<i>Beijerinckia</i>	-
136	<i>Beijerinckia</i>	-
176	<i>Beijerinckia</i>	-
37	<i>Burkholderia</i>	-
44	<i>Burkholderia</i>	+
53	<i>Burkholderia</i>	+
83	<i>Burkholderia</i>	+
19	<i>Enterobacter</i>	+
147	<i>Enterobacter</i>	+
161	<i>Enterobacter</i>	+
174	<i>Enterobacter</i>	-
46	<i>Klebsiella</i>	-
129	<i>Klebsiella</i>	+
210	<i>Klebsiella</i>	+
2	<i>Pseudomonas</i>	+
56	<i>Pseudomonas</i>	+
109	<i>Pseudomonas</i>	+
117	<i>Pseudomonas</i>	-
141	<i>Pseudomonas</i>	+
191	<i>Pseudomonas</i>	+

4.8 Liberação de Fitormônios

4.8.1 Liberação de ácido 3-indol acético (AIA)

Todas as linhagens estudadas neste trabalho foram capazes e produzir ácido 3-indol acético. As concentrações de AIA foram avaliadas quando as culturas tinham 100 e 200h de crescimento. Vinte e três linhagens apresentaram aumento nas concentrações de

AIA no período de 100 a 200 h. As médias de produção de AIA são mostradas na figura 20.

As maiores concentrações de AIA, neste estudo, foram obtidas pela estirpe ICBR44 do gênero *Burkholderia*, que, com 100 h de crescimento, atingiu a concentração de 19,62 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AIA, seguida por duas estirpes de Enterobactérias, a estirpe ICBR 188 do gênero *Klebsiella*, que, com 200 h de crescimento, atingiu a concentração de 17,73 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ e ICBR 161 do gênero *Enterobacter*, que, com 200 h de crescimento, atingiu a concentração de 13,72 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Dos cinco gêneros estudados *Beijerinckia* foi o que menos produziu AIA. A variação de produção de AIA pelo gênero *Beijerinckia* foi de 0,03 a 0,53 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Entre as linhagens de *Pseudomonas* os limites foram de 0,02 e 7,94. Em *Burkholderia* a variação foi de 0,01 e 19,62 e finalmente em *Klebsiella* foi de 0,19 a 17,73. A análise estatística mostrou que os gêneros *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Pseudomonas* diferiram significativamente de *Beijerinckia* e *Burkholderia*.

A produção de AIA pelas rizobactérias isoladas de cana-de-açúcar sob tratamento orgânico (Tabela 23) variaram de 0,02 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 5,37 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, sob tratamento convencional (Tabela 24) variaram de 0,04 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 19,62 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ e no controle (Tabela 22) variaram de 0,03 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 17,73 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Os tratamentos de origem (efetuados na cana-de-açúcar) não influenciaram na liberação de AIA pelos gêneros estudados.

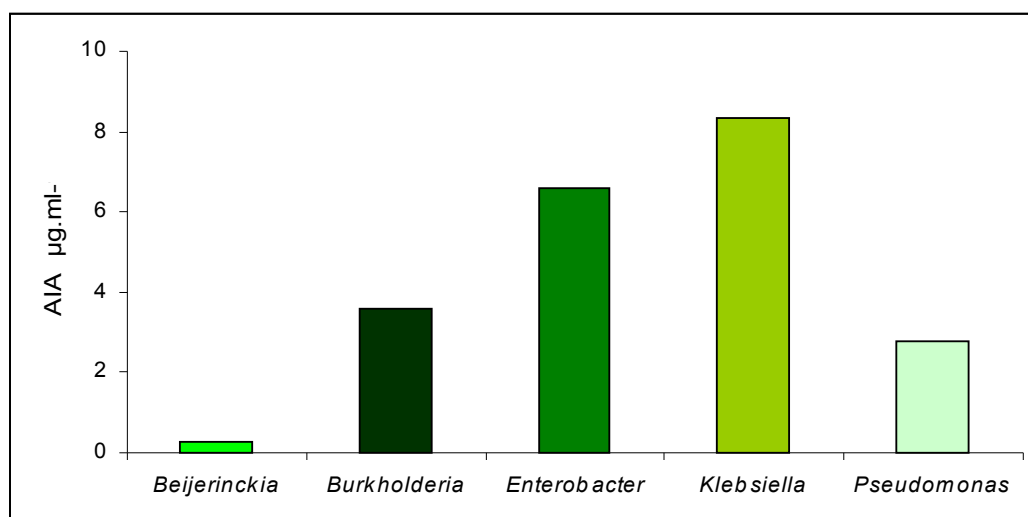


Figura 20: Média da produção de AIA pelas linhagens rizobacterianas.

Tabela 22: Produção de AIA com 100 e 200 h de cultivo pelas rizobactérias controle.

Isolado ICBR	Gênero	AIA $\mu\text{g.ml}^{-1}$	
		100 h	200 h
91	<i>Beijerinckia</i>	0,1	0,12
170	<i>Beijerinckia</i>	0,15	0,13
177	<i>Beijerinckia</i>	0,04	0,03
15	<i>Burkholderia</i>	3,4	1,6
131	<i>Burkholderia</i>	0,1	0,12
187	<i>Burkholderia</i>	0,67	0,24
79	<i>Enterobacter</i>	3,12	5,04
98	<i>Enterobacter</i>	2,72	3,61
189	<i>Enterobacter</i>	4,05	4,1
3	<i>Klebsiella</i>	0,19	9,68
188	<i>Klebsiella</i>	7,94	17,73
199	<i>Klebsiella</i>	3,79	2,93
23	<i>Pseudomonas</i>	0,63	0,08
82	<i>Pseudomonas</i>	1,25	0,98
110	<i>Pseudomonas</i>	0,97	1,38
111	<i>Pseudomonas</i>	0,59	0,87

Tabela 23: Produção de AIA com 100 e 200 h de cultivo pelas rizobactérias oriundas do tratamento orgânico.

Isolado ICBR	Gênero	AIA $\mu\text{g.ml}^{-1}$	
		100 h	200 h
55	<i>Beijerinckia</i>	0,28	0,08
88	<i>Beijerinckia</i>	0,53	0,04
119	<i>Beijerinckia</i>	0,3	0,29
39	<i>Burkholderia</i>	0,3	0,24
73	<i>Burkholderia</i>	0,82	0,67
143	<i>Burkholderia</i>	0,11	0,01
38	<i>Burkholderia</i>	0,8	2,22
123	<i>Enterobacter</i>	1,33	1,82
190	<i>Enterobacter</i>	3,47	4,97
193	<i>Enterobacter</i>	5,37	3,24
198	<i>Enterobacter</i>	0,46	0,36
200	<i>Enterobacter</i>	2,92	2,01
63	<i>Klebsiella</i>	3,03	2,59
115	<i>Klebsiella</i>	0,22	0,43
183	<i>Klebsiella</i>	4,39	3,56
195	<i>Pseudomonas</i>	0,4	0,83
201	<i>Pseudomonas</i>	1,03	1,48
203	<i>Pseudomonas</i>	0,02	0,03

Isolado ICBR	Gênero	AIA $\mu\text{g.ml}^{-1}$	
		100 h	200 h
48	<i>Beijerinckia</i>	0,06	0,16
136	<i>Beijerinckia</i>	0,05	0,03
176	<i>Beijerinckia</i>	0,08	0,06
37	<i>Burkholderia</i>	0,04	0,07
44	<i>Burkholderia</i>	19,62	6,99
53	<i>Burkholderia</i>	0,07	0,06
83	<i>Burkholderia</i>	1,21	0,33
19	<i>Enterobacter</i>	0,98	0,66
147	<i>Enterobacter</i>	4,14	5,27
161	<i>Enterobacter</i>	5,47	13,72
174	<i>Enterobacter</i>	0,07	0,02
46	<i>Klebsiella</i>	3,82	2,89
129	<i>Klebsiella</i>	0,7	0,87
210	<i>Klebsiella</i>	8,2	2,04
2	<i>Pseudomonas</i>	0,64	0,12
56	<i>Pseudomonas</i>	0,84	0,47
109	<i>Pseudomonas</i>	4,12	3,17
117	<i>Pseudomonas</i>	0,06	0,25
141	<i>Pseudomonas</i>	4,77	7,94
191	<i>Pseudomonas</i>	2,6	2,04
192	<i>Pseudomonas</i>	1,93	1,45

4.8.2 Liberação de etileno

Das 56 rizobactérias estudadas 66% foram capazes de produzir o fitormônio etileno (Figuras 21, 22, e 23). Das rizobactérias provenientes do controle (sem tratamento) 69% produziram esse fitormônio, do tratamento orgânico foram 67% e do convencional foram 64%. Os tratamentos de origem não influenciaram significativamente na produção de etileno pelos gêneros estudados.

Em relação aos gêneros estudados os que mais produziram etileno foram *Pseudomonas* 100%, *Klebsiella* 77% e *Enterobacter* 75%. O gênero *Pseudomonas* diferiu significativamente de *Burkholderia* com 54% e de *Beijerinckia* que não produziu etileno.

Dezenove linhagens rizobacterianas não produziram etileno, são elas: ICBR 91, 170, 177- *Beijerinckia*, 131- *Burkholderia*, e 199- *Klebsiella*, oriundas do controle, 55, 88, 119- *Beijerinckia*, e 38, 39, 143- *Burkholderia*, oriundas do tratamento orgânico e 48, 136, 176- *Beijerinckia*, 37- *Burkholderia*, 147, 161, 174- *Enterobacter* e 46- *Klebsiella*.

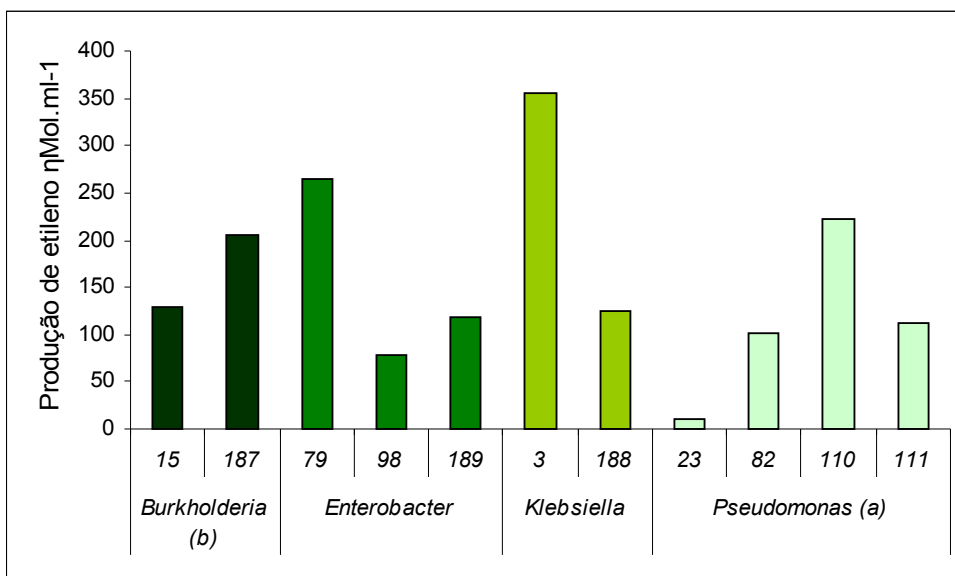


Figura 21: Produção de etileno pelas linhagens rizobacterianas isoladas do controle.

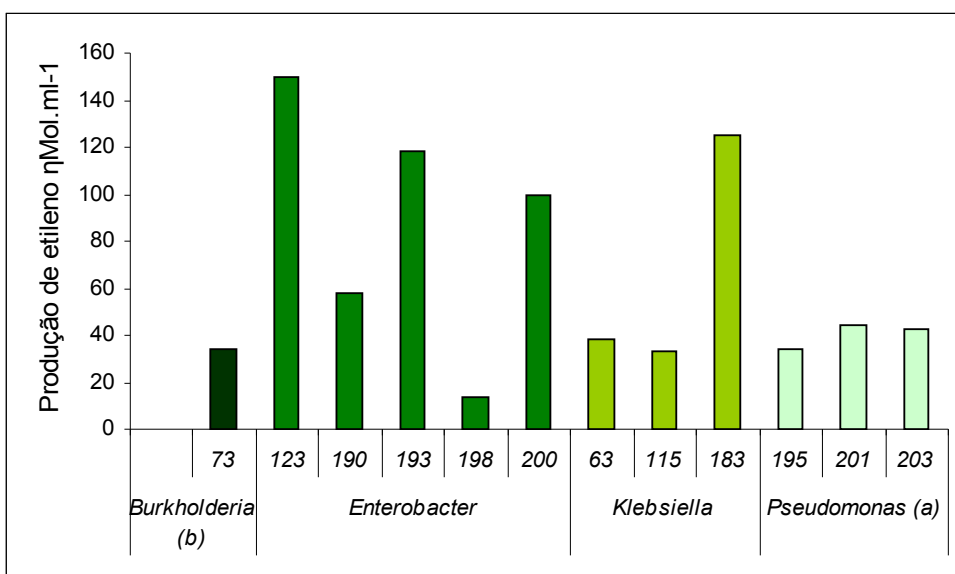


Figura 22: Produção de etileno pelas linhagens rizobacterianas isoladas do tratamento orgânico.

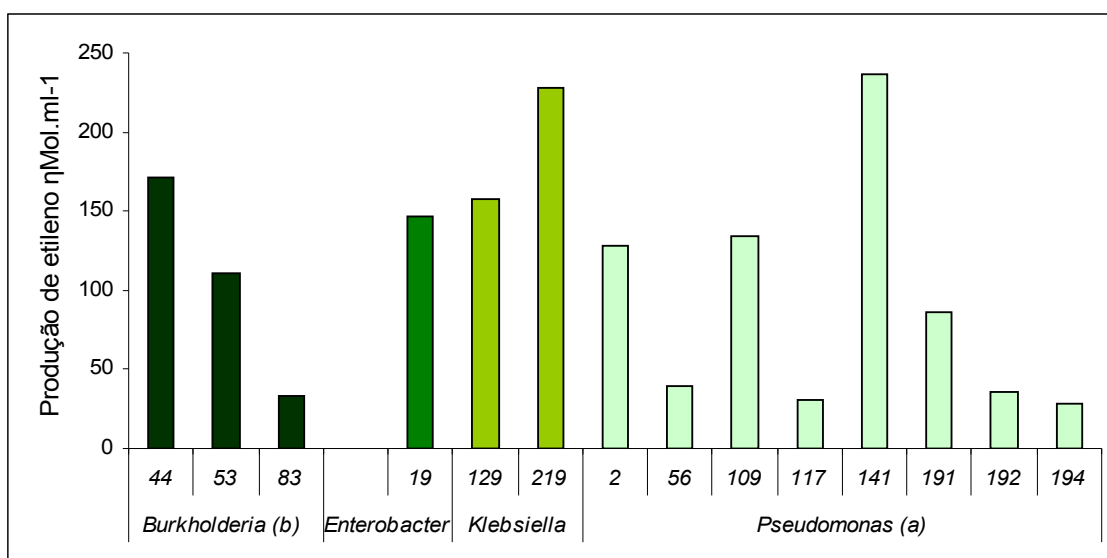


Figura 23: Produção de etileno pelas linhagens rizobacterianas isoladas do tratamento convencional.

4.9 Atividade antagônica (antifúngica)

Oitenta e quatro por cento das rizobactérias testadas neste trabalho apresentaram antagonismo a fungos. A figura 24 mostra, em percentuais, a capacidade de cada gênero rizobacteriano, de produzir antifúngicos. A liberação de substâncias antifúngicas ocorreu em 75% das rizobacterias provenientes do tratamento controle, 83% do tratamento orgânico e 91% do tratamento convencional.

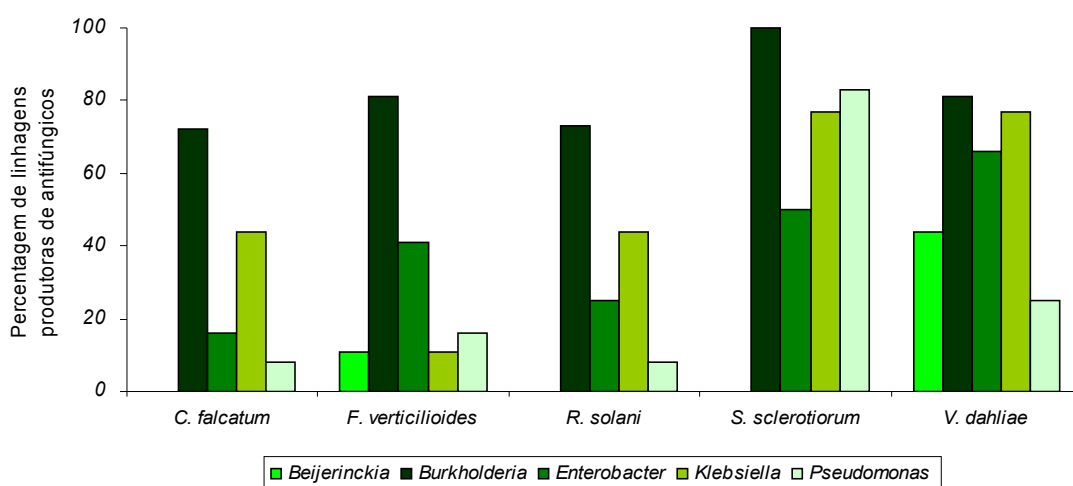


Figura 24: Percentual de antagonismo produzido pelas linhagens rizobacterianas contra cinco fungos testados.

A figura 25 mostra os os fungos *R. solani* e *S. sclerotiorum*: controles (placas A e C) e na presença de 3 rizobacterias (placas B e D), onde são visíveis os halos de inibição entre o fungo e as rizobacterias promotoras de antagonismo.

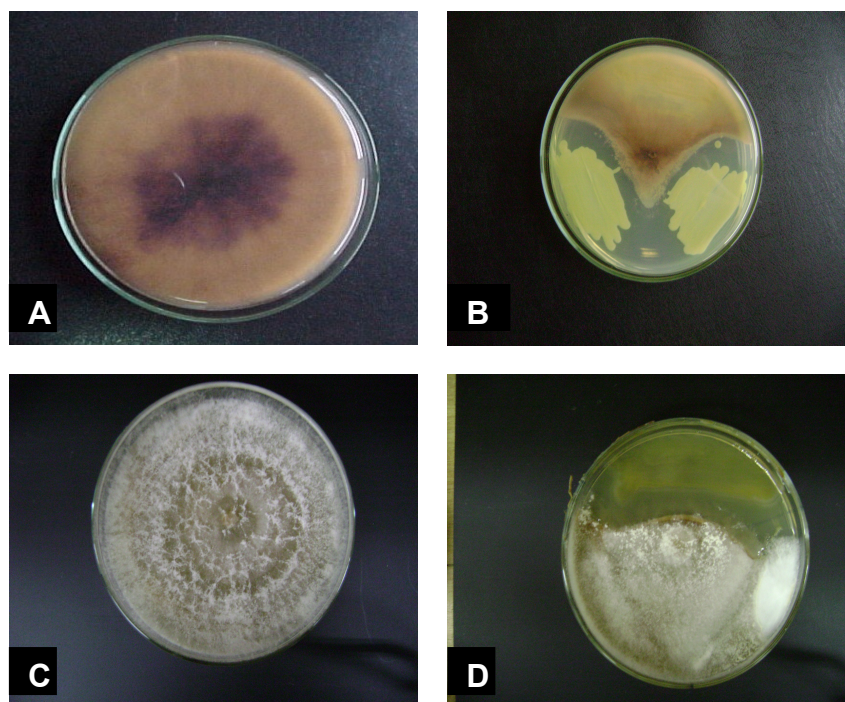


Figura 25: **A-** *R. solani* controle (crescimento em placa sem bactéria), **B-** *R. solani* na presença de 3 rizobactérias diferentes, a zona de inibição pode ser vista entre o fungo e 2 rizobactérias, **C-** *Sclerotinia sclerotiorum* controle (crescimento em placa sem a rizobactéria), **D-** *Sclerotinia sclerotiorum* na presença de 3 rizobactérias diferentes. A zona de inibição pode ser vista entre 1 das 3 rizobactérias e o fungo na placa.

Nas tabelas 25, 26 e 27 podemos observar que o gênero *Burkholderia* atuou contra todos os fungos testados, sendo o gênero que apresentou-se mais ativo, seguido dos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Pseudomonas*. O gênero *Beijerinckia* foi o menos atuante, capaz de inibir apenas *F. verticillioides* e *V. dahliae*.

Tabela 25: Atividade antifúngica (contra *R. Solani*, *V. Dahliae*, *F. Verticillioides*, *S. Sclerotiorum* e *C. falcatum*.) pelas linhagens rizobacterianas oriundas do Controle.

Estirpes ICBR	Gêneros Bacterianos	Fungos testados				
		<i>R. solani</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>F. verticillioides</i>	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>C. falcatum.</i>
091	<i>Beijerinckia</i>	-	+	+	-	-
170	<i>Beijerinckia</i>	-	-	-	-	-
177	<i>Beijerinckia</i>	-	-	-	-	-
015	<i>Burkholderia</i>	+	+	+	+	+
131	<i>Burkholderia</i>	-	+	+	+	-
187	<i>Burkholderia</i>	-	-	+	+	+
079	<i>Enterobacter</i>	-	-	-	+	-
098	<i>Enterobacter</i>	-	+	-	+	-
189	<i>Enterobacter</i>	+	+	+	-	-
003	<i>Klebsiella</i>	+	-	+	+	-
188	<i>Klebsiella</i>	-	+	-	-	+
199	<i>Klebsiella</i>	-	+	-	+	+
023	<i>Pseudomonas</i>	-	-	+	+	-
082	<i>Pseudomonas</i>	-	-	-	-	-
110	<i>Pseudomonas</i>	-	+	-	+	-
111	<i>Pseudomonas</i>	-	-	-	-	-

Tabela 26: Atividade antifúngica (contra *R. Solani*, *V. Dahliae*, *F. Verticillioides*, *S. Sclerotiorum* e

C. falcatum.) pelas linhagens rizobacterianas oriundas do tratamento Orgânico.

Estirpes ICBR	Gêneros Bacterianos	Fungos testados				
		<i>R. solani</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>F. verticillioides</i>	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>C. falcatum</i> .
55	<i>Beijerinckia</i>	-	-	-	-	-
88	<i>Beijerinckia</i>	-	+	-	-	-
119	<i>Beijerinckia</i>	-	-	-	-	-
38	<i>Burkholderia</i>	+	+	+	+	+
39	<i>Burkholderia</i>	+	+	+	+	+
73	<i>Burkholderia</i>	+	+	+	+	+
143	<i>Burkholderia</i>	+	-	+	+	+
123	<i>Enterobacter</i>	+	-	+	+	-
190	<i>Enterobacter</i>	-	-	-	+	-
193	<i>Enterobacter</i>	-	+	+	+	+
198	<i>Enterobacter</i>	-	+	-	-	-
200	<i>Enterobacter</i>	-	+	-	+	-
63	<i>Klebsiella</i>	-	+	-	+	-
115	<i>Klebsiella</i>	-	+	-	+	-
183	<i>Klebsiella</i>	+	-	-	+	-
195	<i>Pseudomona</i>	-	-	-	-	-
	<i>s</i>					
201	<i>Pseudomona</i>	-	+	-	+	-
	<i>s</i>					
203	<i>Pseudomona</i>	-	-	-	+	-
	<i>s</i>					

Tabela 27: Atividade antifúngica (contra *R. Solani*, *V. Dahliae*, *F. Verticillioides*, *S. Sclerotiorum* e *C. falcatum*.) pelas linhagens rizobacterianas oriundas do tratamento Convencional.

Estirpes ICBR	Gêneros Bacterianos	Fungos testados				
		<i>R. solani</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>F. verticillioides</i>	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>C. falcatum</i> .

48	<i>Beijerinckia</i>	-	+	-	-	-
136	<i>Beijerinckia</i>	-	+	-	-	-
176	<i>Beijerinckia</i>	-	-	-	-	-
37	<i>Burkholderia</i>	+	+	+	+	-
44	<i>Burkholderia</i>	+	+	-	+	-
53	<i>Burkholderia</i>	-	+	-	+	+
83	<i>Burkholderia</i>	+	+	+	+	+
19	<i>Enterobacter</i>	-	-	-	+	-
147	<i>Enterobacter</i>	-	+	+	+	+
161	<i>Enterobacter</i>	-	+	-	+	-
174	<i>Enterobacter</i>	+	+	+	+	-
46	<i>Klebsiella</i>	+	+	-	+	-
129	<i>Klebsiella</i>	+	+	-	+	+
210	<i>Klebsiella</i>	-	+	-	+	-
2	<i>Pseudomonas</i>	-	-	-	+	+
56	<i>Pseudomonas</i>	-	-	-	-	-
109	<i>Pseudomonas</i>	-	-	-	+	-
117	<i>Pseudomonas</i>	-	-	-	+	-
141	<i>Pseudomonas</i>	-	-	+	+	-
191	<i>Pseudomonas</i>	-	-	-	+	-
192	<i>Pseudomonas</i>	+	+	-	+	-
194	<i>Pseudomonas</i>	-	-	-	+	-

5 DISCUSSÃO

5.1 Isolamento das rizobactérias da cana-de-açúcar

Os ensaios de isolamento foram realizados ao longo do ciclo da cana-de-açúcar (cana-ano) em diferentes fases de crescimento da planta. Na fase inicial, que correspondeu aos cinco primeiros meses, ou seja, entre a primeira e terceira amostragem obtivemos maior número de estirpes, o que está de acordo com Gomes et al. (2001), com Von Der Weid et al. (2000) que trabalharam com isolamento de bactérias de milho em área tropical e com Ferreira et al. (2008) que isolaram bactérias de cultivares de batata. A exceção ocorreu com o gênero *Beijerinckia*, que foi isolado somente nas duas últimas amostragens. É provável que estas bactérias possam ter se beneficiado dos exsudatos que são liberados na fase de maturação da cultura, e/ou que possam ter ocorrido esporadicamente mudanças do clima que favoreceram maior liberação de sacarose radicular, o que poderia ter beneficiado o gênero *Beijerinckia*.

Pela técnica descrita em Material e Métodos foi possível isolar os gêneros escolhidos. Porém, os meios seletivos não foram capazes de isolar exclusivamente os gêneros para os quais foram descritos (item 3.1). No meio JMV, descrito para *Burkoldeira*, também isolamos *Enterobacter* e *Pseudomonas*. No meio King modificado, descrito para *Pseudomonas* também isolamos *Burkholderia* e *Enterobacter*. Nos meios LGD e LGI, que tinham também por objetivo isolar *Klebsiella* e *Enterobacter*, isolamos *Burkholderia* e *Beijerinckia*, e nenhuma estirpe pertencente ao gênero *Klebsiella*, que foi isolado somente nos meios NFb e JNFb. Os gêneros *Pseudomonas* e *Beijerinckia* também foram isolados nos meios NFb e JNFb. Assim, os meios “seletivos” não auxiliaram na seleção, nem favoreceram a predominância do gênero desejado, com exceção do meio King modificado, onde predominaram as *Pseudomonas* (Anexo A).

Os dados obtidos podem ser atribuídos a grande versatilidade nutricional microbiana, relacionada aos gêneros e às diferentes linhagens. Além disso, segundo Atkinson e Watson (2000), o ambiente rizosférico do qual são oriundas as rizobactérias deste estudo, é um meio propício às interações (raízes, solos, aspectos químicos, físicos e biológicos), e, conseqüentemente, isto poderia contribuir para o seu desenvolvimento nos diferentes meios de cultura, embora a maioria dos substratos encontrados comercialmente não reflitam a diversidade de substratos encontrados no meio ambiente natural (KONOPKA et al., 1998).

Das 900 colônias que foram isoladas, apenas um terço foi selecionado como diazotróficas, e o percentual de isolados de diazotróficas para cada tipo de tratamento não apresentou diferenças significativas, como pode ser observado na figura 2. Este dado é indicativo que a adubação não interferiu na seleção das diazotróficas, beneficiando ou prejudicando este potencial.

5.2 Identificação das estirpes

As estirpes foram identificadas utilizando-se três abordagens diferentes: testes bioquímicos, análise de seqüência parcial do gene 16S rDNA e perfil filogenético. Desta forma, foi possível propor a quais gêneros pertenciam as estirpes. Porém, em dois casos ocorreram contradições nos resultados das duas primeiras abordagens, e foram então acatados os resultados da identificação molecular.

5.2.1 Caracterização bioquímica das estirpes

As características bioquímicas das estirpes foram utilizadas para direcionar a uma pré-identificação para selecionar os cinco gêneros escolhidos para este estudo. A utilização de substrato é considerada a chave para a sobrevivência, crescimento e competitividade de microrganismos. A grande faixa de compostos disponíveis ao metabolismo e as exigências específicas dos microrganismos fizeram com que se testasse a utilização de diferentes substratos como fator de discriminação e identificação. A capacidade dos microrganismos utilizarem (ou não) diferentes substratos pode indicar sua diversidade funcional (ZAK et al., 1994; HEUER; SMALLA, 1997). Esses resultados são mostrados nas tabelas 9 a 14. Duas estirpes ICBR 187 e 44 das tabelas 10 e 14 (API-20NE) foram indicativas pelas provas bioquímicas como pertencentes ao gênero *Pseudomonas*. Esses resultados são contraditórios quando comparados com o método de biologia molecular através do seqüenciamento do gene 16S rDNA, no qual estas mesmas estirpes foram identificadas como *Burkholderia*. O provável motivo para que isto possa ter ocorrido é que o sistema de identificação bioquímico utilizado é indicado para isolados clínicos, podendo não abranger um número suficiente de características para identificação. Alguns autores já relataram dificuldades na identificação de bactérias com sistemas do tipo API em

isolados clínicos não usuais ou novos (FONTANA et al., 2005; BUSSE et al., 1996). Petti et al. (2005) e Christensen et al. (2001) também afirmaram que a caracterização fenotípica convencional nem sempre é capaz de concluir uma identificação. Além disso, várias espécies do gênero *Pseudomonas* foram renomeadas (PALLERONI, 1993), com base na sua composição celular, seqüenciamento do 16S rDNA, homologia DNA:DNA e características fenotípicas. Com base nisto, várias linhagens foram transferidas para o gênero *Burkholderia* (YABUUCHI et al., 1992). Wellinghausen et al. (2005), identificou espécies de *Pseudomonas* e *Burkholderia*, confrontando ensaios bioquímicos como API-20NE com métodos moleculares, em amostras recuperadas de pacientes com fibrose cística. A sensibilidade do método molecular foi de 98,1% contra 84% do API-20NE. Também Bosshard (2006) confrontando as duas metodologias (16S rDNA e API 20NE) encontrou discrepâncias na identificação de diversos isolados, dentre eles, *Pseudomonas* e *Burkholderia*.

5.2.2 Análises do seqüenciamento do gene 16S rDNA

As seqüências obtidas foram alinhadas e identificadas como descrito no item 3.6, e apresentados na tabela 16. Comparando-se estas seqüências com a base de dados (NCBI), foram observadas similaridades destas, com seqüências já depositadas no banco de dados. Os percentuais de similaridade, das seqüências que tinham entre 555 a 904pb, variaram de 97 a 100%.

As análises das seqüências parciais do gene 16S rDNA das estirpes rizobacterianas de cana-de-açúcar permitiram a sua classificação em 3 grupos taxonômicos (Gama, Beta e Alfa das Proteobactérias) mostrados na tabela 15.

5.2.3 Análises filogenéticas

As análises filogenéticas foram realizadas a fim de ajudar na correta identificação das estirpes. Essas análises foram feitas a partir das seqüências da região hipervariável do 16S rDNA (WOESE, 1987).

As árvores foram elaboradas com as seqüências das estirpes identificadas e com as seqüências do Genbank de melhor similaridade (Tabela 16). Estas análises

confirmaram os resultados de homologia de seqüência e dos testes bioquímicos aplicados (Figuras 5 a 7).

Na figura 5 é mostrada a árvore filogenética dos gêneros *Pseudomonas* e *Beijerinckia*. As estirpes se agruparam divididas em dois clados, confirmando as identificações que foram feitas pelos testes bioquímicos e pelo gene 16S rDNA.

O gênero *Pseudomonas* é de distribuição mundial, conhecido por sua grande versatilidade metabólica (MERCIER e LINDOW, 2000), o que permite que estas bactérias colonizem os mais diferentes ambientes (MISKO e GERMIDA, 2002). Já foram encontradas na rizosfera de canola, trigo, batata, arroz, etc. (MERCIER e LINDOW, 2000; VERMA et al., 2001), endofiticamente em várias espécies de vegetais (SESSITCH et al., 2002; VERMA et al., 2001; ZINNIEL et al., 2002; MOCALI et al., 2003), na superfície de plantas (ESPINOSA-URGEL, 2004).

As linhagens de *Pseudomonas sp.* (AB461642 e AB369341) são endofíticas isoladas de soja no Japão, quatro de nossas estirpes se agruparam a elas (ICBR 191, 082, 109 e 117). A linhagem *Pseudomonas sp.* (FJ 493140) foi isolada na China, está envolvida em estudos de lama ativada para tratamento de água; nossa estirpe ICBR 201 se agrupou a ela. A linhagem *Pseudomonas sp.* (FJ 646635) esta envolvida em estudos ambientais com água na Nova Zelândia, nossa estirpe ICBR 110 se agrupou a ela. A linhagem *Pseudomonas sp.* (EU747694) foi isolada de rizosfera em pântano no México; cinco de nossas estirpes se agruparam a ela (ICBR 141, 194, 195, 111 e 192). A linhagem *P. azelaica* (FJ 227303) foi isolada de solo na França, quatro de nossas estirpes se agruparam a ela.

Beijerinckia indica é abundante em raízes e em amostras de solo (DÖBEREINER et al., 1972). São bactérias diazotróficas de vida livre e já foram encontradas em diferentes partes do mundo, como: China, África, Austrália, Ásia e em todas as Américas. No Brasil foram encontradas em diversos tipos de solos e parecem ter prevalência em canaviais (DÖBEREINER et al., 1988). Nossas estirpes ICBR 091, 088, 199 e 048 se agruparam com uma linhagem de *B. indica* isolada na Alemanha e as estirpes ICBR136, 076 e 055 com *B. indica* -AB119196 e ICBR 117 e 170 com *B. indica*- AB119199 isoladas de solo na Tailândia.

A similaridade de seqüências indica uma origem comum de genes, e, neste grupamento, todas as seqüências são de origem ambiental.

Na figura 6 é mostrada a árvore filogenética dos gêneros *Burkholderia* e *Klebsiella*. As estirpes pertencentes a esses dois gêneros se agruparam em clados

diferentes com as respectivas linhagens de melhor semelhança do Genbank. No clado onde se agruparam *Burkholderia* ocorre a formação de dois ramos (dois subclados), como já foi descrito por Coenye e Vandamme (2003). O primeiro ramo é composto por *B. caribensis*- AY586519 (endofítica de cana-de-açúcar no Brasil), por *B. tropica*- EU827472 (isolada de solo na Dinamarca), e por *Burkholderia sp*- EU399932 (nódulo de raiz na China), com as quais se alinham 4 estipes ICBR 044, 131, 015 e 143; no segundo subclado; composto por *B. cepacea* -AY741352 (Cepa de coleção, estudos clínicos e ambientais nos Estados Unidos), *Burkholderia sp.* - EU677416 (Isolada de solo agrícola nos Estados Unidos) e *B. gladioli* - EU678361 (Isolada cogumelos na Korea), alinham-se as estirpes ICBR 53, 187, 38,39, 37, 83 e 73.

Burkholderia caribensis foi descrita por Achouak et al. em 1999, como um grupo produtor de exopolissacarídeos, isolada de vertisol na ilha da Martinica. *B. tropica* descrita por Weber et al., 1999; Cruz et al., 2001; Reis et al., 2004, foi encontrada em associação com diferentes cultivares de bananeiras, abacaxizeiros e arroz. Também já foram isoladas de rizosfera, rizoplano e raízes de cana-de-açúcar (CABALLERO-MELLADO et al., 2004; BODDEY, 2003). Características importantes, como a capacidade de formar nódulos, foram descritas para as linhagens diazotróficas de *Burkholderia* isoladas de leguminosas (MOULIN et al., 2001). O segundo ramo inclui *B. cepacea* e *B. gladioli* normalmente envolvidas em patologias. Embora filogeneticamente bem definido, o gênero *Burkholderia* é um gênero funcionalmente diverso. O conteúdo molecular e fisiológico desta diversidade e sua adaptabilidade são em grande parte desconhecidos (COENYE e VANDAMME, 2003). Além disso, pouco se sabe sobre os fatores que determinam a virulência, sugerindo que uma identificação correta pode representar a primeira fase para a avaliação de risco e controle da infecção. A maioria dos genomas de espécies de *Burkholderia* (incluindo o complexo de espécies *B. cepacea*, *B. glumae*, *B. glathei*, *B. gladioli* e sp. LB400) consistem de duas a quatro réplicas circulares (CHENG e LESSIE, 1994; RODLEY et al., 1995; LESSIE et al., 1996; WIGLEY e BURTON, 2000; PARKE e GURIAN-SHERMAN, 2001; COENYE e VANDAMME, 2003). Além disso, várias espécies de *Burkholderia* abrigam uma ampla gama de inserções genéticas, que podem estar envolvidas em rearranjos genômicos e na regulação da expressão genética (LESSIE et al., 1996; TYLER et al., 1996; COENYE e VANDAMME, 2003).

No presente trabalho, as estirpes (ICBR 037, 083 e 073) se agruparam com a linhagem de *B. cepacea*- AY741352, que é uma linhagem de coleção, envolvida em

estudos ambientais e clínicos, porém, estudos de comparação fenotípica, entre estirpes de *Burkholderia cepacea*, isoladas de rizosfera e de ambientes hospitalares, revelaram que apenas as estirpes de rizosfera foram capazes de fixar nitrogênio, crescer numa ampla faixa de temperatura, produzir ácido 3-indol acético e sideróforos, além de apresentar atividade antagônica contra vários fungos fitopatogênicos (Bevivino et al., 1994).

A linhagem de *B. gladioli* - EU678361 foi isolada de cogumelos com “podridão mole” e a estirpe ICBR 053 apresentou similaridade com esta linhagem. Reiter et al. (2000), utilizando linhagens de *B. gladioli* oriundas de seringueira (*Hevea brasiliensis*), de mandioca (*Manihot esculenta*) e de bananeira (*Musa* sp), constataram uma homologia significativa entre as enzimas produzidas pelas bactérias e pelos vegetais dos quais foram isoladas. Weber et al. (2000) trabalhando com *B. Gladioli* diazotrófica isolada de bananeiras (*Musa* spp.) avaliaram sua influência no crescimento de mudas micropropagadas. A bananeira cv. caipira cresceu melhor com os inóculos de *Burkholderia*. É possível uma espécie microbiana possa promover o crescimento de determinada variedade vegetal podendo, por outro lado, ser patogênica para outra variedade de planta.

O gênero *Klebsiella* é encontrado em solos de todo o mundo. A colonização por *Klebsiella* pode ser benéfica para a planta, uma vez que algumas espécies do gênero são fixadoras de nitrogênio como *K. pneumoniae* e *K. oxytoca*, encontradas em uma grande variedade de plantas (KOVTONOVYCH et al., 1999; KAVANAGH et al., 1993), inclusive em raízes de cana-de-açúcar (RENNIE et al., 1982). Iniguez et al. (2004) constataram que *K. pneumoniae*, originalmente isolada de plantas de milho, foi observada no interior das raízes de plantas de trigo, suprindo suas necessidades de N, e em variedades de batata doce africana (DONG et al., 2003a). Uma de nossas estirpes (ICBR 188) se agrupou a *K. pneumoniae* – AJ508695; esta linhagem foi isolada de ambiente doméstico, e está relacionada com infecções hospitalares. O fato da linhagem ICBR 188 ter se agrupado com uma cepa patogênica sugere que são necessários maiores conhecimentos sobre os fatores que determinam a virulência desta cepa bacteriana, antes que a mesma seja descartada, já que esta possui inúmeras características como promotora de crescimento vegetal. As demais linhagens que se agruparam neste estudo estão relacionadas a trabalhos ambientais como: *K. oxytoca* EU931550 isolada da rizosfera de cana-de-açúcar na China, a qual se agrupou com nossa estirpe ICBR129, *K. pneumoniae* - FJ796201 isolada de solo na China, à qual se agruparam nossas

estirpes ICBR 183, 199 e 003, *Klebsiella sp* -FM164637 isolada de solo agrícola na Índia, à qual se agruparam nossas estirpes ICBR 210, 115 e 046 e *K. pneumoniae* EU302848 isolada da rizosfera de milho nos Estados Unidos à qual se agrupou nossa estirpe ICBR063.

A figura 7 mostra a árvore filogenética das estirpes identificadas como *Enterobacter*. Muitos trabalhos científicos têm dado destaque à promoção de crescimento vegetal, proporcionada por este gênero bacteriano, o qual já foi isolado de várias culturas, como plantas cítricas, batata doce, soja, milho e cana-de-açúcar, este gênero possui a habilidade de fixar nitrogênio e produzir fitormônios e antagonismo a fitopatógenos (ARAUJO et al., 2002; ZINNIEL et al., 2002; KUKLINSKY-SOBRALE et al., 2004; ASIS e ADACHI, 2003; RENNIE, 1982).

Mayeux (1960) realizou o primeiro trabalho mostrando a presença dessas bactérias em cana-de-açúcar e Rennie et al. (1982) descreveram sua dominância neste vegetal. Nossas estirpes se agruparam com isolados ambientais ligados à agricultura. As estirpes ICBR 193, 161, 174, 189 e 200 se agruparam com *Enterobacter sp*. EU784139 isolada de solo na China, as estirpes ICBR 019, ICBR079 e 098 se agruparam com *Enterobacter sp*. DQ923475 e DQ923474, linhagens endofíticas também chinesas, as estirpes ICBR 198 e 190 se agruparam com a linhagem *E. asburiae* AJ506159 endofítica de batata doce no Japão, e a estirpe ICBR 123 se agrupou com *E. asburiae* EU301774 isolada de solo agrícola na China. A estirpe ICBR 147 que se agrupou próxima a um isolado contaminante de água (*Enterobacter sp*. AB308444), em trabalho desenvolvido no Japão. Este é um gênero que predomina sobre os demais causadores de patologias ao homem, além de ser também oportunista [contaminante da água, alimentos, equipamentos médicos e soluções parenterais] (TRABULSI, 2005). Maiores estudos que contemplem genética e fatores de virulência poderiam selecionar cepas adaptadas exclusivamente ao ambiente agrícola, pois inúmeros trabalhos têm relatado o potencial desse gênero como promotor de crescimento de plantas, como já foi observado com o gênero *Burkholderia* (WIGLEY e BURTON, 2000; COENYE e VANDAMME, 2003).

5.3 Atividade específica da enzima nitrogenase

O potencial para fixação do N₂ atmosférico foi avaliado pelo crescimento das bactérias em meio de cultura livre de N combinado (KUSS et al., 2007), pela atividade de redução do acetileno. As rizobactérias deste estudo foram selecionadas pela metodologia do ARA, aplicada logo após isolamento (em 2006) para selecionar diazotróficas (teste qualitativo que indica atividade da nitrogenase).

Todas as estirpes deste trabalho cresceram em meios livres de nitrogênio, evidenciando a atividade da nitrogenase.

Dobbelaere et al. (2003) em revisão sobre “Crescimento de plantas promovido pelos efeitos de diazotróficas na rizosfera”, mencionaram como um grande obstáculo para a preparação do artigo, a falta de informações sobre a capacidade de fixação de N₂ dos microrganismos citados nos trabalhos. Neste trabalho procurou-se, através das curvas de atividade específica da nitrogenase, evidenciar esta característica nas bactérias em estudo.

Os estudos sobre quantificação da FBN associada à cana-de-açúcar começaram no início dos anos setenta, aplicando-se as técnicas de redução de acetileno com bactérias aderidas a raízes de cana-de-açúcar (DÖBEREINER et al., 1972), diluição isotópica de ¹⁵N (FREITAS et al., 1984; URQUIAGA et al., 1992), balanço de Nitrogênio total do sistema solo-planta (LIMA et al., 1987; BODDEY et al., 1995) e abundância natural de ¹⁵N (POLIDORO et al., 2000; BODDEY et al., 2001; XAVIER, 2002). Ficou evidente que cada metodologia possui vantagens e desvantagens em relação às outras.

O ensaio da redução de acetileno (ARA) é o método amplamente utilizado por causa de sua simplicidade e baixo custo. A grande limitação deste método reside no fato de medir a atividade da nitrogenase utilizando o acetileno como substrato, portanto, diferente do substrato natural e não revela nenhuma informação sobre o N incorporado na planta (BODDEY, 1987; BODDEY et al., 1995). Entretanto, Hoefsloot et al. (2005) evidenciaram correspondência entre resultados obtidos pelo ARA e de incorporação de ¹⁵N. A análise por cromatografia gasosa foi adequada para a detecção de pelo menos 0.63 μmol L⁻¹ de etileno. Assumindo que a redução de acetileno é quatro vezes mais rápida que a redução do N₂ (BODDEY, 1987), os autores propuseram que essa quantidade de etileno corresponderia a um aumento de 0,003% do N total em um tecido em incubação (HOEFSLOOT et al., 2005).

Para os objetivos do presente trabalho, o teste de redução de acetileno foi importante, pois, os resultados obtidos com os cinco gêneros estudados nos permitiram observar a diversidade destas rizobactérias em relação a esta característica.

Em 2008, após criopreservação, as estirpes foram reativadas e submetidas a ensaios de atividade específica da nitrogenase. Para tanto, foram realizadas curvas de atividade em função do tempo de cultura concomitantes a determinações do crescimento populacional. Essas análises mostraram que havia uma grande diversidade na quantidade de etileno formado, mesmo entre linhagens pertencentes ao mesmo gênero. Cinquenta e dois por cento das rizobactérias em estudo apresentaram atividade da enzima nitrogenase por esta metodologia (Tabela 17 e Anexo B).

Todas as estirpes de *Beijerinckia* estudadas neste trabalho apresentaram independente dos tratamentos de origem, elevada atividade da enzima nitrogenase, com picos em torno de 100 a 250 fmol etileno. h⁻¹. UFC⁻¹. Os períodos em que a atividade da enzima foi detectada variaram de 25 às 30h. Todas as linhagens de *Beijerinckia* mantiveram a capacidade de redução de acetileno, independente de serem subcultivadas. Na década de 1970, a introdução da metodologia de redução de acetileno estimulou estudos envolvendo *Beijerinckia* e cana-de-açúcar, pois essa bactéria foi encontrada em abundância na rizosfera de canaviais (DÖBEREINER et al., 1972a) e os dados indicam que esse gênero pode contribuir com até 50 kg N/ha/ano para cultura de cana-de-açúcar (BALDANI e BALDANI 2005). Trabalhando com culturas de *B. derxii*, Thuler et al. (2003) determinaram a atividade da nitrogenase “*in vitro*” pelo método de ARA. Os autores obtiveram valores menores que os apresentados neste trabalho, porém, a enzima mostrou-se ativa por um período de tempo maior (130 h).

A segunda melhor atividade da enzima nitrogenase neste trabalho foi observada entre as linhagens do gênero *Klebsiella*. A bactéria *Klebsiella pneumoniae* é considerada o organismo modelo na genética da fixação de nitrogênio. Estudos genéticos, bioquímicos e fisiológicos, utilizando o sistema de fixação de nitrogênio em *K. pneumoniae*, possibilitaram a formulação de uma serie de conceitos básicos relativos aos processos mais relevantes na regulação da expressão da nitrogenase (HOWARD e REES, 1994). Na literatura são descritos inúmeros trabalhos com *Klebsiella* proporcionando crescimento vegetal. Chelius e Triplet (2000) estudou *K. pneumoniae* em raízes de milho, e documentaram a promoção de crescimento por esta bactéria fixadora de nitrogênio. Yasmin et al., 2007 inocularam *Klebsiella* sp. em batata doce e observou que ocorreu uma diferença de 33 kg a mais de N em relação ao controle (sem

a bactéria). Outras estirpes da família Enterobacteriaceae pertencentes ao gênero *Enterobacter*, aqui estudadas também apresentaram perfis das curvas de redução de acetileno muito semelhantes aos obtidos com *Klebsiella*. Mirza et al. (2001) identificaram *Enterobacter cloacae* e *Klebsiella oxytoca* isoladas de cana-de-açúcar, e determinaram sua capacidade de fixar N₂ pelo método de ARA. Também Haahtela et al. (1981) fizeram uma comparação de atividade de fixação de N₂ de bactérias associadas a raízes de *Poacea*, utilizando o método de ARA. Dentre os isolados, os autores identificaram espécies de *Enterobacter agglomerans* e *Klebsiella pneumoniae*. Esses dados confirmam o potencial de fixação de nitrogênio por estes gêneros e o uso habitual da metodologia do ARA. Entretanto, o ARA tem sido usado com frequência para determinar a atividade qualitativa da nitrogenase. Em nossas pesquisas não encontramos nenhum trabalho que determinasse a atividade quantitativa dessa enzima por esta metodologia, para que possibilitasse comparações.

Os gêneros *Pseudomonas* e *Burkholderia* foram isolados da rizosfera de diversos vegetais incluindo cana-de-açúcar. São descritos como fixadores de nitrogênio e excelentes promotores de crescimento vegetal (BALDANI, 1996). No presente trabalho, deparamos com resultados surpreendentes: após a criopreservação e reativação essas linhagens apresentaram baixa capacidade de redução de acetileno (apenas 9% das estirpes identificadas como *Burkholderia* e 46% das estirpes de *Pseudomonas*). Embora, não tenha sido possível detectar a atividade da nitrogenase pelo método de ARA em várias estirpes após a reativação, foi possível determinar o desenvolvimento populacional através das curvas de crescimento em meios desprovidos de fonte de nitrogênio combinado, o que evidencia a atividade da nitrogenase para a redução do nitrogênio (item 8.2 e Anexo B).

Os tempos de geração de todas as curvas foram calculados. Quando comparados, observou-se que, em vários casos (*Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Burkholderia*) culturas incapazes de reduzir acetileno apresentaram elevados números de geração (item 8.2-Anexo B). Além de a fisiologia bacteriana ser extremamente diversificada também é pouco conhecida. Assim uma mesma espécie subdividida em diferentes linhagens, pode apresentar características fisiológicas diferentes, como: capacidade de consumo de determinados nutrientes, atividades enzimáticas distintas, etc. Além disto, a manutenção dos microrganismos (manuseios laboratoriais), como: criopreservação, reativação, repiques, podem afetar a fisiologia bacteriana (SIMIONE, 1998).

Segundo a literatura células diazotróficas podem apresentar a nitrogenase clássica, a Mo-Fe nitrogenase e outras alternativas como Fe-Fe nitrogenase e Va-Fe nitrogenase (EADY, 1996). No presente trabalho, o crescimento populacional das rizobactérias que não foram capazes de apresentar capacidade de redução de acetileno após a criopreservação, poderia ser atribuído à ativação de nitrogenases alternativas. Entretanto, como estas enzimas apenas são expressas na carência de Mo, neste trabalho, fica difícil se propor a substituição da Mo-Fe nitrogenase, por uma das nitrogenases alternativas, pois, não se detectou atividade de redução de acetileno desde o início das culturas, quando o meio ainda apresentava todo o conteúdo de Mo que foi adicionado. Além disso, no meio não foi acrescentado vanádio, impedindo assim, a síntese da Va-Fe nitrogenase.

5.3.1 Detecção do gene *nifH*

A presença de gene *nifH* foi então pesquisada como outra forma de avaliar o caráter diazotrófico das bactérias. A técnica de PCR foi usada para amplificação do gene *nifH*, que codifica para a subunidade Fe-proteína da enzima nitrogenase. Este é o gene marcador mais utilizado para detectar diazotólicas (ZEHR et al., 2003).

O gene *nifH* de todas as linhagens estudadas foi amplificado com a utilização de dois pares de oligonucleotídeos. A amplificação já era esperada, pois no ensaio de isolamento foram selecionadas apenas as estirpes capazes de reduzir o acetileno.

Cada par de oligonucleotídeos utilizado mostrou especificidade apenas para uma parte das estirpes. Com a utilização dos oligonucleotídeos PPR e PPF – foi amplificado o gene *nifH* de 20 linhagens, com predominância dos gêneros *Burkholderia* e *Pseudomonas*, enquanto que, com a utilização dos oligonucleotídeos PolR e PolF – foram amplificados o gene *nifH* de 36 linhagens com predominância das *Beijerinckia*, *Enterobacter* e *Klebsiella* (Tabela 18). As linhagens que tiveram o gene *nifH* amplificado com os oligonucleotídeos PPR e PPF, não o tiveram com os PolR e PolF, e vice-versa. Isto indica que as estirpes rizobacterianas deste estudo possuem seqüências diferentes, o que está de acordo com trabalho feito por Zehr et al. (2003) que mostrou que o gene *nifH* apresentava diferentes seqüências de nucleotídeos entre e dentro diferentes espécies. Izquierdo e Nusslein (2006) utilizando apenas seqüências do gene *nifH*, estimaram a riqueza de espécies de bactérias diazotróficas no solo, detectando cerca de 21 espécies em um solo de floresta tropical, 20 espécies em região de tundra

Ártica e 12 em solo de pastagem em clima temperado. Hamelin et al. (2002) trabalhando com 77 seqüências do gene *nifH* observaram que 70 seqüências não apresentaram nenhuma similaridade, já Diallo et al. (2004) comparando 33 seqüências do gene *nifH* observaram 29 grupos com 100% de similaridade. Contudo, nossos experimentos foram bem sucedidos, pois diante de toda a diversidade descrita na literatura conseguimos amplificar todos os genes *nifH* das rizobactérias deste estudo com apenas 2 pares de oligonucleotídeos iniciadores e o crescimento das culturas em meios isentos de nitrogênio combinado, confirma o caráter diazotrófico de todas as estirpes aqui estudadas.

5.4 Excreção de Aminoácidos

Os aminoácidos figuram entre os componentes mais importantes do metabolismo dos organismos vivos. São as unidades estruturais básicas que compõem os peptídeos, proteínas, sendo também precursores de outras moléculas como: hormônios, coenzimas, nucleotídeos, etc.

Há aminoácidos que são preponderantes na composição das proteínas vegetais, como metionina, lisina, glicina e ácido glutâmico. Há, também, funções particulares, em que aminoácidos específicos estão presentes, como, por exemplo, a glicina, o ácido glutâmico, a asparagina e o glutamato (TAIZ e ZEIGER, 2004).

As rizobactérias deste estudo foram capazes de produzir e excretar consideráveis quantidades de aminoácidos em meios sintéticos. Onze diferentes aminoácidos foram liberados para os meios. Nossos experimentos mostraram que: a estirpe ICBR200 *Enterobacter* excretou 379,56 $\eta\text{g/ml}^{-1}$ de metionina, o principal precursor do hormônio etileno que participa na regulação do crescimento, no desenvolvimento e senescência (REID, 1989; TOMLIN, 1994). Na cana-de-açúcar, o etileno estimula o crescimento das raízes, aumenta o número de perfilhos, inibe a florescência e estimula o acúmulo de sacarose nos colmos durante a maturação (LI e SOLOMON 2003; CAPUTO, 2007).

A estirpe ICBR 56 do gênero *Pseudomonas* foi capaz de excretar para o meio 476,04 $\eta\text{g/m}^{-1}$ do aminoácido arginina. O aminoácido arginina age como um eficiente promotor de enraizamento em toletes de cana-de-açúcar, causando ainda emergência precoce das gemas (KANG et al., 2009; NETTO, 2006).

A glicina foi outro aminoácido excretado em maior concentração que os demais, 323,07 $\eta\text{g/ml}^{-1}$, foi excretado pela estirpe ICBR 177 do gênero *Beijerinckia*. Nas plantas, este aminoácido está envolvido na síntese da clorofila, e as plantas o absorvem com maior eficiência que as bactérias (LIPSON et al., 1999).

Neste trabalho duas linhagens de enterobactérias (ICB 200 e ICBR 19) liberam glutamato. O glutamato, um aminoácido-chave no crescimento e funcionamento dos meristemas, também desempenha papel fundamental no do metabolismo do nitrogênio, pois é o primeiro composto formado na assimilação desse elemento, formando as amidas glutamina e asparagina, que promovem a conexão entre o ciclo do carbono e do nitrogênio nas plantas, influenciando a síntese de açúcares e de proteínas, entre outros. É a partir destas amidas que ocorre o transporte de N para os diferentes órgãos da planta (RENTSCH et al., 2007).

As figuras 14, 18 e 16 mostram que os gêneros *Beijerinckia*, *Pseudomonas* e *Enterobacter* foram os gêneros excretadores de maior diversidade de aminoácidos. Em nossas pesquisas não encontramos na literatura dados que descrevessem essas bactérias como excretoras de aminoácidos, exceto *Beijerinckia* que foi estudada por Pati et al. (1994) e Thuler et al. (2003), em comparação com nossos resultados esses autores mostraram que *Beijerinckia indica* e *Beijerinckia dextrii* foram capazes de liberar maiores concentrações e diversidade de aminoácidos em meios de cultura livre de nitrogênio.

Nossos resultados sugerem que houve liberação ativa de aminoácidos pelas rizobactérias deste estudo. Esta suposição é baseada nos seguintes dados:

- 1) A detecção dos aminoácidos foi feita após 100 h de incubação, a contagem de UFC mostrou um aumento no número de células viáveis indicando crescimento da cultura. Com 200 h de incubação os aminoácidos não foram detectados sugerindo que as bactérias os consumiram.
- 2) Onze diferentes aminoácidos foram liberados em concentrações diferentes por diferentes estirpes. Se a liberação estivesse associada à lise celular, o número de células viáveis estaria diminuído e a diversidade de aminoácidos seria maior.

Em 59% das linhagens não detectamos a liberação de aminoácidos, entretanto é possível que essas linhagens os tenham produzido com menor tempo de incubação e os reutilizado. González-López (2005) detectou a produção de aminoácidos em cultura de *Rhizobium* com 48 h de incubação, e Revillas (2005) detectou aminoácidos produzidos

por *Azotobacter* com 72 h de incubação. Thuler et al., 2003 detectou os aminoácidos produzidos por *B. derxii* com até 240 h de incubação. Esses dados sugerem que diferentes linhagens bacterianas podem produzir “*in vitro*” diferentes aminoácidos em diferentes tempos de incubação e reutiliza-los de acordo com suas necessidades.

Os aminoácidos participam da escala de diversidade das funções na rizosfera, processos estes que são benéficos às plantas. É provável que as reações que envolvem aminoácidos variem ambos espacial e temporal na rizosfera com as mudanças de muitos fluxos simultaneamente (JONES, 1998). Toda a evidência disponível sugere que no solo, a microbiota diazotrófica, em condições de fixar N₂, desempenhe melhor seu potencial. Na natureza as rizobactérias são influenciadas por muitos fatores que são difíceis de reproduzir sob condições de laboratório: a rizosfera, as interações microbianas, o clima, etc.

Os fertilizantes orgânicos usados nas culturas de cana-de-açúcar (torta de filtro e vinhaça), têm concentrações elevadas de carbono que é um fator determinante para a produção qualitativa e quantitativa de aminoácidos pelos microrganismos da rizosfera. A disponibilidade da concentração de carbono é um fator que afeta drasticamente o crescimento e as atividades biológicas das bactérias na natureza (MORENO et al., 1999). Nossos resultados não mostraram diferenças significativas entre a liberação de aminoácidos pelas rizobactérias e seus tratamentos de origem.

5.5 Solubilização de fosfato

Os microrganismos podem contribuir para a solubilização do fósforo por produção de ácidos ou através da atividade das enzimas fosfatases que hidrolisam o P-orgânico, como fitatos, fosfolipídios e ácidos nucléicos, liberando o fósforo em formas de assimilação fácil e imediata, sendo tal processo conhecido como mineralização (NAHAS; TEREZI; ROSSI, 1982).

Neste trabalho as rizobactérias provenientes da cana-de-açúcar submetida a tratamento orgânico apresentaram potencial inferior para a solubilização de fosfato, tanto em relação à cana-de-açúcar “controle”, como também em relação à cana-de-açúcar com tratamento convencional.

O enunciado acima pode justificar, em parte, esses resultados, pois o tratamento denominado “orgânico”, neste trabalho, contribui com altos teores de P para o solo,

através da torta de filtro e rocha fosfato. Além disso, a acidificação do meio, resultante da atividade de decomposição da matéria orgânica (MARSCHNER, 1995), permite que a solubilização dos fosfatos se dê independentemente da demanda específica de fósforo e passa a ser proporcional às quantidades disponíveis de matéria orgânica a ser degradada (BRANCO; MURGEL; CAVINATTO, 2001).

As rizobactérias provenientes do tratamento convencional, baseado na aplicação de NPK, apresentaram resultados mais elevados, o que pode ser atribuído ao fornecimento de fosfato inorgânico (adubação), bem como as rizobactérias oriundas do controle, onde a disponibilidade de P se restringia ao conteúdo do solo.

Todavia, os experimentos realizados “*in vitro*” não contam com o contexto existente nos tratamentos de origem.

Em laboratório o argumento viável seria a ativação (ou não ativação) de genes, que nas bactérias que auxiliaria o acesso aos minerais disponíveis no meio (GOLDSTEIN, 1986). Portanto, ferramentas de genética moleculares têm sido utilizadas para se entender a base genética da solubilização de fosfato; característica fenotípica conferida pelo gene *mps* (*mineral phosphate solubilization*) (BABU-KHAN et al., 1994). Sabe-se que algumas bactérias Gram-negativas possuem a capacidade de solubilizar fosfato de cálcio ou rocha. Tais microrganismos que apresentam este fenótipo (*Mps*) têm despertado grande interesse entre microbiologistas ligados à agricultura e ecologistas, por apresentarem esta característica, consequentemente aumentando a disponibilidade de Pi para plantas e microrganismos. Recentemente tem-se mostrado que o fenótipo *Mps*, exibido por *Erwinia herbicola* e *Pseudomonas cepacea*, está associado com a produção de ácidos orgânicos, como por exemplo, o ácido glicônico, que medeia à dissolução do fosfato de cálcio (BABU-KHAN et al., 1994).

Chabot et al. (1998) introduziram a capacidade de solubilização em microrganismos que não expressavam essa característica, obtendo resultados positivos em relação ao crescimento vegetal. Mas, não podemos esperar que a solubilização de fosfatos seja expressa por um único gene ou por um grupo de genes e que seja comum a todos os microrganismos solubilizadores (NARLOCH, 2002).

Outro dado importante a ser considerado é baseado no trabalho de Holford (1997), que afirma que são documentadas 170 formas minerais de Pi. Neste trabalho utilizamos apenas uma das formas, o $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, e nossos resultados mostram que nem todas as bactérias foram capazes de utilizar esta forma de fosfato. Considerando a

disponibilidade de fosfatos em quantidade e qualidade nos tratamentos de origem (orgânico, convencional e controle) é provável que as características genéticas expressas por diferentes vias de solubilização justifiquem os resultados obtidos em relação aos tratamentos.

O gênero *Burkholderia* foi a exceção, que independente do tratamento a que foi submetida a cana-de-açúcar, apresentou alto potencial para solubilização deste tipo de fosfato seguido do gênero *Enterobacter*, ambos já descritos na literatura como excelentes solubilizadores de fosfato (RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999; SITEPU et al., 2007). Estirpes do gênero *Pseudomonas* estão entre as bactérias mais eficientes na solubilização de P (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999; FANKEM et al., 2008). Neste trabalho, seis em oito linhagens desse gênero, provenientes do tratamento convencional foram positivas. Entretanto nossos dados mostram que linhagens pertencentes ao mesmo gênero provenientes de rizosfera com o mesmo tratamento, nem sempre apresentaram resultados iguais, isto é, algumas solubilizaram fosfato e outras não (por ex. *Pseudomonas*: ICBR 23 e ICBR 110). A literatura também descreve que o gênero *Klebsiella* tem alto potencial para solubilização de fosfato (SITEPU et al., 2007), mas em nossos ensaios somente as linhagens provenientes do tratamento convencional e controle demonstraram esse potencial. As diferenças fisiológicas observadas dentro de linhagens de um mesmo gênero podem estar relacionadas a diferenças genotípicas de cada espécie ou cepa.

Nove linhagens do gênero *Beijerinckia* pertencentes aos 3 tratamentos foram testadas e nenhuma apresentou potencial para solubilizar fosfato. Também em nossas pesquisas não encontramos na literatura nenhum dado sobre solubilização de fosfato por *Beijerinckia*. Todavia, Borges et al. (2004) estudaram diversos potenciais dessa bactéria, como por exemplo uma grande versatilidade para produzir diferentes compostos e ácidos orgânicos. Portanto, a incapacidade de *Beijerinckia* em solubilizar $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ não inviabiliza a idéia de que esta bactéria possa solubilizar outras formas de fosfato.

5.6 Produção de fitormônios

5.6.1 Produção de ácido -3indol acético

A produção de fitormônios por rizobactérias é uma influência positiva para o crescimento de plantas e tem sido demonstrada em inúmeros estudos. (GLICK, 1995; BASHAN et al. 2004). Neste trabalho, todas as 56 culturas rizobacterianas crescidas em meio MS líquido, na presença de triptofano, realizaram a síntese e excreção do fitormônio ácido 3-indol acético.

O AIA é estruturalmente relacionado ao aminoácido triptofano (Figura 26), indicando este aminoácido como precursor (TAIZ; ZEIGER, 2004).

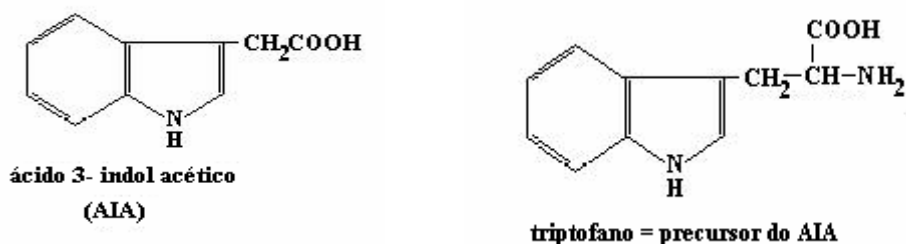


Figura 26: Ácido 3-indol acético e ácido 3-indol butírico, respectivamente.

Todas as estirpes deste trabalho produziram AIA (Figura 20). Este resultado está de acordo com a literatura atual, que demonstra que mais de 80 % das bactérias isoladas da rizosfera são capazes de produzir esse regulador de crescimento (LEINHOS; VACEK, 1994; BARAZANI; FRIEDMAN, 1999; KHALID et al., 2004). Os gêneros *Klebsiella* e *Enterobacter* diferiram significativamente de *Beijerinckia*, *Burkholderia* e *Pseudomonas*, como maiores produtores de AIA, entretanto algumas estirpes, independente do tratamento, foram capazes de produzir concentrações significativas de AIA no meio de cultura.

As concentrações de AIA foram verificadas quando as culturas tinham 100 e 200h de incubação. Observamos que em 33 culturas rizobacterianas as concentrações de AIA diminuíram neste intervalo de tempo. Efeito similar foi observado por

Marchioro (2005) que trabalhou com *Herbaspirillum*, *Azospirillum*, *Burkholderia* e *Rhizobium*.

Vinte e três linhagens apresentaram aumento nas concentrações de AIA no período de 100 a 200h. Também verificamos que essas linhagens apresentaram aumento de UFC, enquanto que as culturas que diminuíram as concentrações de AIA, nesse intervalo de tempo mantiveram seu número de UFC constante ou diminuíram o número de células viáveis. Os níveis de AIA produzidos pelas bactérias dependem do crescimento bacteriano, da atividade metabólica e da expressão de genes que codificam enzimas para a biossíntese de AIA (LAMBRECHT et al., 2000), portanto, a carência nutricional pode inibir a produção deste fitomônio.

Neste estudo as linhagens rizobactérias que mais produziram AIA foram: (ICBR 161) *Enterobacter*, (ICBR 44) *Burkholderia* e (ICBR 188) *Klebsiella* (Tabelas 22, 23 e 24). Em contrapartida, o gênero *Beijerinckia* foi o que menos produziu AIA, independente do tratamento de origem. Pedraza et al. (2004) consideraram que as quantidades de AIA excretadas pelos isolados dependem da espécie ou até mesmo da estirpe que está em estudo, assim como das condições em que são cultivados os organismos, tais como: presença ou ausência do precursor do AIA no meio de cultura (triptofano), oxigenação, pH e fase de crescimento em que se encontram os isolados.

Na literatura encontramos dados que mostram grandes concentrações de AIA produzidos por bactérias em meios de cultura agitados, como exemplo: EL-Khawas e Adachi (1999) mostraram que as concentrações de AIA em culturas agitadas de *A. brasiliense* eram mais elevadas que em culturas paradas. Também Torres-Rubio et al. (2000) encontraram valores mais elevados que os nossos para culturas de *Pseudomonas putida* e *P. aeruginosa*.

Nossas linhagens foram cultivadas, em meios de cultura livre de nitrogênio e não agitados (condições diferentes das descritas pelos autores acima citados) e destacam esse potencial (todas produziram e excretaram AIA). Ainda, devemos considerar que “*in vivo*” as interações microbianas, sob efeito de exsudação radicular, podem sofrer controle indireto em suas atividades metabólicas, sendo mais ativas (ou menos) para produção deste fitomônio, conforme a necessidade da planta em seu estágio de desenvolvimento (VESSEY, 2003).

As 56 estirpes aqui estudadas são provenientes da rizosfera de cana-de-açúcar, que é diferente de todas as outras gramíneas. Suas raízes crescem verticalmente para baixo (5 a 7 m) (MOORE, 1987), são altamente ramificadas e possuem elevadas

concentrações de sacarose no exsudado (MALAVOLTA, 1994). Esse sistema de raiz, pode promover uma intensa atividade microbiana, e cada estirpe produz concentrações diferentes de AIA (CATTELAN, 1998). Nossos resultados estão de acordo com esta informação, pois observamos nas tabelas 22, 23 e 24, que ocorreram variações nas concentrações de AIA dependendo da cepa em estudo, as quais indicam que a quantidade AIA produzido está relacionada com a capacidade individual de produção.

Dados colhidos por Narayanaswami; Veerajju (1996) detectaram uma quantidade três vezes maior de AIA em solo rizosférico em relação ao não rizosférico. Isto indica que a produção dessas substâncias por rizobactérias está diretamente ligada à disponibilidade de exsudatos radiculares (MELO, 1998), sendo que já foi observado que *Pseudomonas* spp. fluorescentes produziram AIA em resposta aos exsudatos de raiz de milho (BENIZRI et al., 2001). Nossos resultados “*in vitro*” mostram apenas o potencial destas rizobactérias, que, de acordo com a literatura, podem ser mais eficientes “*in vivo*” (PATTEN e GLICK, 2002).

5.6.2 Produção de Etileno

A descoberta do etileno como um regulador do crescimento vegetal começou com as observações de Neljubow (1901), o qual demonstrou que esse gás alterava marcadamente as respostas tropísticas de raízes.

Castro (1998) definiu que reguladores vegetais são substâncias sintéticas aplicadas exogenamente, as quais possuem ações similares aos grupos de hormônios conhecidos (auxinas, giberelinas, citocininas, etileno, etc.). Hormônios vegetais são compostos orgânicos, não nutrientes de ocorrência natural, os quais, em baixas concentrações, promovem, inibem ou modificam processos morfológicos e fisiológicos do vegetal. Alguns compostos comumente utilizados como maturadores têm sido considerados eficientes na indução de maior perfilhamento da cana-de-açúcar, dentre eles o ácido 2-cloroetil fosfônico (etileno sintético). Essa substância é um regulador de crescimento de plantas, com propriedades sistêmicas. Nas plantas, o ácido 2-cloroetil fosfônico rapidamente sofre degradação para ácido fosfórico, etileno e íons cloreto, tendo efeito sobre o processo de crescimento (TOMLIN, 1994). Yangrui Li e Solomon (2003) destacaram os vários benefícios do uso do etileno sintético em cana-de-açúcar,

principalmente quando é cultivada em diferentes áreas do mundo, sob as mais adversas condições para brotamento, perfilhamento e maturação.

A produção biológica de etileno não está limitada a plantas superiores, uma vez que microrganismos são capazes de sintetizá-lo (PIERIK et al., 2006).

Nossos resultados mostraram que, das 56 linhagens estudadas, 37 foram capazes de produzir etileno em meio de cultura a partir do aminoácido metionina, e 19 linhagens não produziram esse fitormônio. Se considerarmos as diferentes concentrações obtidas (em nossos experimentos "*in vitro*" as concentrações variaram de 356,00 $\eta\text{Mol.ml}^{-1}$ produzido por *Klebsiella* a 10,20 $\eta\text{Mol.ml}^{-1}$ excretado por *Pseudomonas*), a metodologia utilizada, as diferentes vias bioquímicas para a síntese de etileno (FUKUDA et al., 1993), e que esse fitormônio, em baixíssimas concentrações, exerce um grande efeito sobre a fisiologia da planta (nossos resultados mostraram que todas as linhagens de *Pseudomonas* possuem excelente potencial para produzir etileno), pode se questionar: - quando esse hormônio é produzido pelas bactérias, na rizosfera da cana-de-açúcar, existe controle? - Nossas linhagens do gênero *Pseudomonas* poderiam causar danos à planta já que são excelentes produtoras de etileno? Nossa hipótese se apóia em dados da literatura que se fundamenta nos seguintes argumentos:

1- A comunidade microbiana "*in vivo*" possui uma estrutura dinâmica que é influenciada por fatores bióticos e abióticos, sendo que a planta é o principal fator na interação planta-bactéria (HALLMANN et al., 1997).

2- As bactérias são selecionadas pelos substratos disponibilizados pela planta, produtos da rizodeposição, como exsudatos e lisados, que são utilizados como fonte de energia (NORMANDER; PROSSER, 2000), ou seja: essa microbiota interage ativamente com a comunidade vegetal através do reconhecimento de exsudatos vegetais e através de síntese de sinais moleculares capazes de intermediar interações inter e intra-específicas, afetando direta ou indiretamente a nutrição e a saúde das plantas (KENNEDY, 1999).

3- Diferenças entre as diversas comunidades bacterianas, em relação à idade das plantas, à localização do sistema radicular e à profundidade do solo, já foram observadas (FIERER et al., 2003; FERREIRA et.al., 2008). As diferenças entre as comunidades bacterianas foram maiores na fase inicial do crescimento das plantas, com tendência a diminuir no estágio final de desenvolvimento. Segundo Hamlen et al. (1972), uma maior concentração de exsudatos é encontrada durante a fase inicial de crescimento vegetal. Esta variação dependente da idade da planta reflete na

variabilidade temporal e espacial das fontes de C que são fatores provavelmente determinantes na estrutura da comunidade bacteriana (BAUDOIN et al., 2002), bem como sua diversidade e habilidades funcionais (GRAYSTON; CAMPBELL, 1996; GRAYSTON et al., 1998). Além disso, os microrganismos estão sujeitos a mudanças das propriedades físicas e químicas do solo, portanto os estudos de comunidade microbiana são resultados não somente da relação dos indivíduos que se integram nessa comunidade, mas também dos efeitos de perturbações e estresses ambientais (KENNEDY, 1999). Por exemplo: os vários estágios de crescimento da cana-de-açúcar que são influenciados e dependentes de fatores ambientais como: temperatura, umidade e luminosidade, as quais são variáveis e têm grande atuação na fisiologia da planta. O clima ideal para a cultura de cana-de-açúcar é aquele que apresenta duas estações distintas, uma quente e úmida, para proporcionar a germinação, perfilhamento e desenvolvimento vegetativo, seguido de outra fria e seca, para promover a maturação e, conseqüentemente, acúmulo de sacarose nos colmos (SEGATO et al., 2006). São fatores que afetam toda a microbiota rizosférica.

Portanto, é plausível que as interações entre as diferentes linhagens rizobacterianas e que a disponibilidade de nutrientes e exsudação nas diferentes fases de crescimento e maturação da planta podem estimular ou inibir sinais moleculares dessas bactérias, controlando, de forma indireta, seus exsudatos e/ou alterando o número de espécies em interação. Dessa forma, em relação à produção do etileno, essas bactérias em seu habitat natural (rizosfera da mesma variedade de planta onde foram isoladas, etc.), provavelmente possam ser controladas pela planta e demais fatores abordados para não produzirem excessos de substâncias que prejudicariam a planta, em determinada fase de seu crescimento, e/ou que esses estímulos aumentem a produção de etileno (na fase de maturação da cana-de-açúcar), quando este é extremamente necessário, mantendo assim o equilíbrio e sustentabilidade da cultura.

5.7 Antagonismo a fungos

A comunidade microbiana presente nos diversos solos atua de modo direto e/ou indireto no controle de fitopatógenos. A agricultura sustentável depende da atividade de diversos grupos microbianos e de suas funções no solo, o que condiciona a dinâmica e equilíbrio do sistema (TOKESHI, 2000). O controle biológico, através da aplicação de

microrganismos pode suprimir doenças das plantas, significando uma poderosa alternativa ao uso dos químicos sintéticos (PAULITZ e BELANGER, 2001).

Das 56 rizobactérias deste estudo, 47 apresentaram atividade antagônica frente aos fungos fitopatogênicos testados. Observamos que o mesmo gênero foi capaz de inibir diferentes linhagens de fungos. Estes resultados são compatíveis com os observados por outros autores que trabalharam com *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, etc. (BATISTA JÚNIOR et al., 2002; KUPPER et al., 2003; BRISBANE et al.; 1989; WHIPPS, 2001; SANTOS et al., 2004). Entretanto, nossos experimentos não permitem afirmar que a mesma linhagem rizobacteriana foi capaz de produzir diferentes substâncias antagônicas (ZAGO et al., 2000).

As linhagens do gênero *Burkholderia* foram as que apresentaram maior capacidade antagônica contra os fungos testados. Onze linhagens foram avaliadas e 5 delas (ICBR 38, 39, 73, 15, e 83), foram capazes de inibir 100% dos fungos. Nove linhagens (ICBR 38, 39, 73, 143, 15, 131, 187, 37 e 83) foram capazes de inibir *Fusarium*, e 8 (ICBR 38, 39, 73, 143, 15, 187, 53 e 83) foram capazes de inibir *Colletotrichum*.

Alguns trabalhos avaliaram a diversidade do gênero *Burkholderia* obtida de fontes ambientais, concluindo que as espécies deste gênero representam um grupo diverso dos microrganismos envolvidos em uma ampla escala de funções (COENEY et al., 2003). *Burkholderia* tem sido usada como agente de biocontrole para proteger as culturas contra doenças fúngicas, representando uma alternativa a uma variedade de inseticidas químicos. Esta bactéria foi relatada por ser antagonista eficaz contra fungos fitopatogênicos que incluem *R. solani*, *Sclerotium*, *Pythium spp.*, *Fusarium spp.*, e *Phytophthora capsici* (PARKE et al., 1991; HEBBAR et al., 1992; MCLOUGHLIN et al., 1992; BOWERS e PARKE, 1993; MAO et al., 1998). O fungo *Fusarium*, causador de danos é de difícil controle na agricultura, por que é resistente à maioria dos agentes antifúngicos (KAIB et al., 1994; ISABEL et al., 1997). Até o momento, nenhum tratamento apropriado foi estabelecido. Zeng et al. (2006) e Li et al. (2007) sugerem que o composto CF661 produzido por *B. cepacea* é eficaz. Entretanto é necessária a produção em grande escala, e seriam necessárias várias aplicações em intervalos regulares, além do alto custo para a produção. Quan et al. (2005) diz que a estrutura desse composto ainda não está elucidada, portanto desconhece-se a completa ação do composto no meio ambiente.

Em relação às nossas estirpes do gênero *Burkholderia* ainda seriam necessários estudos posteriores, para identificação da espécie e linhagem, pois linhagens bacterianas não patogênicas aos animais, que comprovadamente inibam esses fungos, poderiam ser utilizadas como biocontrole eficaz e sem danos prejudiciais ao meio. E se durante a safra, as bactérias forem eficientes para colonizar a rizosfera, não haveria necessidade de aplicação de doses extras de antifúngicos, essas bactérias estariam constantemente produzindo essas substâncias inibidoras de patógenos.

Depois de *Burkholderia*, as estirpes do gênero *Klebsiella* e *Enterobacter* neste estudo, apresentaram melhor antagonismo aos fungos testados do que o gênero *Pseudomonas*. Três linhagens ICBR 129, 188 e 199 (*Klebsiella*) foram capazes de inibir *Colletotrichum*, e apenas 1 *Klebsiella* ICBR 003 foi capaz de inibir *Fusarium*. O fungo *Colletotrichum* se mostrou o mais resistente entre os fungos testados, pois apenas 14 linhagens rizobacterianas foram capazes de inibi-lo. As linhagens de *Enterobacter* demonstraram potencial com o biocontrole a fungos, 8 estirpes inibiram *S.sclerotiorum*, 7 inibiram *V.dahliae*, 5 inibiram *F. verticilioides*, 3 *R. solani* e 2 *C. falcatum* (Tabelas 25, 26 e 27). A literatura descreve o gênero *Enterobacter* como abundante em rizosfera de diversos vegetais. Também é descrita como antagonista de *Pythium* sp., que causa podridão das raízes de pepino. Bactérias do gênero *Enterobacter* são também citadas como endófitos de outras culturas (TEIXEIRA et al., 2007). Marchi e Utkhede (1993) estudaram *Eterobacter* de diferentes partes do mundo em rizosfera de maçãs, e verificaram que 57 fungos foram significativamente inibidos por este biocontrole.

Das 15 linhagens identificadas como *Pseudomonas* 11 apresentaram antagonismo aos fungos, e todas, as 11 foram capazes de inibir *S. sclerotiorum*. A estirpe ICBR 192 *Pseudomonas* apresentou melhor potencial, foi capaz de inibir o crescimento de 3 fungos *R. solani*, *V. dahliae* e *S. sclerotiorum*. Dentre as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas, as bactérias do gênero *Pseudomonas* são as mais estudadas. Isto se deve, principalmente, ao fato de serem nutricionalmente versáteis, de possuírem habilidade de crescer em ampla faixa de condições ambientais, além de produzirem uma grande variedade de antibióticos e sideróforos (HAAS e KEEL, 2003). Bagnasco et al. (1998) testou o antagonismo “*in vitro*” de 541 isolados de *Pseudomonas* contra *Rhizoctonia solani*. De 541 isolados de *Pseudomonas* spp. apenas 20 apresentaram atividade antagônica, sendo que três apresentaram os melhores resultados. Em outro experimento, realizado por Freitas e Pizzinatto (1997), 83% dos isolados de *Pseudomonas* sp. apresentaram antagonismo ao *Colletotrichum gossypii*, em

nossos experimentos apenas a linhagem ICBR 002 apresentou antagonismo ao *Colletotrichum falcatum*.

Comparada com os outros gêneros aqui estudados, as *Pseudomonas* não foram as melhores produtoras de substâncias antagônicas frente aos fungos testados. Há dados na literatura que mostram que o meio BDA, usado neste trabalho, inibe a produção de sideróforos. Freitas e Pizzinatto (1997) trabalharam com isolados de *Pseudomonas fluorescens* e de *Bacillus* spp. e observaram que a maioria dos isolados de *Pseudomonas* foram antagônicos ao fungo *Colletotrichum* no meio B de King et al. (1954) mas não em meio BDA. Isto indica o envolvimento de sideróforos na inibição, uma vez que o primeiro meio de cultura é deficiente em ferro, mas não o segundo. Os isolados de *Bacillus* apresentaram antagonismo no meio BDA, indicando, a produção de antibióticos. Outro estudo envolvendo sideróforos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* mostrou que a transcrição desses genes foi reprimida pela presença de ferro presente no meio de cultura. Três promotores desses genes foram clonados e a atividade desses promotores mostrou-se dependente da quantidade de ferro no meio de cultura (ROMBEL et al., 1995).

6 CONCLUSÕES

Pela observação de todos os parâmetros analisados, concluímos que:

- Os tratamentos de origem (adubação) não afetaram significativamente os resultados.
- As rizobactérias diazotróficas selecionadas para este estudo, podem representar um componente importante no crescimento da cana-de-açúcar. Estas bactérias demonstraram que possuem mecanismos de promoção de crescimento que diferem de uma linhagem para outra, e em conjunto, evidenciam grande potencial para aplicação biotecnológica como ferramentas naturais para a sustentabilidade da cultura, que visa reduzir custos, promover eficiência e aumento da produtividade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ACHOUAK, W.; NORMAND P.; HEULIN T. Comparative phylogeny of *rrs* and *nifH* genes in the Bacillaceae. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 961–967, 1999.

ALTSCHUL, S. F. et al. A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p.3389-3402, 1997.

ARAÚJO, W. L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 10, p. 4906-4914, 2002.

ARNOLD, W. et al. A. Nucleotide sequence of a 24,206 base pair fragment carrying the entire nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Molecular Biology**, v. 203. p. 715-738, 1988.

ARSHAD, M.; FRANKENBERGER JR., W. T, Ethylene accumulation in soil in response to organic amendments. *Soil Science Society of America Journal*, v. 54, p. 1026-1031, 1990.

ARSHAD, M.; FRANKENBERGER JR., W.T. Microbial production of plant growth regulators. In: BLAINE, F.; METTING, J. R. (Ed.). **Soil Microbial Ecology**. New York: Marcel and Dekker, Inc., 1993. p. 307–347.

ASIS, C. A.; ADACHI, K. Isolation of endophytic *Pantoea agglomerans* and non-diazotrophic *Enterobacter asburiae* from sweet potato stem in Japan. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, p. 19-23, 2003.

ASTARITA, L. V.; FLOH, E. I. S.; HANDRO, W. Free amino acids, protein and water content changes associated with seed development in *Araucaria augustifolia*. **Biologia Plantarum**, v. 47, p. 53-59, 2004.

ATKINSON, D.C.; WATSON, A. The beneficial rhizosphere: a dynamic entity. **Applied Soil Ecology**, v. 15, p. 99-104, 2000.

AZEVEDO, J. L. Endophytic microorganisms a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, 2000. Disponível em: <<http://www.ejb.org/content/vol3/issue1/full3>>. Acesso em: 20 Maio 2009.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BABU-KHAN, S. et al. Cloning of a mineral phosphate-solubilizing gene from *Pseudomonas cepacia*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 972-978, 1994.

BACON, C.W.; HINTON, D.M.; RICHARDSON, M.D. A corn seedling assay for resistance to *Fusarium moniliforme*. **Plant Disease**, v.78, p. 302-305, 1994.

BAGNASCO P. et al. A Fluorescent *Pseudomonas* spp spp. as biocontrol agents against forage legume root pathogenic fungi. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, p. 1317–1322, 1998.

BAIS, H. P. et al. How plants communicate using the underground information superhighway. **Trends in Plant Science**, v.9 p.26–32, 2004.

BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biology and Fertility of Soils**, v.30, p.485-491, 2000.

BALDANI, J. I. Biological nitrogen fixation (BNF) in non-leguminous plants: The role of endophytic diazotrophs. In: PEDROSA F.O.; HUNGRIA M.; YATES M.G.; NEWTON W.E. **Nitrogen Fixation: from molecules to crop productivity**. Editora: Kluwer Acad. Publ. Dordrecht, 2001, 321p.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.77, p.549-579, 2005.

BALDANI et al. A brief story of nitrogen fixation in sugarcane – reasons for success in Brazil. **Functional Plant Biology**, v.29, p.417-423, 2002.

BALDANI, V.L.D. **Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e, ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica**. 234 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1996.

BALDANI et al. Inclusion of “*Pseudomonas*” *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, within the genus *Herbaspirillum*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.46, p.802-810, 1996.

BALDANI V.L.D. et al. *Burkholderia brasilensis* sp. nov., uma espécie de bactéria diazotrófica endofítica. **Anais Academia Brasileira Ciências**, v. 69, p. 116, 1997.

BANNANTE, C.A. Economic evaluation of the use of phosphate fertilizers as a capital investment. In: JOHNSTON, A.E.; SYERS, J.K. (Ed.). **Nutrient management for sustainable crop protection in Asia**. Wallingford, UK: CAB International, 1998.

BARAZANI, O.; FRIEDMAN, J. Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria? **Journal of Chemical Ecology**. Dordrecht, v.25, n.10, p.2397-2406, 1999.

BARBOSA, H.R. et al. Counting of viable cluster-forming and non cluster-forming bacteria: a comparison between the drop and the spread methods. **Journal of Microbiological Methods**, v.22, p. 39-50, 1995.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; BASHAN, L.E. Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v.50, p.521-577, 2004.

BATISTA JÚNIOR, C. B. et al. Efeito fungistático de *Bacillus thuringiensis* e de outras bactérias sobre alguns fungos fitopatogênicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 8, p. 1189-1194, ago. 2002.

BAUDOIN, E.; BENIZRI, E.; GUCKERT, A. Impact of growth stage on the bacterial community structure along maize roots, as determined by metabolic and genetic fingerprinting. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 19, p. 135-145, 2002.

BECKING, J.H. Becking, Genus *Beijerinckia*. In: KRIEG N.R. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. v. 1, p. 311–325.

BECKING, J.H. The Genus *Beijerinckia*. In: BALOWS, A.; TRIPPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIDER, K.-H. (Ed.). **The prokaryotes**. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 1991. p. 2254-2267.

BENIZRI E.; BAUDOIN E.; GUCKERT G.; Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria, **Biocontrol Science and Technology**, v. 11, p. 557–574, 2001.

BEVIVINO, A., V. et al. Effect of *Fusarium verticillioides* on maize-root-associated *Burkholderia cenocepacia* populations. **Research in Microbiology**, v.156, p.974–983, 2005.

BEVIVINO, A. et al. Phenotypic comparisons between rhizosphere and clinical isolates of *Burkholderia cepacia*. **Microbiology**, New York, v.140, p.1069-1077, 1994.

BISHOP, P. E.; JARLENSKI, D. M. L.; HETHERINGTON, D. R. Evidence for an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. **Journal of Bacteriology**, v. 150, p. 1244-1251, 1980.

BHATTARAI, T.; HESS, D. Growth and yield responses of a Nepalese spring wheat cultivar to the inoculation with Nepalese Azospirillum spp at various levels of N fertilization. **Biology and Fertility of Soils**, v.26, p.72-77, 1998.

BLAIR, N. Impact of cultivation and sugar-cane green trash management on carbon fractions and aggregate stability for a Chromic Luvisol in Queensland, Australia. **Soil e Tillage Research**, v. 55, p. 183-191, 2000.

BOCKMAN, O.C.; OLFS, H.-W. Fertilizers, agronomy and N₂O nutrient cycling in agroecosystems. **Kluwer Academic Publishers, the Netherlands**, v. 52, p. 165-170, 1998.

BODDEY, L. H. **Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholdeira*, isoladas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) cultivadas na Austrália e no Brasil.** 109 f. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2003.

BODDEY, R. M. Methods for quantification of nitrogen fixation associated with gramineae. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 6, p. 209-266, 1987.

BODDEY, R.M., DOBEREINER, J., Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent progress and perspectives for the future. **Fertilizer Resolution**, v. 42, p. 241–250. 1995.

BODDEY, R. M. et al. J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, v. 174, p. 195-209, 1995.

BODDEY, R. M. et al. Use of ¹⁵N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N₂ fixation to sugar cane and others grasses. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 28, p. 889-895, 2001.

BOLAND, G.J. e HALL, R. Epidemiology of white mold bean in Ontario. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 9, p. 218-224, 1987.

BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W.; GARRITY, G. M. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2^a. Ed. New York: Springer-Verlag,. 2001.

BORGES, C.D. et al. Caracterização de biopolímeros produzidos por *Beijerinckia* sp. Em diferentes tempos de cultivo **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, p.327-332, 2004.

BOROWITZ, J.J. et al. Inhibition of fungal cellulase, pectinase and xylanase activity of plant growth promoting fluorescent pseudomonads. **Bulletin OILB/SROP**, v. 15, p. 103-106, 1992.

BORTELS, H. Weitere Untersuchungen über die bedeutung von molybden, vanadium, wolfram und anderen erdascenstoffen für stickstoffbindende und andere mikroorganismen. **Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde**, Stuttgart, v.95, p.193-218, 1936.

BOSSHARD, P. P. et al. 16S rRNA Gene Sequencing versus the API 20 NE System and the VITEK 2 ID GNB Card for Identification of Nonfermenting Gram-Negative Bacteria in the Clinical Laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, Apr. 2006, p. 1359–1366 Vol. 44, No. 4, 2006.

BOWERS, J.H., PARKE, J.L., Epidemiology of *Pythium* dampingoff and *Aphanomyces* root rot of peas after seed treatment with bacterial agents for biological control. **Phytopathology**, v. 83, p.1466–1473, 1993.

BRANCO, S.M.; MURGEL, P. H.; CAVINATTO, V. M. Compostagem: solubilização biológica de rocha fosfática na produção de fertilizante organomineral. **Engenharia sanitária e ambiental**, v. 6, n. 3 - 2001.

BRILL, W.J. Biological nitrogen fixation. **Scientific American**, v. 236, p. 68-81, 1977.

BRISBANE, P.G.; HARRIS, J.R.; MOEN, R. Inhibition of fungi from wheat roots by *Pseudomonas fluorescens* 2-79 and fungicides. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 21, p. 1019-1025, 1989.

BROWN, L. Intervenção na mesa-redonda sobre Improving Natural Resources to Feed the World: Prerequisites for Sustainable Agriculture. In: A 2020 VISION FOR FOOD AGRICULTURE AND THE ENVIRONMENT. Conferência Internacional de 13 a 15 de junho, Washington: IFPRI, 1995, p. 75-79.

BRYNHILDSEN L.; ROSSWALL T Effects of metals on the microbial mineralization of organic acids. **Water Air Soil Pollut**, v. 94, p.45-57, 1997.

BULEN, W. A.; J. R. LECOMTE. The nitrogenase system from *Azotobacter*: two-enzyme requirements for N₂ reduction, ATP-dependent H₂ evolution, and ATP hydrolysis. **PNAS Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.** v. 56, p. 979-986, 1966.

BURKHOLDER, W. H., Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. **Phytopathology**, v. 40, p. 115-117, 1950.

BUSSE, H. J.; DENNER, E. B. M.; LUBITZ, W. Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. **Journal of Biotechnology**, v. 47, p. 3-38, 1996.

CABALLERO-MELLADO J.; et al. *Burkholderia unamae* sp. nov., an N₂-fixing rhizospheric and endophytic species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1165-1172, 2004.

CAMPELO, A. B.; DÖBEREINER J. Ocorrência de *Derxia* sp. em solos de alguns estados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 5, p. 327-332, 1970.

CAPUTO, M. M.; et al. Acúmulo de sacarose, produtividade e florescimento de cana-de-açúcar sob reguladores vegetais. **Interciência**, v. 32, n.12 , p.834- 840, 2007.

CARNEIRO, R. G. et al. Indicadores biológicos associados ao ciclo do fósforo em solos de Cerrado sob plantio direto e plantio convencional. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 7, p. 661-669, 2004.

CASTRO, P.R.C. **Utilização de reguladores de vegetais na fruticultura, na olericultura e em plantas ornamentais**. Piracicaba: DIBID/ESALQ/ USP, (Boletim série Produtor Rural) 91p. 1998.

CATTELAN, A. J. **Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal.** Londrina: Embrapa Soja, 1999. v.139, p.36, 1999. (Documentos).

CATTELAN, A.J. **Screening and characterization of soil and rhizosphere bacteria for traits that promote early soybean growth.** Georgia, 89p. (Tese de Doutorado) University of Georgia 1998.

CESNIK, R.; MIOCQUE, J. **Melhoramento da cana-de-açúcar.** Brasília: Embrapa-Informações Tecnológicas, 307p. 2004.

CHABOT, R. et al. Effect of phosphorus on root colonization and growth promotion of maize by bioluminescent mutants of phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, n. 12, p. 1615-1618, 1998.

CHATTERJEE, D.K.; KILBANE, J.J.; CHAKRABARTY, A.M. Biodegradation of 2,4,5- trichlorophenoxyacetic acid in soil by a pure culture of *Pseudomonas cepacia*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.44, p.514-516, 1982.

CHATTERTON, S.; SUTTON, J. C.; BOLAND, G. J. Timing *Pseudomonas chlororaphis* applications to control *Pythium aphanidermatum*, *Pythium dissotocum*, and root rot in hydroponic peppers. **Biology Control** v.30. p.360–373, 2004.

CHELIUS, M.K.; TRIPLET, E.W. Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumoniae* in association with *Zea mays* L. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.783-787 -2000.

CHENG, H.P.; LESSIE, T.G. Multiple replicons constituting the genome of *Pseudomonas cepacia* 17616. **Journal Bacteriology** v.176, p. 4034-4042, 1994.

CHRISTENSEN, H. Is characterization of a single isolate sufficient for valid publication of new genus or species? proposal modify recommendation 30b of the bacterial code (1990 Revision). **International Journal of Systematic and Evolutionary microbiology**, v. 51, p. 2221-2225, 2001.

CHUN J.; GOODFELLOW, M. A phylogenetic analysis of the genus *Nocardia* with 16S rRNA gene sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v.45, p. 240-5, 1995.

COENYE, T.; VANDAMME, “Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches.” **Environmental Microbiology**, v.5, p.719-729, 2003.

COMPANT, S. et al. Use of Plant Growth Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects **Applied And Environmental Microbiology**, v.71, p.4951–4959, 2005.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Acompanhamento da Safra Brasileira: Cana-de-açúcar. Safra 2009. Brasília 2009. Cana. Disponível em:

< <http://www.conab.gov.br/conabweb/> > Acesso em 01 junho 2009.

COOK, R.J.; GRANADOS, R.R. Biological control: making it work. MACDONALD, M. J. F. (ed). **Agricultural Biotechnology at the Crossroads**. Ithaca, NY: National Agricultural Biotechnology Council. 1991. p. 213-227.

COOK, R. J. et al. Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. **PNAS Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA v.92, p. 4197-4201, 1995.

COSTA, C.C., BURNQUIST, H.L. O subsídio cruzado às exportações de açúcar da União Européia: impacto sobre as exportações brasileiras de açúcar. **Brazilian Journal of Applied Economics**, v.10 p. 91-109, 2006.

CRISPIM, J.E. Manejo correto da cana é essencial para alta produtividade Rev. **Campo e Negócios**, Uberlândia-MG, Ano IV, n.37, p.16-18, 2006.

CRUZ, L. M. et al. 16S ribosomal DNA Characterization of nitrogen-fixing bacterial isolated from banana (*Musa spp*). E abacaxi (*Ananas comosus* (L) Merrill). **Applied and Environmental Microbiology**, Wisconsin, v.67, p. 2375-2379, 2001.

CSONKA L. N.; HANSON A D Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. **Annual Review of Microbiology** v.45 p. 569–606, 1991.

DAVIDSON, E.A. et al. Recuperation of nitrogen cycling in Amazonian forests following agricultural abandonment. **Nature**, vol. 447, p. 995-997, 2007.

DEAN, D. R.; JACOBSON, M.R. Biochemical genetics of nitrogenase. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J. eds. **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992, p.763-834.

DE FREITAS, J.R.; BANERJEE, M.R.; GERMIDA, J.J.; Phosphate solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). **Biology and Fertility of Soils**, v.24, p. 358–364, 1997.

DE WEGER, L. A. et al. Colonization of the rhizosphere of crop plants by plant-beneficial pseudomonads. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 17, p. 221–228, 1995.

DIALLO, M.D. et. al. Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the N₂- fixing bacterial diversity in soil under *Acacia tortolis ssp. Raddiana* and *Balanites aegyptiaca* in the dryland part of Senegal. **Environmental Microbiology**, New York, v.6, p. 400-415, 2004.

DEPARTAMENTO INTERSINDICAL DE ESTATÍSTICA E ESTUDOS SOCIOECONÔMICOS (DIEESE) - O trabalhador e o agronegócio sucroalcooleiro, Disponível em <http://www.dieese.org.br/cedoc/3608.PDF>, acesso em 28 julho 2009.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, n. 2, p. 107 -149, 2003.

DÖBEREINER, J. Influência da cana-de-açúcar na população de *Beijerinckia* no solo. **Brazilian Journal of Biology**, v.19, p. 251-258, 1959.

DÖBEREINER J, DAY JM AND DART PJ. Nitrogenase activity in the rhizosphere of sugarcane and some other tropical grasses. **Plant and Soil**, v.37, p. 191–196, 1972.

DÖBEREINER J. Fixação de nitrogênio atmosférico na rizosfera de gramíneas tropicais. In: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL SOBRE OS IMPACTOS GLOBAIS DA MICROBIOLOGIA APLICADA, São Paulo, SP, Brasil, 1973, v. 4, p. 461- 481.

DÖBEREINER J. Isolation and identification of root associated diazotrophs. **Plant and Soil**, v.10, p. 207-212, 1988.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília, Embrapa, 1995.

DÖBEREINER, J.; DAY, M. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and nitrogen-fixing sites. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN FIXATION, Washington State University, Pullman, WA, USA, 1975, p. 518–538.

DÖBEREINER, J.; RUSCHEL, A.P. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. **Revista de Biologia**, Lisboa, v.1, p.261-272, 1958.

DONG, Y. M.; INIGUEZ, A. L.; TRIPLETT, E. W. Quantitative assessments of the host range and strain specificity of endophytic colonization by *Klebsiella pneumoniae* 342. **Plant and Soil**, v. 257, p. 49-59, 2003.

DUFFY, B.K.; DEFAGO, G., Zinc improves biocontrol of *Fusarium* crown and root rot of tomato by *Pseudomonas yuorescens* and represses the production of pathogen metabolites inhibitory to bacterial antibiotic biosynthesis. **Phytopathology**, v.87, p. 1250-1257, 1997.

EADY, R.R. Structure-function relationships of alternative nitrogenases. **Chemical Reviews**, Washington, v.96, p.3013-3030, 1996.

EL-KHAWAS, H.; ADACHI, K. Identification and quantification of auxins in culture media of *Azospirillum* and *Klebsiella* and their effect on rice roots. **Biology and Fertility Soils**, Berlin, v.28, n4, p.377-381, 1999.

ELAD, Y.; CHET, I., Possible role of competition for nutrition in biocontrol of *Pythium* damping-off by bacteria. **Phytopathology**, v.77, p.190-195, 1987.

ESPINOSA-URGEL, M. Plant-associated pseudomonas populations: molecular biology, DNA dynamics, and gene transfer. **Plasmid**, v. 52, p. 139-150, 2004.

EVANS, H. J.; BURRIS, R. H. Highlights in Biological nitrogen fixation during the last 50 years. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. (ed). **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992, p. 1-42.

EVINER VT, CHAPIN FS. Nitrogen cycle – plant-microbial interactions. **Nature**, v. 385, p. 26–27, 1997.

FANKEM, H. et al. Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by strains of *Pseudomonas fluorescens* isolated from acidic soils of Cameroon. **African Journal of Microbiology Research**, v.2, p.171-178, 2008.

FELSENSTEIN J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**. v.39, p. 783–791, 1985.

FERNANDES, M.F.; FERNANDES, R. P. M.; RODRIGUES, L. S.; Bactérias diazotróficas associadas a coqueiros na região de baixada litorânea em Sergipe **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 12, p. 1509-1517, 2001.

FERREIRA, E.P.B. et al. Rhizosphere bacterial communities of potato cultivars evaluated through PCR-DGGE profiles. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.5, p.605-612, 2008.

FIERER, N.; SCHIMEL, P. J. P.; HOLDEN, P. A. Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 35, p. 167-176, 2003.

FONTANA, C. et al. Use of Microseq 500 16S rRNA gene-based sequencing for identification of bacterial isolates that commercial automated systems failed to identify correctly. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 615-619, 2005.

FOX, G. E. The structure and evolution of archaeobacterial ribosomal RNA. In: WOESE C. R. e WOLFE R.S. **The bacteria**. New York: Academic Press, 1985, p. 257-310.

FRANCO, H.C.J. **Eficiência agrônômica da adubação nitrogenada de cana-planta**. (Tese doutorado em Agronomia, solos e nutrição de plantas). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2008.

FREITAS, J. R. et al. Estimation of N₂ fixation by sugar cane, *Saccharum* sp. And soybean, *Glycine max*, grown in soil with ¹⁵N labeled organic matter. **Plant and Soil**, The Hague, v.82, p.257-261, 1984.

FREITAS, S. S.; PIZZINATTO, M. A. Ação de rizobactérias sobre a incidência de *Colletotrichum gossypii* e promoção de crescimento em plântulas de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). **Summa Phytopathologica**, v. 23, p. 36-41, 1997.

FRINDLENDER, M.; INBAR, J., CHET, I., Biological control of soilborne plant pathogens by a b-1,3-glucanase producing *Pseudomonas cepacia*. **Soil Biology and Biochemistry**, v.25, p. 1211-1221, 1993.

FUKUDA, H.; OGAWA, T.; TANASE. S.; Ethylene production by microorganisms. **Advances in Microbial Physiology**, v.35, p.275–306, 1993.

GALLO, D. et al. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002, 920p.

GASPAR, T. et al. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. **In Vitro Cellular e Developmental Biology – Plant**, v.32, p.272-289, 1996.

GAUDIN, V.; VRAIN, L. Bacterial genes modifying hormonal balances in plants. **Plant Physiological Biochemica**, v.32, p.11-28, 1994.

GAUR, A.C., Physiological functions of phosphate solubilizing micro-organisms. In: Gaur, A.C. (Ed.), **Phosphate Solubilizing Micro-organisms as Biofertilizers**. Omega Scientific Publishers, New Delhi, 1990, p.16–72.

GERMIDA, J.J., et. al. Diversity of root associated bacteria with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). **FEMS Microbiology Ecology**, v.26, p.43-50, 1998.

GEVERS, D. et al. Stepping stones towards a new prokaryotic taxonomy. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. **Series B-biological Sciences**, v. 361, p. 1911–1916, 2006 .

GILLIS, M.; TRAN VAN, V.; BARDIN, R. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.45, p.274–289, 1995.

GLICK, B.R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal Microbiology** , v.41, p. 109-117, 1995.

GLICK B. R.; BASHAN Y. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens, **Biotechnology Advances**, v. 15, p. 353-378, 1997.

GOLDMANN, D.A.; KLINGER, J.D. *Pseudomonas cepacia*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. **Journal of Pediatrics**, v.108, p. 806-812, 1986.

GOLDSTEIN, A. H. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. **American Journal Alternativa Agricola**, Greenbelt, v. 1, n. 2, p. 51-57, 1986.

GOMES, J.; CARVALHO, A.O.R.; NAZARENO, N.R.X. **Avaliação estadual de cultivares de milho**. Londrina, IAPAR, Informe de pesquisa, n.40. 1981.

GOMES, A.A. et al. Relação entre distribuição de nitrogênio e colonização por bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, p.1105-1113, 2005.

GOMES, N. C. M. et al. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 232, p. 167-180, 2001.

GONZALEZ, C.F.; VIDAVER, A.K. Bacteriocin, plasmid and pectolytic diversity in *Pseudomonas cepacia* of clinical and plant origin. **Journal of General Microbiology**, London, v.110, p.161-170,1979.

GONZALEZ-LOPEZ, J. et al. Liberation of amino acids by heterotrophic nitrogen fixing bacteria. **Amino Acids**, v. 28, p.363–367, 2005.

GORIS J.; KERSTER K.; DE VOS P. Polyamine Distribution Among Authentic Pseudomonads and Azotobacteraceae. **Systematic and Applied Microbiology**. v.21, p. 285-290, 1998.

GRAYSTON, S. J.; CAMPBELL, C. D. Functional biodiversity of microbial communities in the rhizosphere of hybrid larch (*Larix eurolepis*) and Sitka spruce (*Picea sitchensis*). **Tree Physiology**, Victoria, v. 16, p. 1031-1038, 1996.

GRAYSTON, S. J. et al. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 30, p. 369- 378, 1998.

GRIMES, H. D.; MOUNT, M. S. Influence of *Pseudomonas putida* on nodulation of *Phaseolus vulgaris*. **Soil Biology and Biochemistry**, v.6, p. 27- 30, 1987.

GYANESHWAR. P. et al. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.245, p.83-93, 2002.

GYANESHWAR, P. et al. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v.183, p.2634-2645, 2001.

HAAS, D.; KEEL, C. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. And relevance for biological control of plant disease. **Annual Review of Phytopathology**, v. 41, p. 117-153, 2003.

HASS, D.; DÉFAGO, G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonas. **Nature Reviews Microbiology**, London, v.3, p. 307-319, 2005.

HAAHTELA, K. et al Morphological and physiological characteristics and lipopolysaccharide composition of N₂-fixing (C₂H₂-reducing) root-associated *Pseudomonas* sp. **Canadian Journal of Microbiology**, v.29. p. 874-880, 1983.

HAAHTELA et al. Root-associated N₂ fixation (acetylene reduction) by Enterobacteriaceae and *Azospirillum* strains in cold-climate spodosols. **Applied Environmental Microbiology**, v.41, p.203–206, 1981.

HAGEMAN RV; BURRIS RH. Nitrogenase and nitrogenase reductase associate and dissociate with each catalytic cycle. **Biochemistry**, v. 75, p. 2699 – 2702, 1978.

HALL, T. Ibis Therapeutics A division of Isis Pharmaceuticals. BioEdit v7.0.5., Disponível em < <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/> > Acessado em fevereiro 2009.

HALLMANN, J. et al. Bacterial endophytes in agriculture crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 895-914, 1997.

HAMLEN, R. A.; LUKEZIC, F. L.; BLOOM, J. R. Influence of age and stage of development on the neutral carbohydrate components in root exudates from alfalfa plants grown in a gnotobiotic environment. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 52, p. 633-642, 1972.

HAMELIN, J. et al. *nifH* gene diversity in the bacterial community associated with the rhizosphere of *Molinia coerulea*, an oligonitrophilic perennial grass. **Environmental Microbiology**, New York, v. 4, n.8, p. 477-477, 2002.

HASELKORN, R. et al. Organization of the genes for nitrogen fixation in the cyanobacterium *Anabaena*. In: EVANS, H.J.; BOTTOMLEY, P.J. NEWTON, W.E. **Nitrogen fixation research progress**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1985, p.485-490.

HEBBAR, K.P., et al. Suppression of *Fusarium moniliforme* by maize root-associated *Pseudomonas cepacea*. **Soil Biology and Biochemistry**, v24, p.1009–1020, 1992.

HEUER, H.; SMALLA, K. Evaluation of community-level catabolic profiling using BIOLOG GN microplates to study microbial community changes in potato phylosphere. **Journal of Microbiology Methods**, v.30, n.1, p.49-61, 1997.

HOEFSLOOT, G. et al. Biological nitrogen fixation is not a major contributor to the nitrogen demand of a commercial grown South African sugarcane cultivar. **Plant Soil**, v.277, p. 85–96, 2005.

HOLFORD, I.C.R. Soil phosphorus: its measurement and, its uptake by plants. **Australian Journal of Soil Research**, v.35, n.3, p.227-239, 1997.

HOWARD, J.B.; REES, D.C. Nitrogenase: a nucleotide-dependent molecular switch. **Annual Review of Biochemistry**, v.63, p.235-264. 1994.

HUBBEL, D.H.; KIDDER, G. **Biological nitrogen fixation**. IFAS Extension: University of Florida, SL16, 2003.

HUSSAIN, A., VANCURD, V. Formation of biologically active substances by rhizosphere bacteria and their effect on plant growth. **Folia Microbiológica**, v.15, p.468 - 478, 1970.

HUNGRIA, M. Características biológicas em solos manejados sob plantio direto. In: REUNIÃO DE LA RED LATINOAMERICANA DE AGRICULTURA CONSERVACIONISTA, 5, 1999, Florianópolis. **Anais Florianópolis: Epagri, (CD-ROM)**. 2000.

HUNGRIA, M., et al. Symbiotic effectiveness of fast-growing rhizobial strains isolated from soybean nodules in Brasil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.33, n.5, p.387-394, 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza> Acessado Maio/2009.

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS (INPE). Projeto Canasat. Disponível em <www.dsr.inpe.br/canasat>, acessado em 25 de julho, 2009.

INIGUEZ, A.L.; DONG, Y.; TRIPLETT, E.W. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.17, p.1078-1085, 2004.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE (IPCC). Climate change: the scientific basis. United Kingdom: Cambridge University, 2001, 881p.

ISABEL, P., e t al. In-vitro antifungal susceptibility of clinical and environmental *Fusarium* spp. strains. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.39, p.163 – 167, 1997.

IZQUIERDO, J. A.; NUSSLEIN, K. Distribution of extensive *nifH* gene diversity across physical soil microenvironments. **Microbial Ecology**, New York, v. 51 n.4, p. 441-52, 2006.

JACOBSEN, C.S. Plant protection and rhizosphere colonization of barley by seed inoculated herbicide degrading *Burkholderia (Pseudomonas) cepacea* DBO1 (pRO101) in 2,4D contaminated soil. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.189, n.1, p.139- 144, 1997.

JOHNSTON, A.E. Fertilizers and Agriculture: Fifty Years of Developments and Challenges. **Fertilizer Society Proceedings**, York, 1997, n.396.

JONES D.L., 1998. Organic acids in the rhizosphere – a critical review. **Plant and Soil**, v.205, p. 25- 44, 1998.

KAIB, D.W.; BERGSTROM, G.C.; SHIELDS, E.J. Prevalence, severity, and association of fungal crown and root rots with injury by the clover root curculio in New York alfalfa. **Plant Disease**, v.78, p. 491–495, 1994.

KARNS, J.S.; DUTTAGUPTA, S.; CHAKRABARTY, A.M. Regulation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid and chloropleenol metabolism in *Pseudomonas cepacia* AC1100. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.46, p.1182-1186, 1983.

KATSY, E.I. Participation of auxins in regulation of bacterial and plant gene expression. **Russian Journal Genetic**, v.33, p. 463-473, 1997.

KAVANAGH, E.P., HILL, S. Oxygen inhibition of nitrogenase activity in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of General Microbiology**, v.139, p. 1307-1314, 1993.

KAYE, J.P.; HART, S.C. Competition for nitrogen between plants and soil microorganisms. **Trends in Ecology e Evolution**, v.12, p.139–143, 1997.

KENNEDY, C. A. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environmental**, Washington, v. 74, p. 65-76, 1999.

KHALID, A. et al. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.96 p.473-480, 2004.

KIKUTI, H.; TANAKA, R.T. Produtividade e qualidade de sementes de feijão em função da aplicação de aminoácidos e nutrientes. *Anais. CONAFE, VIII CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO*, Goiânia, GO, 18 a 20 de outubro de 2005. Santo Antonio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2005, p. 1062-1065.

KILIC-EKICI, O.; G. Y. YUEN. Comparison of strains of *Lysobacter enzymogenes* and PGPR for induction of resistance against *Bipolaris sorokiniana* in tall fescue. **Biology Control**, v.30, p. 446-455, 2004.

KIM, K.Y.; MCDONALD, G.A.; JORDAN, D. Solubilization of hydroxyapatite by *Enterobacter agglomerans* and cloned *Escherichia coli* in culture medium **Biology and Fertility of Soils**, v.24, p.347-352, 1997.

KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Milwaukee, v. 44, n. 3, p. 301-307, 1954.

KLOEPPER, J.W. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. METTING, F.B., JR. MARCEL DEKKER, (ed.). **Soil microbial ecology-applications in agricultural and environmental management**. New York, 1993, p. 255-274.

KLOEPPER, J. W. et al. Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. **Australian Plant Pathology**, v.28, p.21-26, 1999.

KLOEPPER, J. W. et al. Comparative analysis of methods for recovering plant growth-promoting rhizobacteria from roots. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 953-957, 1991.

KOJIMA, K. Changes of abscisic acid, indole-3-acetic acid and gibberellin-like substances in the flowers and developing fruitlets of citrus cultivar Hyuganatsu. **Scientia Horticulturae**, v. 65, p. 901-902, 1996.

KOJIMA K. Property of HPLC column and mass spectrum of LC-MS for phytohormone analysis. **JARQ** v.35, p. 149-154, 2001.

KONOPKA, A.; OLIVER, L.; TURCO, R.F. The use of carbon substrate utilization patterns in environmental and ecological microbiology. **Microbial Ecology**, v.35, p.103-115, 1998.

KORNDÖRFER, G.H.; MOTTA, S.A. Volatilização de N-NH₃ na cultura do milho: II. Avaliação de fontes sólidas e fluidas em sistema de plantio direto e convencional. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.21, p.481-487, 1997.

KOVTUNOVYCH, G. et al. Correlation between pectate lyase activity and ability of diazotrophic *Klebsiella oxytoca* VN 13 to penetrate into plant tissue. **Plant and Soil**, v. 215, p. 1-6, 1999.

KUCEY, R. M. N. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. **Canadian Journal Soil Science**, v.63, n. 4, p. 671-678, 1983.

KUKLINSKY-SOBRAL, J. et al. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, v. 6, p. 1244-1251, 2004.

KUPPER, K. C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, n.3, p. 251-257, 2003.

KUSS, A. V. et al. **Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético *in vitro* por bactérias diazotróficas endofíticas.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.42, n.10, p.1459-1465, 2007.

LAMBRECHT, M. et al. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signaling molecule in bacteria-plant interactions. **Trends in Microbiology**, v.8, p. 298-300, 2000.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing, In E. STACKEBRANDT AND M. GOODFELLOW (ed.), **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**, John Wiley and Sons Ltd., Chichester, United Kingdom, 1991. p. 115–175.

LANE, D. J.; PACE, B.; OLSEN, G. J.; STAHL, D. A.; SOGIN, M. L.; PACE, N. R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, p. 6955-6959, 1985.

LEINHOS, V., VACEK, O. Biosynthesis of auxins by phosphate-solubilizing rhizobacteria from wheat and rye. **Microbiology Research**, v.149, p.31-35, 1994.

LEMANCEAU et al. Effect of pseudobactin 358 produced by *Pseudomonas putida* WSC358 on suppression of *Fusarium* wilt of carnations by non pathogenic *Fusarium oxysporum*. **Applied Environmental Microbiology**, v.58, p. 2978-2980. 1992.

LESSIE et al. Genomic complexity and plasticity of *Burkholderia cepacia*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 144, p. 117–128, 1996.

LI, e SOLOMON S Ethephon: A versatile growth regulator for sugar cane industry. **Sugar Technology**, v. 5, p. 213-223, 2003.

LI, X.; QUAN, C.-S. e FAN, S.-D. Antifungal activity of a novel compound from *Burkholderia cepacia* against plant pathogenic fungi **Letters in Applied Microbiology**, v. 7, p. 508-514, 2007.

LIM, H., KIM, Y., KIM, S., *Pseudomonas stutzeri* YLP-1 genetic transformation and antifungal mechanism against *Fusarium solani*, an agent of plant root rot. **Applied Environmental Microbiology**, v.57, p. 510-516. 1991.

LIMA, E.; BODDEY, R. M.; DÖBEREINER J. Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using a ¹⁵N aided nitrogen balance. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 19, p. 165-170, 1987.

LIPSON D, NÄSHOLM T The unexpected versatility of plants: organic nitrogen use and availability in terrestrial ecosystems. **Oecologia Brasiliensis**, v. 128, p.305–316, 2001.

LIPSON et al. Variation in competitive abilities of plants and microbes for specific amino acids. **Biology and Fertility of Soils**, v.29, p.257–261, 1999.

LODEWYCKX et al. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 21, p. 583-606, 2002

LOPER, J.E.; HENKELS, M.D. Utilization of heterologous siderophores enhances levels of iron available to *Pseudomonas putida* in the rhizosphere. **Applied Environmental Microbiology**, v.65, p. 5357-63, 1999.

LUGTENBERG, B. J. J.; AND L. C. DEKKERS. What make *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent **Environmental Microbiology**, v. 1, p. 9–13. 1999.

LYNCH, J.W. **Biotechnologia do solo**. (Ed.). Manole Ltda., São Paulo: São Paulo, 1986.209 p.

MCCLOUGHLIN et al. *Pseudomonas cepacia* suppression of sunflower wilt fungus and role of antifungal compounds in controlling the disease. **Applied Environmental Microbiology**, v. 58, p. 1760–1763, 1992.

MAHL et al. Nitrogen fixation by members of the tribe *Klebsiellae*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.89, p.1482-1487, 1965.

MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Cers, 1980,251p.

MALAVOLTA E. **Nutrient and fertiliser management in sugarcane** In: INTERNATIONAL POTASH INSTITUTE. International Potash Institute, Basel, Switzerland, 1994, p. 104, (Bulletin No 14).

MALATHI, P.; VISWANATHAN, R.; JOTHI, R. Specific adaptation, *Colletotrichum falcatum* pathotypes to sugarcane cultivars. **Sugar Technology**, v.8 (1), p. 54-58, 2006.

MAO et al. Biocontrol of selected soilborne diseases of tomato and pepper plants. **Crop Protection**, v. 17, p.535–542. 1998.

MARS et al. Degradation of toluene and trichloroethylene by *Burkholderia cepacia* G4 in growth-limited fed-batch culture. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n.3, p.886-891, 1996.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London, Academic Press, 889p. 1995.

MARCHI, A.; UTKHEDE, R.S. **Effect of *Enterobacter aerogenes* on the Rhizosphere Microflora of Apple Trees** . Agriculture Canada Research Station, Summerland, British Columbia, V0H 1Z0, Canada. University of Bologna, Italy R. S. UTKHEDE Agriculture Canada Research Station, Summerland, B.C., V0H 1Z0, Canada. Contribution No. 825 of Research Station, Summerland. Reprint requests to be forwarded to R. S. Utkhede .DIGITAL OBJECT IDENTIFIER (DOI) 10.1111/j.1439-0434.1994.tb01453.x. 1993.

MARCHIORO, L. E. T., **Produção de Ácido Indol Acético e Derivados por Bactérias Fixadoras de Nitrogênio**. 75p. (Tese) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2005.

MARIN et al. **Fixação biológica de nitrogênio: bactérias fixadoras de nitrogênio de importância para a agricultura tropical**. EMBRAPA- Seropédica – 1999, DOC 091. (Documentos).

MARTINS, N.G.S. **Os fosfatos na cana-de-açúcar**. 99 p. (Dissertação de Mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, Ciência e tecnologia de alimentos. 2004.

MAYEUX, P.A. **Some studies on the microbial flora of sugar-cane**. (M.S Thesis) Louisiana State University, Baton Rouge. 1960.

MELO, I.S. **Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas: descrição e potencial de uso na agricultura**. MELO, I.S; AZEVEDO, J.L. In: Ecologia microbiana - Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998, 488p.

MERCIER, J.; LINDOW, S.E. Role of Leaf Surface Sugars in Colonization of Plants by Bacterial Epiphytes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 369-374, 2000.

MERRICK, M. J. **Organisation and regulation of nitrogen fixation genes**. In New Horizons in Nitrogen Fixation, proceedings of the 9th international congress on nitrogen fixation. (Ed.). R PALACIOS, J MORA AND W E NEWTON. Kluwer Academic, Dordrecht. 1993. p. 43–54.

MIRANDA, C.H.B.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. Selection of ecotypes of *Panicum maximum* for associated biological nitrogen fixation using the super (15)N isotope dilution technique. **Soil Biology and Biochemistry**, v.22, p 657-663, 1990.

MIRZA et al. Isolation, partial characterization, and effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane *in vitro*. **Plant Soil**, v. 237. p. 47-54, 2001.

MISKO, A. L.; GERMIDA, J. J. Taxonomic and functional diversity of pseudomonads isolated from the roots of field-grown canola. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 42, p. 399-407, 2002.

MIYASAKA et al. During stationary phase, *Beijerinckia derxii* shows nitrogenase activity concomitant with the release and accumulation of nitrogenated substances. **Microbiology**, v.158, p. 309-315, 2003

MOCALI et al. Fluctuation of bacteria isolated from elm tissues during different seasons and from different plant organs. **Research in Microbiology**, v. 154, p. 105-114, 2003.

MOORE P.H. **Anatomy and morphology**. In: Sugarcane Improvement through Breeding. (Ed.). D.J. HEINZ. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 1987. p.85-142.

MOHR H, SCHOPFER P Photomorphogenesis. **Plant Physiology**. Berlin: Springer-Verlag, p. 345–369, 1995.

MORDUKHOVA et al. Synthesis of the phytohormone indole acetic acid by rhizosphere bacteria of the genus *Pseudomonas*. **Microbiology**, v. 60, p. 494-500, 1991.

MORENO et al. Growth and exopolysaccharide production by *Azotobacter vinelandii* on soil phenolic compounds. **Journal Applied Microbiology**, v. 86, p.439–445, 1999.

MORGANTE, P.G., 2003. **Fixação biológica e assimilação de nitrogênio**. Disponível em: <<http://www.ciagri.usp.br/~lazropp/FisoVegGrad>>. Acesso em: 12 de abril de 2009.

MOULIN et al. Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of proteobacteria. **Nature** v. 411, p. 948-950, 2001.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures. **Physiology Plant**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NAHAS, E.; TERENCEI, H. F.; ROSSI, A. Effect of carbon source and pH on the production and secretion of acid phosphatase (EC 3.1.3.2.) and alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1.) in *Neurospora crassa*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 128, p. 2017-2021, 1982.

NAHAS, E.; CENTURION, J. F.; ASSIS, L. C. Microrganismos solubilizadores de fosfato e produtores de fosfatases de vários solos. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 18, n. 1, p. 43-48, 1994.

NANDAKUMAR et al. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. **Soil Biology and Biochemistry**, v.33, p. 603-612, 2001.

NARAYANASWAMI, R.; VEERRAJU, V. IAA synthesis in paddy soil as influenced by ammonium sulfate fertilization. **Current science**, v.38, p. 517-518, 1996.

NARLOCH, G. Interações microrganismos solubilizadores de fosfatos – fungos ectomicorrízicos e o crescimento de *Pinus taeda* L. Florianópolis. 153 f. (Dissertação Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2002.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 170, n. 1, p. 265-270, 1999.

NEILANDS, J.B. Siderophores of bacteria and fungi. **Microbiology Science**, v.1, p. 9-14, 1984.

NEHL, D.B.; ALLEN, S.J.; BROWN, J.F. Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. **Applied Soil Ecology**, v.5, p. 1 – 20, 1996.

NELJUBOW DN Über die horizontale nutation der stengel von *Pisum sativum* und einiger anderen Pflanzen. **Beih Bot Zentralbl.** v.10, p. 128–139, 1901.

NELSON, T. S. et al. Hydrolysis of natural phytate phosphorus in the digestive tract of calves. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 42, n. 6, p. 1509-1512, 1976.

NETTO, J. M. **Maturadores e reguladores vegetais na cultura de cana-de-açúcar**. In SEGATO et al. (Ed.) **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba – São Paulo, 2006. p. 307-318.

NORMANDER, B. O.; PROSSER, J. I. Bacterial origin and community composition in the barley phytosphere as a function of habitat and presowing conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 4372-4377, 2000.

NOVAIS, R. F.; SMYTH, T. J. **Fósforo em solo e planta em condições tropicais**. (Ed.). Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1999. 399 p.

NUBEL et al. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rDNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, v.178, p. 5636–5643, 1996.

OGOSHI, A. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraespecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. **Annual Review of Phytopathology**, v.25, p.125-143, 1987.

OKON, Y., LABANDERA-GONZALEZ, C.A., Agronomic applications of Azospirillum. In: RYDER, M.H., STEPHENS, P.M., BOWEN, G.D. (Eds.), Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria. **Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization**, Adelaide, Australia, 1994. p. 274–278.

OKUBARA, P. A.; KORNOELY, J. P.; LANDA, B. B. Rhizosphere colonization of hexaploid wheat by *Pseudomonas fluorescens* strains Q8rl-96 and Q2-87 is cultivar-variable and associated with changes in gross root morphology. **Biology Control**, v.30, p. 392–403, 2004.

OLIVEIRA, E. **Estudo da associação entre bactérias diazotróficas e arroz**. 96 f. (Dissertação Mestrado em Agronomia-Ciência do solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 1992.

OLIVEIRA-SILVA et al. Influência de fatores sócio econômicos na contaminação por agrotóxicos, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.35, p. 1-11, 2001.

OWEN, A. e ZDOR, R. Effect of cyanogenic rhizobacteria on the growth of velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) and corn (*Zea mays*) in autoclaved soil and the influence of supplemental glycine. **Soil Biology and Biochemistry**, v.33, p.801-809, 2001.

PAULITZ, T.C.; BELANGER, R. R. Biological control in greenhouse systems. **Annual Review of Phytopathology**, v. 39, p. 103-133, 2001.

PALLERONI, N.J. *Pseudomonas* classification: A new case history in the taxonomy of Gram-negative bacteria. Antonie van Leeuwenhoek; **Journal of Microbiology and Serology**, Delft, v.64, p.231-251, 1993.

PARKE, J. L. Root colonization by indigenous and introduced microorganisms, *In* D. L. KEISTER AND P. B. GREGAN (ed.), **The rhizosphere and plant growth**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 1991. p. 33–42.

PARKE, J.L.; GURIAN-SHERMAN, D. Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. **Annual Reviews Phytopathology**, v. 39, p. 225–258, 2001.

Pati B R, Sengupta S, Chandra A K Studies of the amino acids released by phyllosphere diazotrophic bacteria. **Microbiology Research**, v.149, p. 287-290, 1994.

PATTEN, C.L., GLICK, B.R. Role of *Pseudomonas putida* indolacetic acid in development of the host plant root system. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p. 3795-3801, 2002.

PEACOCK et al. Soil microbial community responses to dairy manure or ammonium nitrate applications. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, p. 1011-1019, 2001.

PEDRAZA et al. Aromatic amino acid aminotransferase activity and indole-3-acetic production by associative nitrogen-fixing bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.233, p.15-21, 2004.

PEÑALOZA-VAZQUEZ et al. Cloning and sequencing of the genes involved in glyphosate utilization by *Pseudomonas pseudomallei*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, n.2, p. 538-543, 1995.

PEOPLES, M.B.; CRASWELL, E.T. Biological nitrogen fixation: investments, expectations and actual contributions to agriculture. **Plant and Soil**, v.141, n.1-2, p.13-40, 1992.

PERIN, L.; ARAÚJO, J.L.S.; REIS, V.M. **Aspectos genéticos e moleculares na interação entre organismos patogênicos e diazotróficos em cana-de-açúcar**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 41p.(Documentos 233. 2007).

PERSSON J, NÄSHOLM T Amino acid uptake: a widespread ability among boreal forest plants. **Ecology Letters**, v.4, p. 434-438, 2001.

PESARO, M.; WIDMER, F. Identification and specific detection of a novel *Pseudomonadaceae* cluster associated with soils from winter wheat plots of a long-term agricultural field experiment. **Applied Environmental Microbiology**, v.72, p. 37–43, 2006.

PETTERSSON, M.; BÅÅTH, E. Effects of the properties of the bacterial community on pH adaptation during recolonization of a humus soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.36, p.1383–1388, 2004.

PETTI, C.; A, POLAGE, C.R.; SCHRECKENBERGER, P. The role of 16s rna gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 6123-6125, 2005.

PIDELLO, A. The effect of *Pseudomonas fluorescens* strains varying in pyoverdine production on the soil redox status. **Plant Soil**, v.253, p.373-379, 2003.

PIERIK et al. The Janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. **TRENDS Plant Science**, v.11, p.176-183, 2006.

PIERSON, L.S., THOMASHOW, L.S., Cloning and heterologous expression of the phenazine biosynthetic locus from *Pseudomonas aureofaciens*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.5, p. 330-339, 1992.

PING, L., AND W. BOLAND. Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. **Trends Plant Science**. v.9, p. 263–269, 2004.

POLIDORO et al. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio na cultura da cana-de-açúcar em condições de Campo. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 24., REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 8., SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 6., REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 3., 2000, Santa Maria-RS. Biodinâmica do solo Santa Maria: SBCS, SBM, 2000. 216p. FERTBIO, 2000. p. 457-458.

POLONENKO et al. Effects of root colonizing bacteria on nodulation of soybean roots by *Bradyrhizobium japonicum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.33, p. 498-503, 1987.

POLY, F.; MONROZIER, L. J.; BALLY, R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. **Microbiological research**, v. 152, p. 95–103, 2001.

POSTGATE, J.R. **The fundamental of nitrogen fixation**. Cambridge: Cambridge University Press, 252 p., 1983.

POTGIETER, H., ALEXANDER, M., Susceptibility and resistance of several fungi to microbial lysis. **Jornal Bacteriology**, v. 91, p. 1526-1532. 1996.

POSTMA et al. Microbial enrichment to enhance the disease suppressive activity of compost. **European Journal Soil Biology**, v. 39, p. 157–163. 2003.

PUGGINA, W. A.; ISHERWOOD, K. F., **Mineral Fertilizer Use and the Environment**, by: International Fertilizer Industry Association. MR. A. E. (JOHNNY) JOHNSTON, IACR-ROTHAMSTED, U. K., in reviewing and correcting the text is gratefully acknowledged. (Ed.). Paris, February 2000. 64p.

QU, L.; MICHOT, B.; BACHELLERIE, J. P. Improved methods for structure probing in large RNAs: a rapid “heterologous” sequencing approach is coupled to the direct mapping of nuclease accessible sites. Application to the 5’ terminal domain of eukaryotic 28S rRNA. **Nucleic Acids Research**, v. 11:5903-5919, 1983.

QUAN et al. Purification and properties of antibiotic from Burkholderia cepacia CF-66. **Acta Microbiologia Sinica**, v.45, p.707–710, 2005.

RAID, R. N. Pokkah boeng disease of sugarcane. Agronomy Department, University of Florida, Gainesville. Disponível em < <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/SC> > , 2006.

RAAIJMAKERS, J.M.; WELLER, D.M. e THOMASHOW, L.S. Frequency of antibiotic-producing Pseudomonas spp. In natural environments. **Applied Environmental Microbiology**, v.63, p.881- 887, 1997.

RAMAMOORTHY et al. Induction of systems resistance by plant growth promotion rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, v.20, p.1-11, 2001.

REICHARDT, K.; TIMM, L. C. Absorção de nutrientes pelas plantas. **Solo, planta e atmosfera: conceitos, processos e aplicações**. São Paulo: Ed. Manole, 2004. p. 341-362.

REID, M.S.. In: P.J. Davies (eds). **Plant hormones and their roles in plant growth and development**. Martinus Nijhoff Publishers. 1989. p. 257-279,

REINHARDT. et al. Molecular characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from brazilian agricultural plants at São Paulo State. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.414-422, 2008.

REIS et al. Erradicação de fungos patogênicos associados a sementes de milho e proteção contra *Pythium* spp. presente no solo pelo tratamento com fungicidas. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, p.585-590, 1995.

REIS, E.M. e CASA, R.T. **Manual de identificação e controle de doenças de milho**. Passo Fundo: Aldeia Norte, 1996.

REIS et al. Ação de herbicidas sobre microrganismos solubilizadores de fosfato inorgânico em solo rizosférico de cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 26, n. 2, p. 333-341, 2008

REIS et al. *Burkholderia tropica* sp. nov. a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.54, p. 2155-2162, 2004

REIS et al. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Reviews in Plant Science**, v.19, p.227-247, 2000.

REIS, V.M.; TEIXEIRA, K.R.S. Fixação biológica de nitrogênio - estado de arte. In: AQUINO, A. M.; ASSIS, R. L. **Processos biológicos no sistema solo-planta: ferramentas para uma agricultura sustentável**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 151- 180. 2005.

REITER et al. Cloning and characterization of EstC from *Burkholderia gladioli*, a Noveltype esterase related to plant enzymes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.54, p. 778-785, 2000.

RENNIE et al. Isolation and identification of N₂-fixing bacteria associated with sugar cane (*Saccharum* sp.). **Canadian Journal Microbiology**, v.28, p.462-467, 1982.

RENTSCH D, SCHMIDT S, TEGEDER M Transporters for uptake and allocation of organic nitrogen compounds in plants. **FEBS Letters**, v.581, p.2281-2289, 2007.

REVILLAS et al. Production of amino acids by *Azotobacter vinelandii* and *Azotobacter chroococcum* with phenolic compounds as sole carbon source under diazotrophic and adiazotrophic conditions. **Amino acids**, v.28, p.421-425, 2005.

ROBSON et al. Second gene (*nifH*) coding for a nitrogenase iron-protein in *Azotobacter chroococcum* is adjacent to a gene coding for a ferredoxin-like protein, **The EMBO Journal**, v. 5, p. 1159-1163, 1986.

RODLEY, P.D.; ROMLING, U.; TUMMLER, B.A. Physical genome map of the *Burkholderia cepacia* type strain. **Molecular Microbiology**, v.17, p. 57-67, 1995.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, Oxford, v.17, p.319-339, 1999.

RODRIGUES, R. Século XXI, o novo tempo da agroenergia renovável. **Visão Agrícola**, Piracicaba, n.1, p.4-7, 2004.

RODRIGUES, T.J.D., LEITE, I.C., **Fisiologia Vegetal: Hormônios das Plantas**. 78p. FUNEP. 2004. p.53-64.

ROMBEL, I.T.; MCMORRAN, B.J.; LAMONT, I.L. Identification of a DNA sequence motif required for expression of iron-regulated genes in pseudomonads. **Molecular General Genetics**, v.246, p.519-528, 1995.

ROSSETTO A J Utilização Agronômica dos Subprodutos e Resíduos da Indústria Açucareira e Alcooleira. In: Paranhos S B (ed) **Cana-de-açúcar - cultivo e utilização**. Fundação Cargill, Campinas, 1987. p. 433-504.

RUSCHEL, A P.; VOSE, P B. Biological Nitrogen Fixation in sugar cane. In: Subba Rao (ed) **Current developments in Biological Nitrogen Fixation**. Edward Arnold (Publishers) Ltd, London, 1984. p. 219-235.

RYU, R.; PATTEN, C. L. Aromatic Amino Acid-Dependent Expression of Indole-3-Pyruvate Decarboxylase Is Regulated by TyrR in *Enterobacter cloacae* UW5. **Journal of Bacteriology**, vol. 190, p. 7200–7208, 2008.

SALMERON-LOPEZ et al. Production of amino acids by Rhizobium, Mesorhizobium and Sinorhizobium strains in chemically defined media. **Amino Acids**, v.27, p. 169 – 174, 2004.

SANGUINO, A. Situação atual da pesquisa em doenças da cana-de-açúcar. **Summa Phytopathol.**, v.24, n.1, p.90-91, 1998.

SANTOS, A. V.; Dillon, R. J.; Dillon, V. M.; Reynolds, S.E.; Samuels, R. I. Occurrence of the antibiotic producing bacterium Burkholderia sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* **FEMS Microbiology Letters**, v.239, p. 319–323, 2004.

SCHNATHORST, W.C.; VERTICILLIUM WILT. IN: WATKINS, G.M. (Ed). **Compendium of cotton disease**. American Phytopathological Society, St. Paul: p. 41-44. 1981.

SCHROTH, N.M.; HANCOCK, J.G. Disease suppressive soil and root colonizing bacteria. **Science**, v.216, p.1376-1381, 1982.

SEGATO, et. al. **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba – São Paulo, Copyright, 2006. 415p.

SESSITCH et al. Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Ewinia carotovora* subsp. Atroseptica, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p.2261-2268, 2002.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. **Atividade de microrganismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 36, n. 12, p. 1495-1508, 2001.

SIMIONE, F. P. Criopreservation Manual. Nalge Nunc International Coop, Disponível em: <<http://nalgenelab.nalgenunc.com/techdata/technical/>>.1998. Acesso em julho/2009.

SIMPSON, F. B.; BURRIS, R. H. A nitrogen pressure of 50 atmosphere does prevent evolution of hydrogen by nitrogenase, **Science**, v. 224, p. 1095-1097, 1984.

SMIRNOV, V.V.; GARAGULYA, A.D.; KIPRIANOVA, E.A. Antibiotic properties of *Pseudomonas cepacia*. **Antibiotiki**, Moscow, v.27, p.577-580, 1982.

SMITH, B.E. Nitrogenase reveals its inner secrets. **Science**, v.297, p.1654-1655, 2002.

SNEH, B. Non pathogenic isolates of *Rhizoctonia* spp. (np-R) and their role in biological control. In: Sneh, B., Jabahi-Hare, S., Neate, S. e Dijst, G. (Eds.) *Rhizoctonia*

species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology, and disease control. Dordrecht. **Kluwer Academic Publishers**, 1996. p. 473-483.

SINGH, M.; KLEEBERGER, A.; KLINGMÜLLER, W. Location of nitrogen fixation (*nif*) genes on indigenous plasmids of *Enterobacter agglomerans*. **Molecular and General Genetics**, v.190, p.373-378, 1983.

SINHA, N. Criteria for Sustainable Exploitation of Minerals and Natural Resources. PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL CONFERENCE ON TECHNOLOGY AND MANAGEMENT FOR SUSTAINABLE EXPLOITATION OF MINERALS AND NATURAL RESOURCES (TAMSEM). Indian Institute of Technology, Kharagpur. 2004. p.5-7; 1- 17.

SITEPU et al. Potent Phosphate-Solubilizing Bacteria Isolated From Dipterocarps Grown In PEAT SWAMP FOREST IN CENTRAL KALIMANTAN AND THEIR POSSIBLE UTILIZATION FOR BIOREHABILITATION OF DEGRADED PEATLAND PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TROPICAL PEATLAND, Yogyakarta, Indonesia, August 2007.

SMITH, K.A., MCTAGGART, I.P. e TSURUTA, H. Emissions of N₂O and NO associated with nitrogen fertilization in intensive agriculture, and the potential for mitigation, **Soil Use and Management**, CAB International, Wallingford, U.K. v.13, p. 296- 304. 1997.

SPRENT, J. I.; SPRENT, P. **Nitrogen fixing organisms; pure and applied aspects**. London: Chapman and Hall, 256p. 1990.

STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall, 943p. 1992.

STACKEBRANDT et al. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology, **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 1043–1047, 2002 .

STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B. M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, p. 846-849, 1994.

STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. **Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics**, John Wiley e Sons, 1991. 329 p.

TAIZ, L. e ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**, 3 (ed.). Artmed Editora. p720, 2004.

TEIXEIRA, K. R. **Bases moleculares e genética da fixação biológica de nitrogênio**. Embrapa-CNPAB. Documentos, v. 32, p. 26, 1997.

TEIXEIRA et al. Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovarietades em três estados brasileiros **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.1, p.43-49, jan. 2007.

THULER et al. *Beijerinckia derxii* releases plant growth regulators and amino acids on synthetic media independent of nitrogenase activity. **Journal Applied Microbiology**, v.95, p. 799-806, 2003.

TOMLIN, C. The pesticide manual: incorporating the agrochemicals handbook. Surrey: **British Crop Protection Publish**, 1341p.1994.

TOKESHI, H. Doenças da cana-de-açúcar (híbridos de *Saccharum* spp.) In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Eds.). **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, v.2, p.207-225. 1997.

TORRES-RUBIO et al. Isolation of Enterobacteria, *Azotobacter* sp. and *Pseudomonas* sp., Producers of Indole-3-Acetic Acid and Siderophores, from Colombian Rice Rhizosphere. **Revista Latino americana de Microbiologia**, v.42, p.171-176. 2000.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; **Microbiologia**. (4 ed.). São Paulo, Ed. Atheneu 2005.

TRAN VAN et al. Promotion de croissance du riz inoculé par une bacterie fixatrice d'azote, *Burkholderia vietnamiensis*, isolée d'un sol sulfate acide du Viet-nam. **Agronomie**, v.14, p.697-707 (in French), 1994.

TRIVELIN, P.C.O. **Utilização do nitrogênio pela cana-de-açúcar: três casos estudados com o uso do traçador 15N**. Piracicaba, 143p. (Tese-Livre-docência) Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, 2000.

TUNDISI, J.G. **Água no século XXI: Enfrentando a escassez**. São Carlos: RIMA, 2003. 248p.

TURNER, G. L.; GIBSON, A.H. Measurement of nitrogen fixation by indirect means. In: BERGENSEN, F.J. **Methods for evaluating biological nitrogen fixation**. London: John Wiley e Son Publ., p. 111-39. 1980.

TYLER, S.D.; ROZEE, K.R.; E JOHNSON, W.M. Identification of IS1356, a new insertion sequence, and its association with IS402 in epidemic strains of *Burkholderia cepacia* infecting cystic fibrosis patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, p. 1610-1616, 1996.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR (ÚNICA) e UNIÃO DOS PRODUTORES DE BIOENERGIA (UDOP) - **Estudos mostram melhorias no mercado de trabalho do setor sucroalcooleiro e desafios da mecanização**, número 2080, 2008. Disponível em <http://www.udop.com.br/download/unica/not_2080.pdf. > Acesso em 2 de julho 2009.

URAKAMI et al. Transfer of *Pseudomonas plantarii* and *Pseudomonas glumae* to *Burkholderia* as *Burkholderia* spp. And description of *Burkholderia vandii* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 1994.

URQUIAGA, S.; CRUZ, K.H.S.; BODDEY, R.M. Contribution of nitrogen-fixation to sugarcane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimate, **Soil Science Society of America Journal**, v. 56, p. 105-114, 1992.

VAN BERKUN, P.; FUHRMANN, J. J.; EARDLY, B. D. Phylogeny of Rhizobia. In: PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M.; YATES, G.; NEWTON, W.E. **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Foz do Iguaçu: Kluwer Academic Publishers, p 3-8, 2000.

VANDAMME et al. Polyphasic taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics. **Microbiological Reviews**, v. 60, p. 407-437, 1996.

VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. In: VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. (Ed.). **Biologia dos solos dos Cerrados**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 524p. 1997.

VASSILEV, N.; VASSILEVA, M. Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. **Applied microbiology and Biotechnology**, v. 71, p. 137-144, 2006.

VAZQUEZ et al. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. **Biology and Fertility of Soils**, v.30, p.460–468, 2000.

VELAZHAHAN, R.; SAMIYAPPAN, R.; VIDHYASEKARAN, P., Relationship between antagonistic activities of *Pseudomonas yuorescens* isolates against *Rhizoctonia solani* and their production of lytic enzyme. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v.106, p. 244-250, 1999.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophic from deep water rice, **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 127-141, 2001.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant Soil**, v.255, p. 571-586, 2003.

VISWANATHAN, R.; SAMIYAPPAN, R. Induced systemic resistance by fluorescent pseudomonas against red rot disease of sugarcane caused by *Colletotrichum falcatum*. **Crop Protection**, v. 21, p. 1-10, 2002.

VITTI et al. **Nutrição e adubação da cana-de-açúcar**. Disponível em <www.agencia.cnptia.embrapa.br> acesso em 18.07.09, 2005.

VON DER WEID et al. Diversity of *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from the rhizosphere of maize planted in Cerrado soil. **Research in Microbiology**, Paris, v. 151, p. 369-381, 2000.

XAVIER, R. P. **Adubação verde em cana-de-açúcar: influência na nutrição nitrogenada e na decomposição dos resíduos da colheita**. 108 f. (Dissertação Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2002.

WAYNE et al. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics, **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, p. 463-464, 1987.

WEBER et al. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. **Plant and soil**, Dordrecht, v. 210, p. 103-113, 1999.

WEBER, O.B.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. **Bactérias diazotróficas em mudas de bananeiras**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, DF, V. 35, p. 227-2285, 2000.

WELBAUM et al. Fertilizing soil microorganisms to improve productivity of agroecosystems. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.23, p.175–193, 2004.

WELLER, D. M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. **Annual Review Phytopathol**, v.26, p.379–407, 1988.

WELLINGHAUSEN et al. Superiority of Molecular Techniques for Identification of Gram-Negative, Oxidase Positive Rods, Including Morphologically Nontypical *Pseudomonas aeruginosa*, from Patients with Cystic Fibrosis **Journal Of Clinical Microbiology**, p. 4070–4075 Vol. 43, No. 8 Aug. 2005.

WHIPPS, J. M. Developments in the biological control of soil-borne plant pathogens. **Advances in Botanical Research**, v.26, p.1–133. 1997.

WHIPPS, J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v.52, p.487-511, 2001.

WIGLEY, P., E BURTON, N.F. Multiple chromosomes in *Burkholderia cepacia* and *B. gladioli* and their distribution in clinical and environmental strains of *B. cepacia*. **Journal Applied Microbiology**, v.88, p. 914–918, 2000.

WOESE, C. R. Bacterial Evolution, **Microbiological Reviews**, v. 2, p. 221-271, 1987.
YABUUCHI et al. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of 7 species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. Nov. **Microbiology and Immunology**, v.36,p. 1251-1275, 1992.

YANG, T.; LAW, D.M.; DAVIES, P.J. Magnitude and kinetics of stem elongation induced by exogenous indole-3-acetic acid in intact light grown pea seedling. **Plant Physiology**, v.102, p.717-724, 1993.

YANGRUI LI; SOLOMON S., Ethephon: A versatile growth regulator for sugar cane industry. **Sugar Technology**, v.5 , p. 213-223. 2003.

YAO et al. Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.52, p. 2219-2230, 2002.

YASMIN et al. Effect of PGPR Inoculation on growth and yield of Sweetpotato. **Journal of biological Sciences**, v.7, p. 421-434, 2007.

YEE, D.C.; MAYNARD, J.A.; WOOD T. K. Rhizoremediation of Trichloroethylene by a Recombinant, Root-Colonizing *Pseudomonas fluorescens* Strain Expressing Toluene *ortho*-Monooxygenase Constitutively **Applied And Environmental Microbiology**, v. 64, p. 112–118, 1998.

YOHALEM, D. S.; LORBEER, J. W. Distribution of Burkholderia cepacia phenotypes by niche, method of isolation and pathogenicity to onion. **Annual Applied Biology**, v.130, p. 467- 479, 1997.

YOUNG, J.P.W. Taxonomy of rhizobia. In: DIVERSITY AND TAXONOMY OF RHIZOBIA, Proceeding. Beijing: **China Agricultural Sciencetech Press**, p. 3-10, 1996.

ZAK et al. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. **Soil Biology and Biochemistry**, v.26, p.1101- 1108, 1994.

ZAGO, V.C.P.; DE-POLLI, H.; RUMJANEK, N.G. **Pseudonomas spp. Fluorescentes. Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontroladoras de fitopatógenos em sistemas de produção agrícola.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 32p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 127), 2000.

ZHAO et al. Diversity of nitrogenase Systems in Diazotrophs. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 48, p. 745-755, 2006.

ZEHR et al. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. **Environmental Microbiology**, v.5, p.539-554, 2003.

ZENG et al. Medium optimization for the novel antifungal material by Burkholderia cepacia CF-66. **Chinese Journal Biotechnology**, v.26, p.56–60, 2006.

ZIMMER, W.; BOTHE, H. The phytohormonal interactions between Azospirillum and wheat. **Plant and Soil**, v.110, p. 239-247, 1988.

ZINNIEL et al. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2198-2208, 2002.

ZINONI, F.; ROBSON, M.; ROBSON, R.L. Organization of potential alternative nitrogenase genes from *Clostridium pasteurianum*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1174, p. 83-86, 1993.

ZUURBIER, P.; VOOREN, J.V. **Sugarcane ethanol contributions to climate change mitigation and the environment.** (ed). Wageningen Academic Publishers. The Netherlands, 2008, 255p.

GLOSSÁRIO

ARA	ACETYLENE REDUCTION ASSAY
ATP	ADENOSINA TRIFOSFATO
ATCC	AMERICAN TYPE CULTURE COLECTION
atm	ATMOSFÉRA
BFN	BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO
CTAB	<i>CETYL TRIMETHYL AMMONIUM BROMIDE</i>
DNA	ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLÉICO
EPS	EXOPOLISSACARÍDEOS

EDTA	ETHYLENEDIAMINE TETRAACETIC ACID
FBN	FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGENIO
Fe	FERRO
ICB	INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
JMV	JOHANNA MANITOL VERA
Kb	KILOBASES
LB	MEIO DE CULTURA LURIA BERTANI
LG	LIPMAN GLICOSE
LGD	LIPMAN GLICOSE DERXIA
LGI	LIPMAN GLICOSE IVO
Mb	MEGABASES
mg	MILIGRAMA
Mo	MOLIBDÊNIO
ng	NANO GRAMA
N	NITROGÊNIO
NFb	NOVO FABIO
P	FÓSFORO
pb	PAR DE BASES
PCR	“POLYMERASE CHAIN REACTION”
q.s.p	QUANTIDADE SUFICIENTE PARA
RNA	ÁCIDO RIBONUCLÉICO
rpm	ROTAÇÕES POR MINUTO
RPCPs	RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS
UFC	UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIA
µg	MICROGRAMA
µl	MICROLITRO
Va	VANÁDIO
TBE	TRIS-BORATE-EDTA
TAE	TRIS-ACETATO- EDTA

ANEXOS

Anexo A – Tabela meios de cultura seletivos

Tabela A.1: Meios de cultura seletivos e os respectivos gêneros que foram nestes isolados.

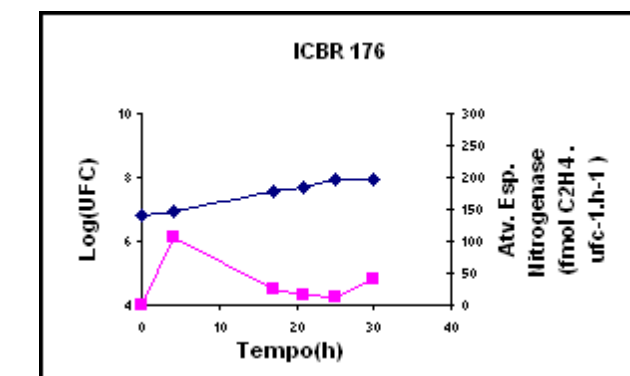
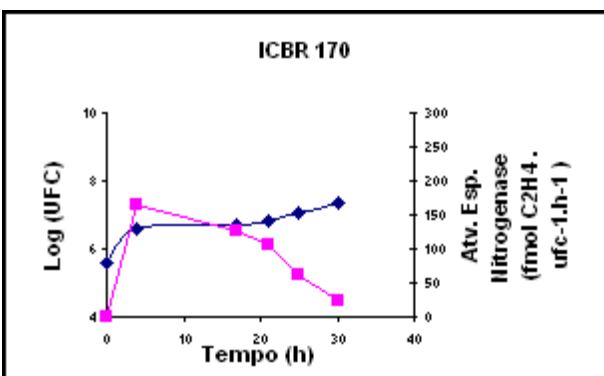
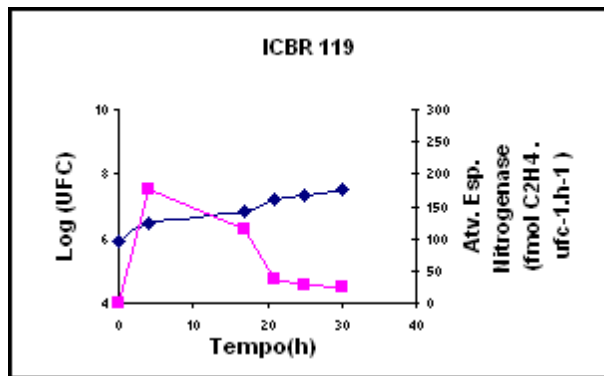
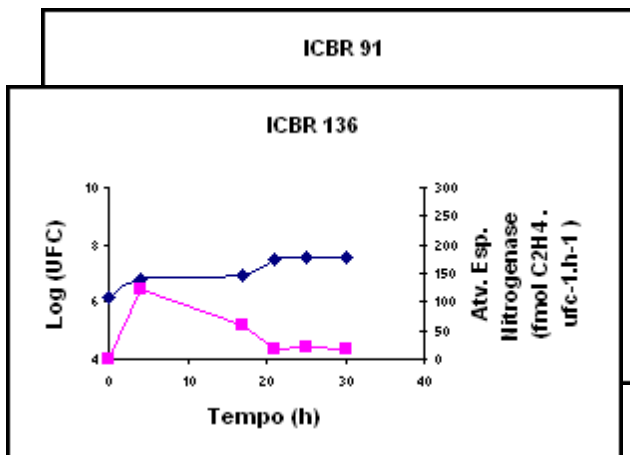
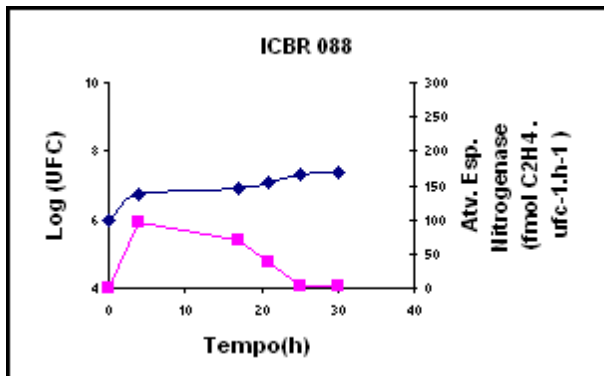
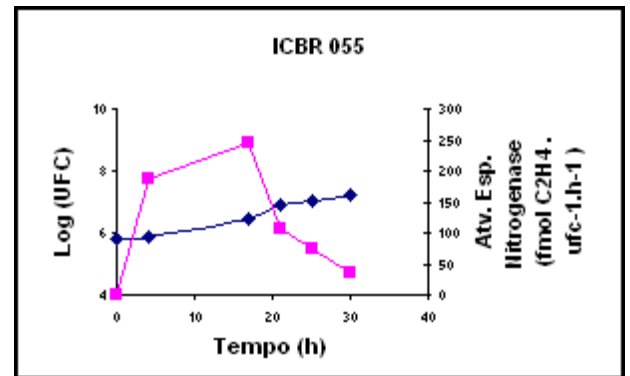
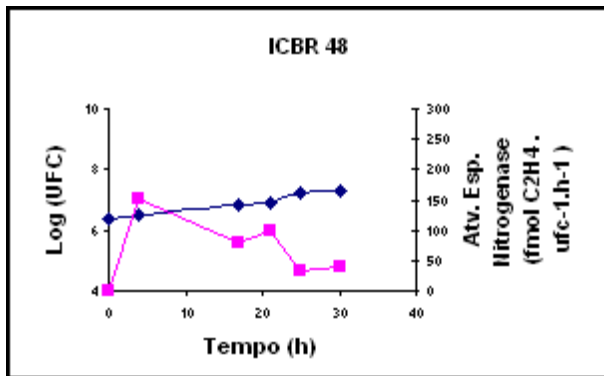
Gêneros	Meios de Cultura						
	NFb	JNFb	LGI	LG	LGD	JMV	King Mod

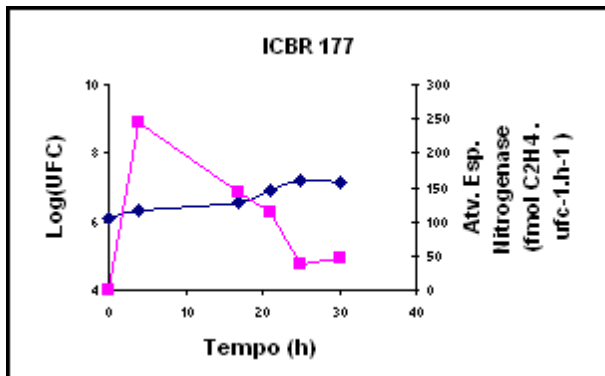
<i>Beijerinckia</i>	4		1	3	1		
<i>Burkholderia</i>	2	3	2		2	1	1
<i>Enterobacter</i>		4			2	2	4
<i>Klebsiella</i>	5	4					
<i>Pseudomonas</i>	3	2				1	9

Anexo B

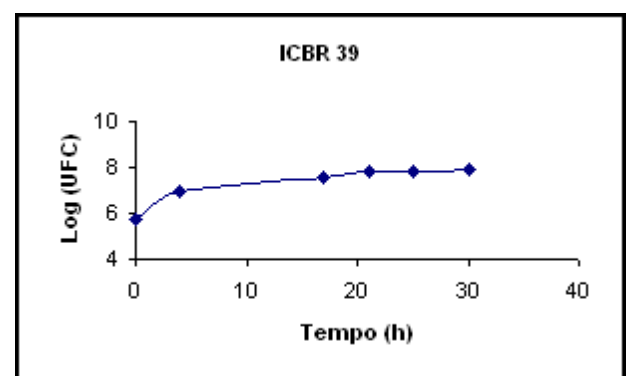
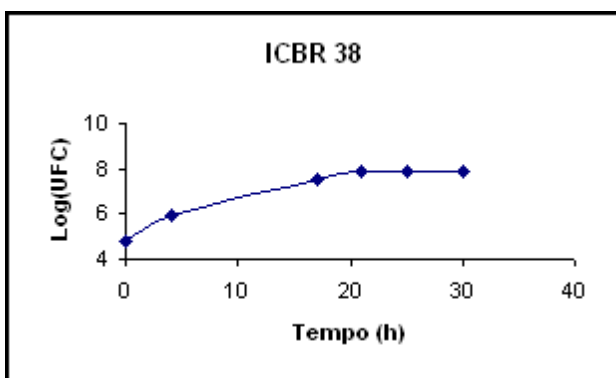
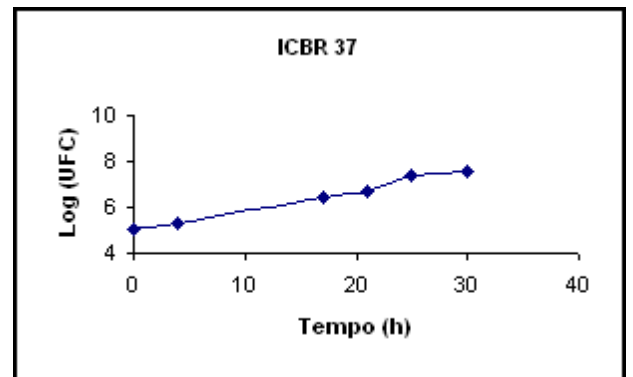
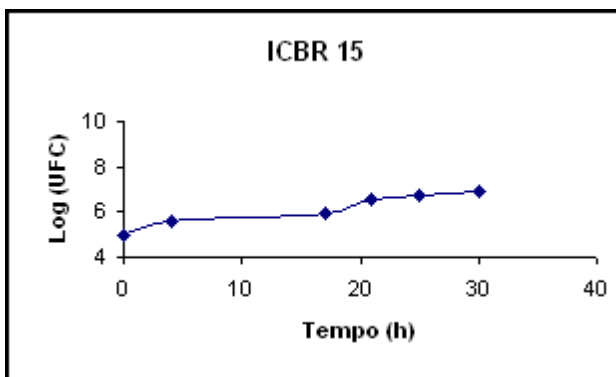
Gráficos elaborados da atividade específica da enzima nitrogenase (e/ou, sem atividade), determinada pelo ARA (item 3.4.1), concomitante a UFC em função do tempo (expresso em Log da UFC e $\text{fmol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{ufc}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

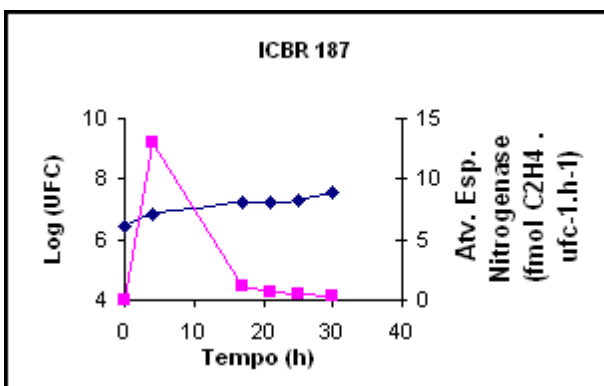
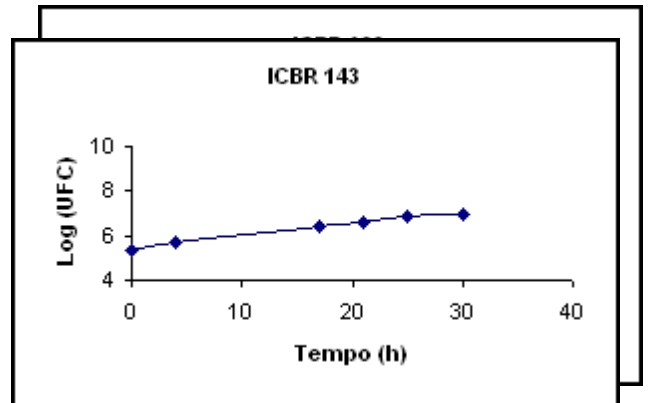
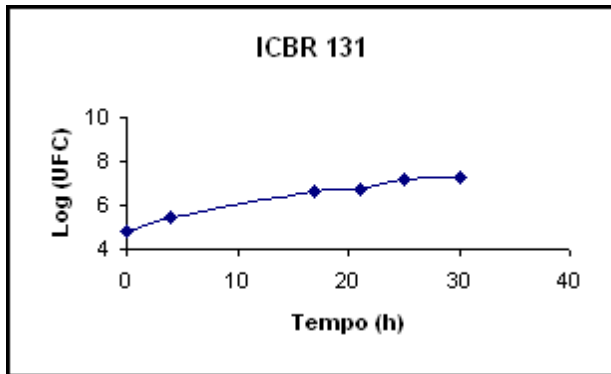
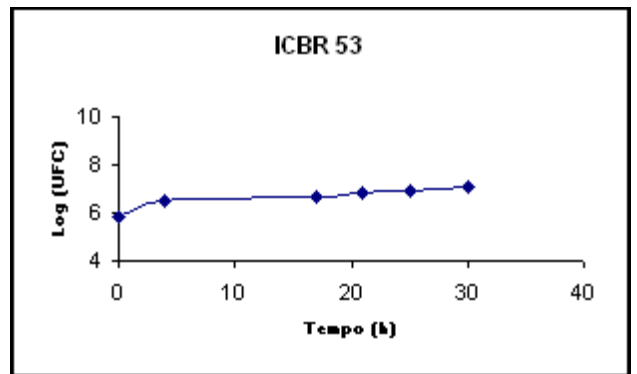
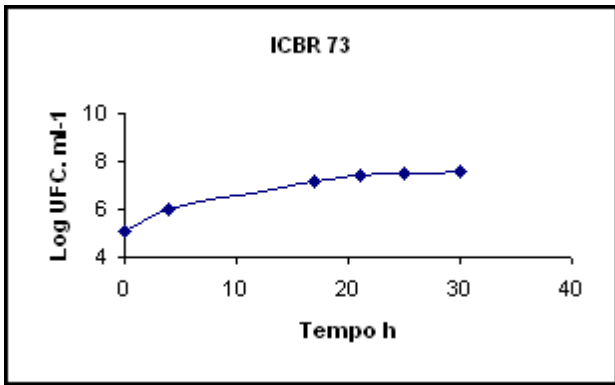
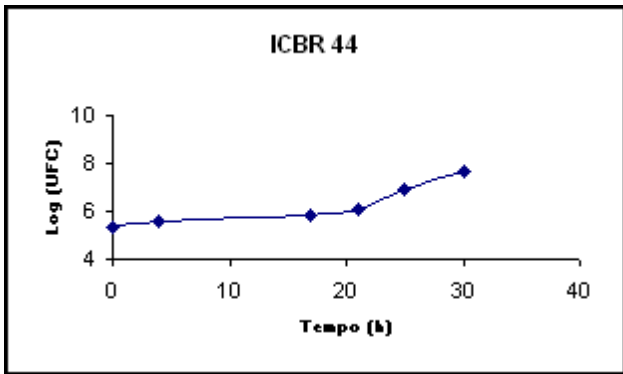
Anexo B.1 - Linhagem *Beijerinckia*



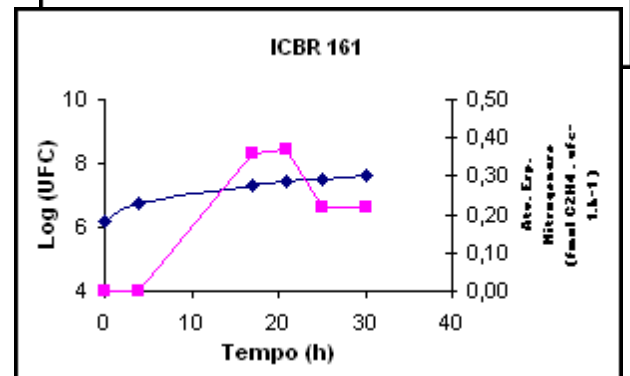
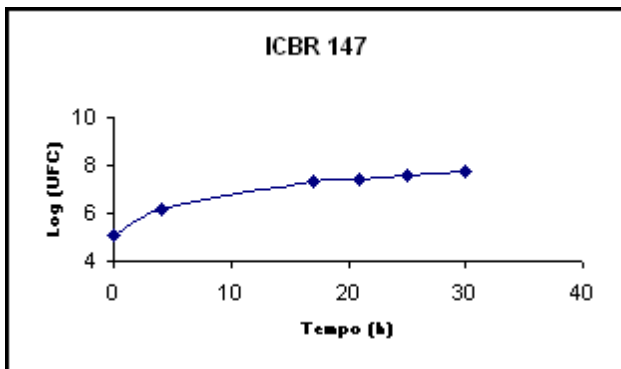
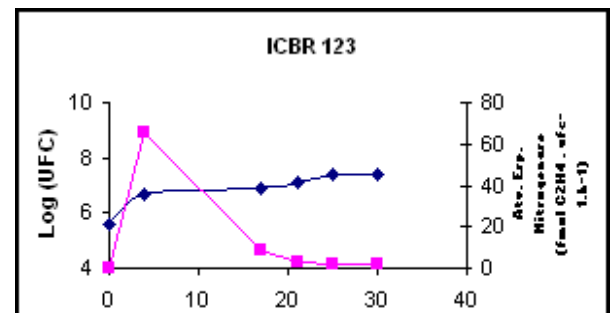
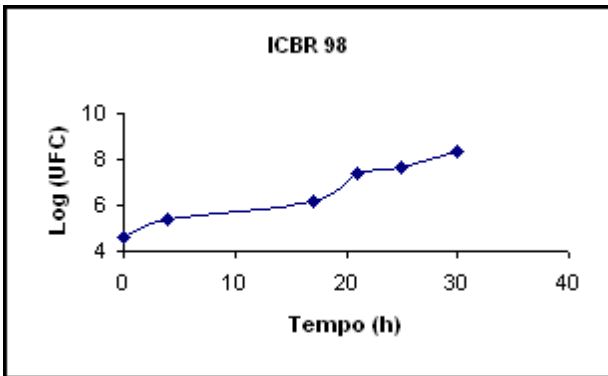
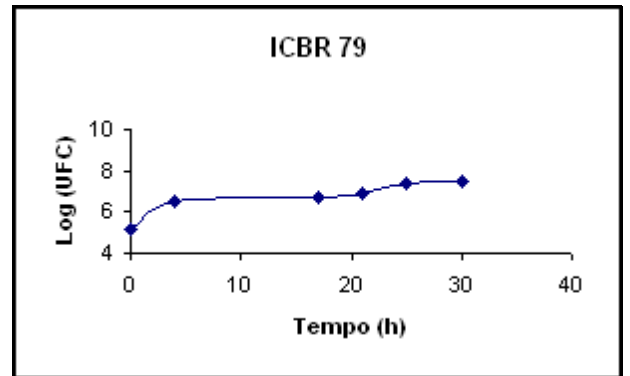
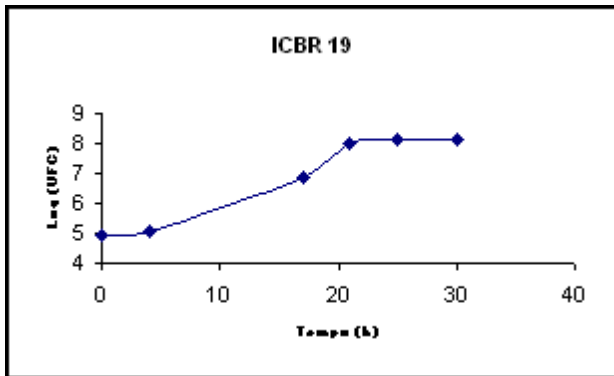


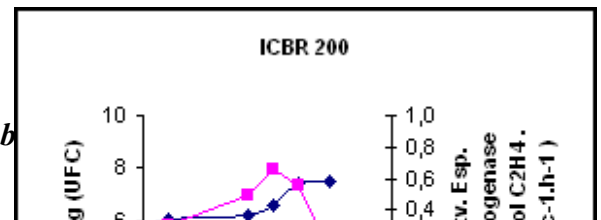
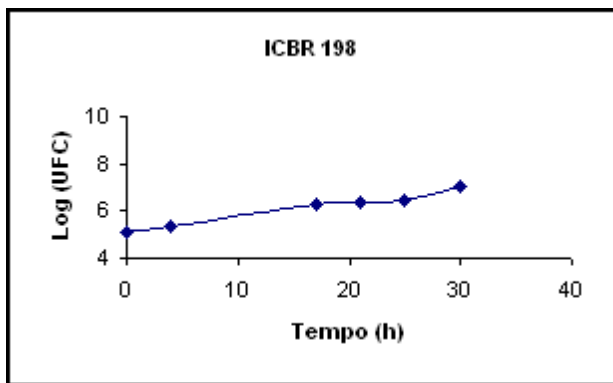
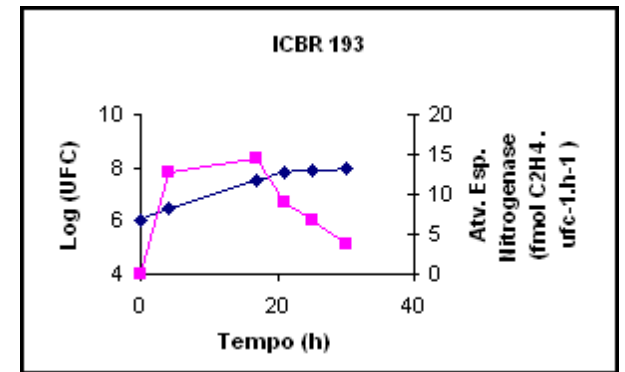
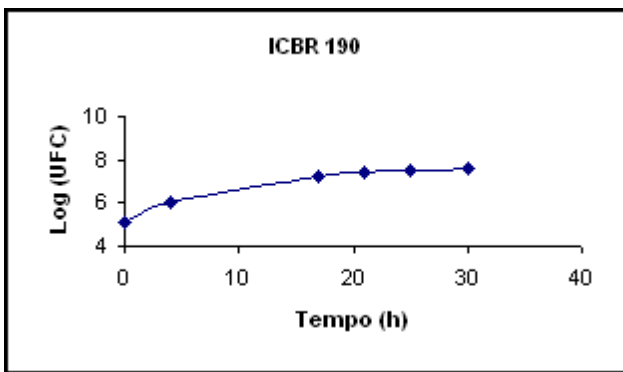
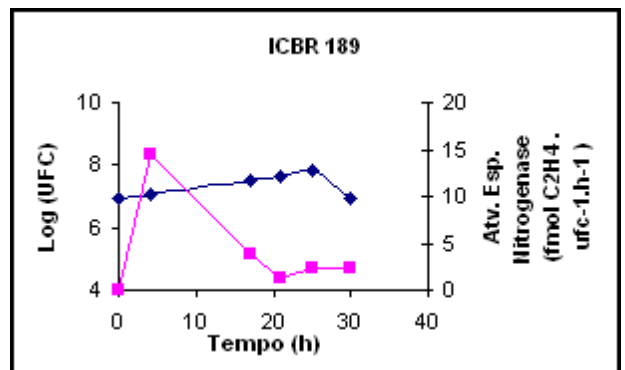
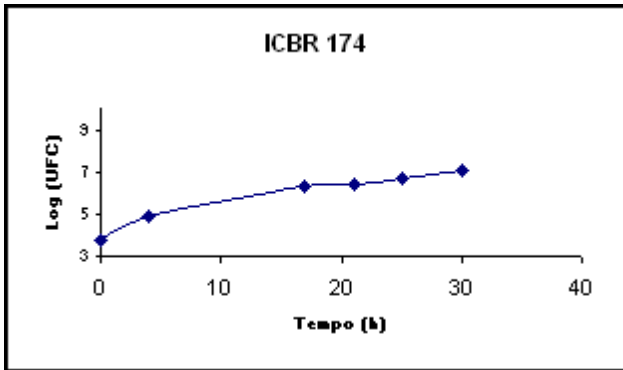
Anexo B.2 - Linhagem *Burkholderia*



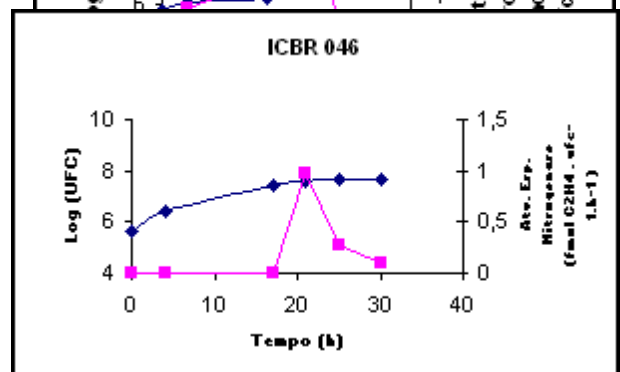
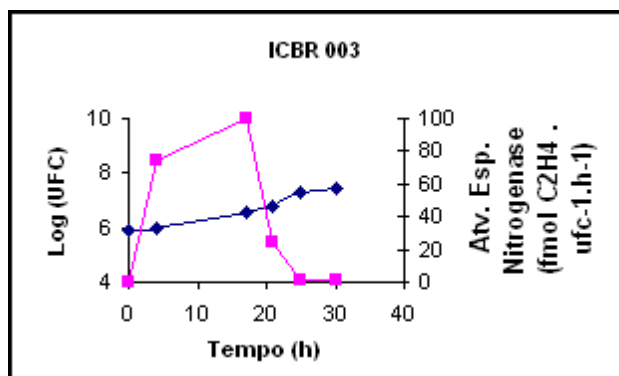


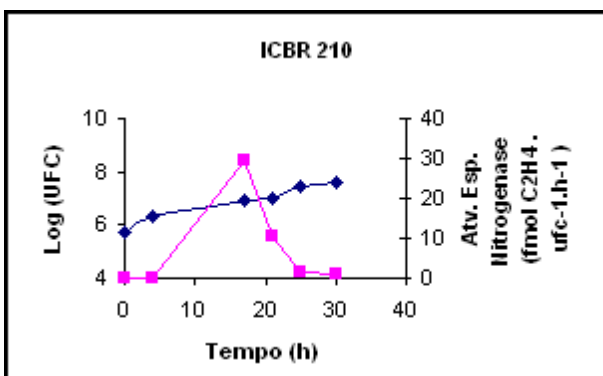
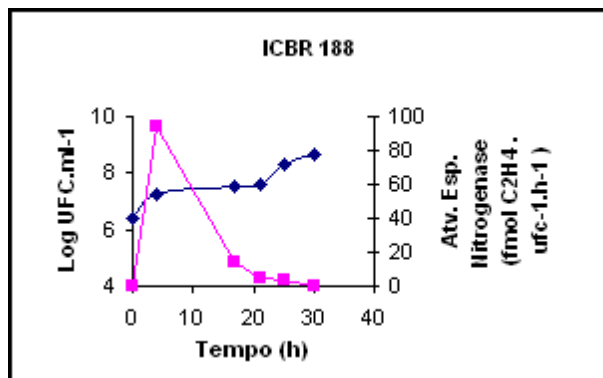
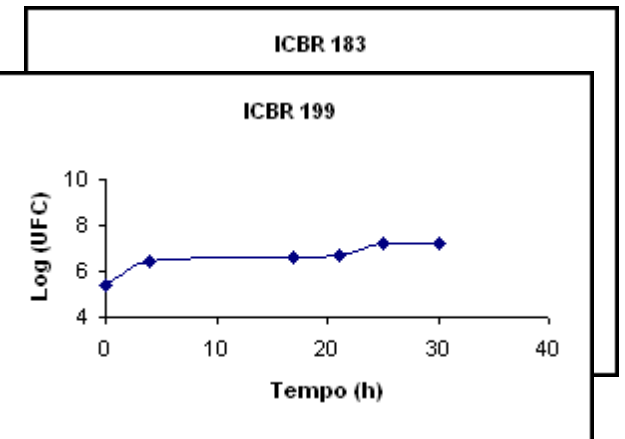
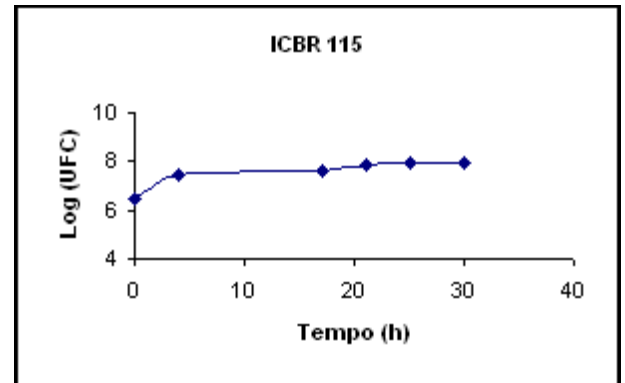
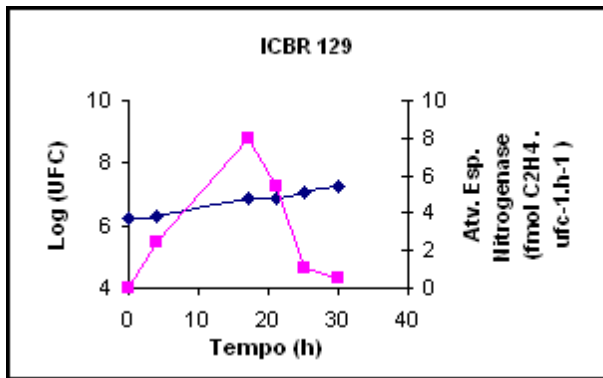
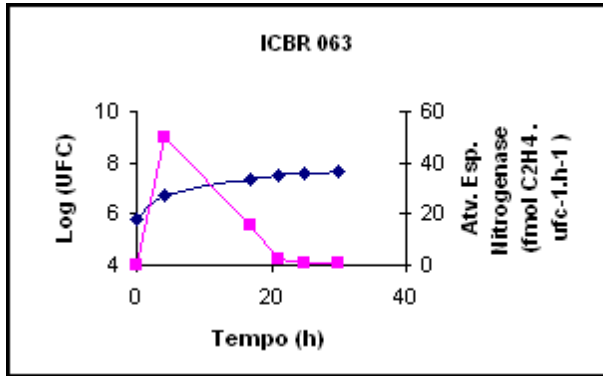
Anexo B.3 - Linhagem *Enterobacter*



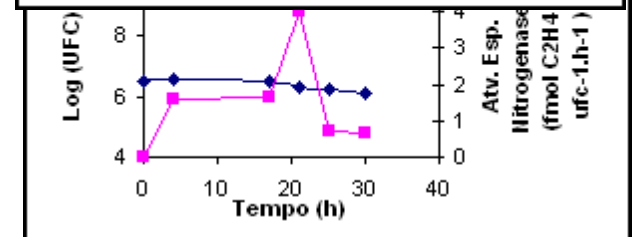
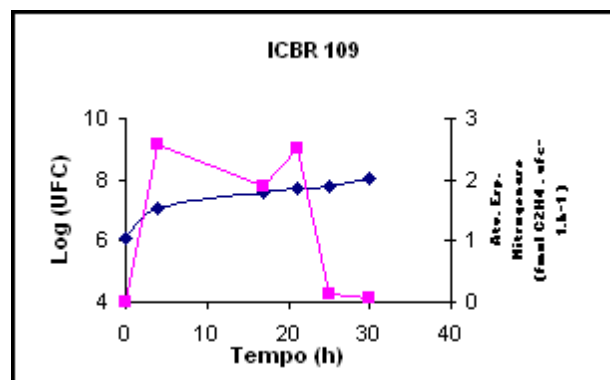
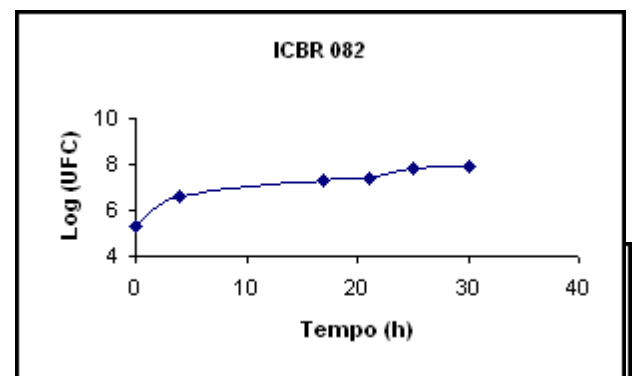
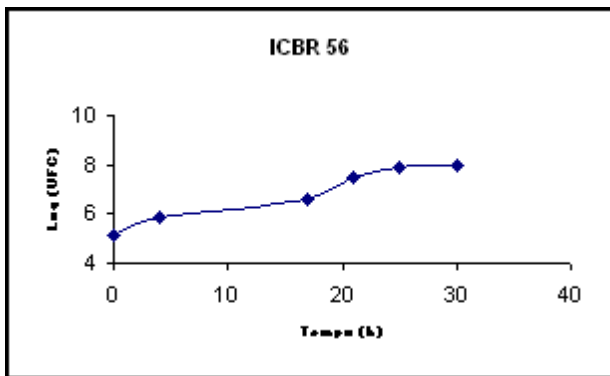
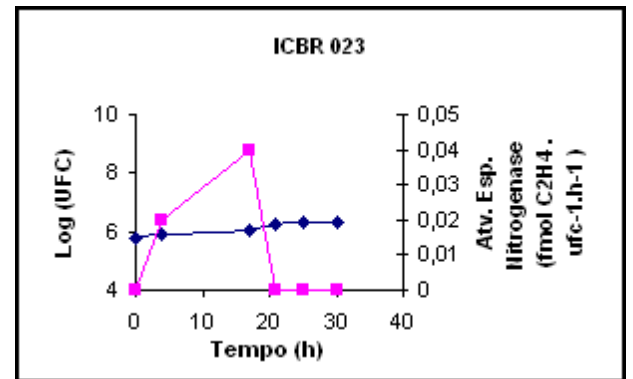
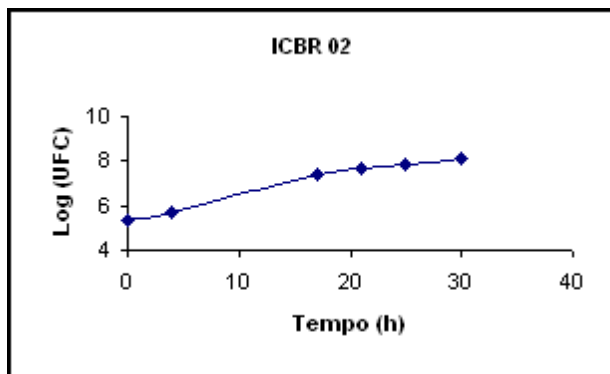


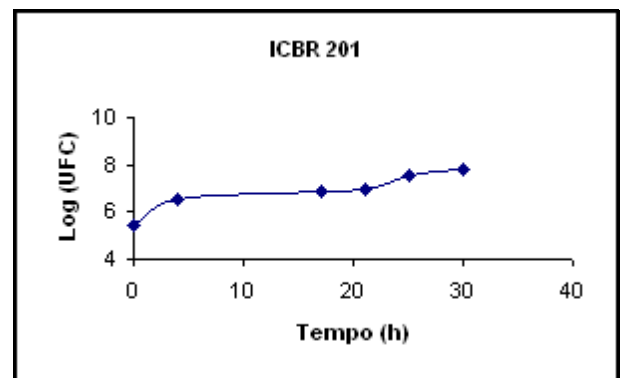
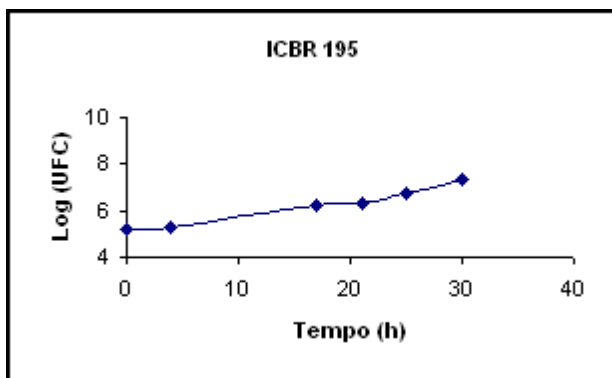
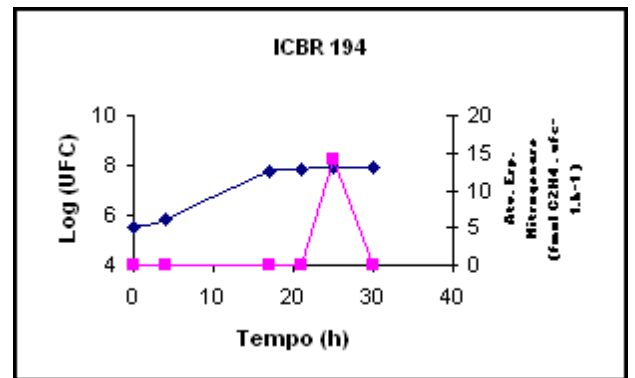
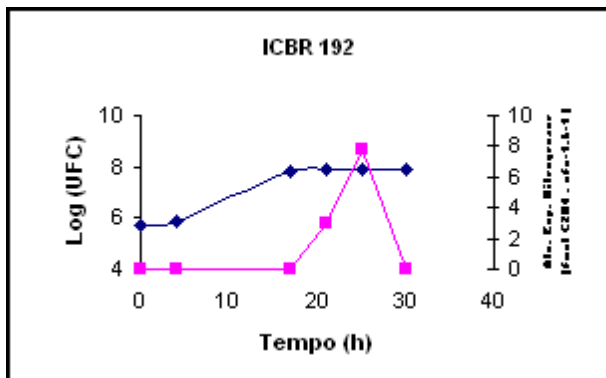
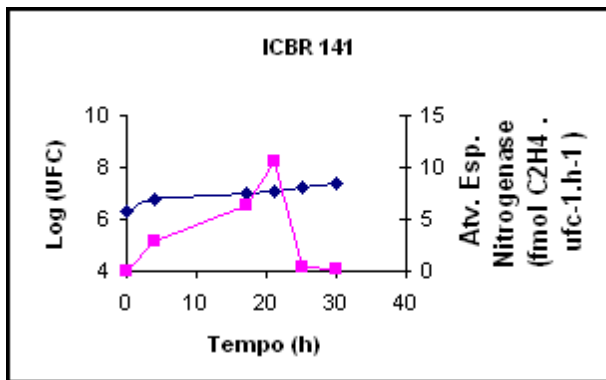
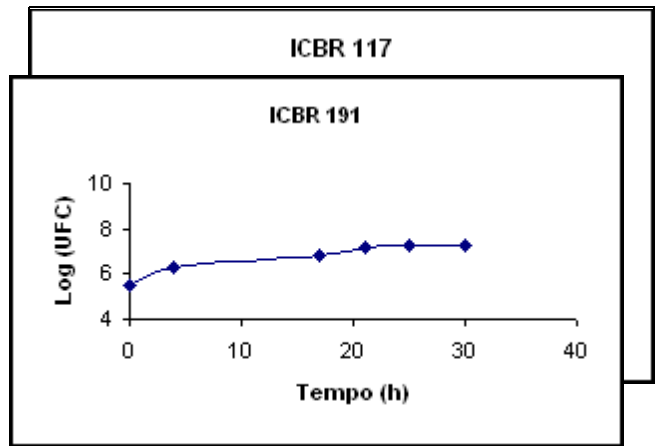
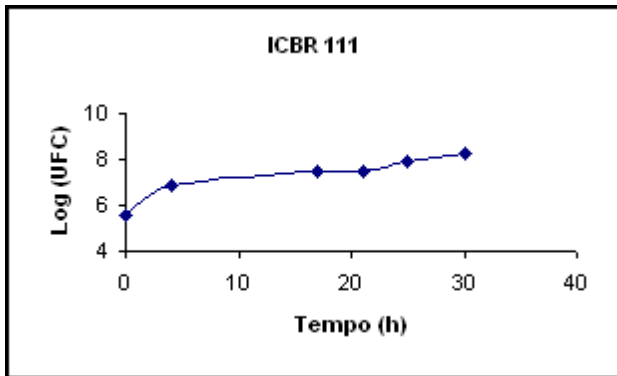
Anexo B.4 - Linhagem *Klebs*

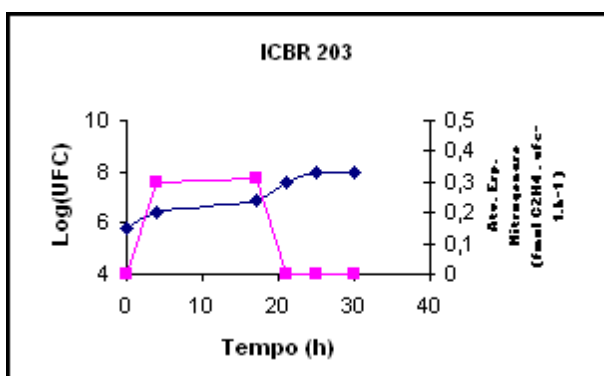




Anexo B.5 - Linhagem *Pseudomonas*







Anexo C – Número de gerações das rizobactérias

Tabela C.1: Número de gerações das rizobactérias submetidas á atividade da nitrogenase.

Linhagem	ICBR	Nr. Gerações
<i>Burkholderia</i>	37	7,7
	39	6,9
	38	10,2
	44	6,2

	53	3,4
	73	7,6
	83	6,8
	131	7,9
	143	5,2
	187	3,7
<hr/>		
	48	2,9
	55	4,9
	88	4,6
	91	7,9
<i>Beijerinckia</i>	119	5,4
	136	4,5
	170	5,9
	176	3,6
	177	3,7
<hr/>		
	19	10,0
	79	7,5
	98	12,4
	123	6,2
	147	8,8
<i>Enterobacter</i>	161	4,8
	174	11,0
	189	2,8
	190	7,1
	193	5,9
	198	4,1
	200	5,7
<hr/>		
	3	4,7
	46	6,6
	63	5,6
	115	4,5
<i>Klebsiella</i>	129	3,4
	183	5,1
	188	7,4
	199	6,0
	210	5,5
<hr/>		
	2	7,0
	23	1,7
	56	9,3
	82	8,1
	109	5,6
	111	8,9
	117	6,4
<i>Pseudomonas</i>	141	3,1
	191	5,6
	192	7,1
	194	7,4
	195	7,0
	201	6,9
	203	6,3
<hr/>		