



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL

PRISCILA PEREIRA BAHIA

**ESTUDO DE CARACTERÍSTICAS DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO
VEGETAL DE RIZÓBIOS DA COLEÇÃO DE CULTURAS DE BACTÉRIAS
DIAZOTRÓFICAS DA EMBRAPA AGROBIOLOGIA**

Dra. MARCIA REED RODRIGUES COELHO
Orientadora

SEROPÉDICA,
2014



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL

PRISCILA PEREIRA BAHIA

**ESTUDO DE CARACTERÍSTICAS DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO
VEGETAL DE RIZÓBIOS DA COLEÇÃO DE CULTURAS DE BACTÉRIAS
DIAZOTRÓFICAS DA EMBRAPA AGROBIOLOGIA**

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia Florestal, como requisito parcial para a obtenção do Título de Engenheiro Florestal, Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Dra. MARCIA REED RODRIGUES COELHO

Orientadora

SEROPÉDICA,

2014

**ESTUDO DE CARACTERÍSTICAS DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO
VEGETAL DE RIZÓBIOS DA COLEÇÃO DE CULTURAS DE BACTÉRIAS
DIAZOTRÓFICAS DA EMBRAPA AGROBIOLOGIA**

Monografia aprovada em 06 de novembro de 2014.

Banca Examinadora:

Dra. Marcia Reed Rodrigues Coelho
EMBRAPA AGROBIOLOGIA
Orientadora

Dr. Ederson da Conceição Jesus
EMBRAPA AGROBIOLOGIA
Membro

Prof. Dra. Silvia Regina Góí
UFRRJ/DCA
Membro

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Dirceu e Shirlei e aos meus pais de consideração José e Júlia pelo apoio e amor sem medida.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar meus caminhos e estar comigo em todos os momentos.

Aos meus pais Dirceu e Shirlei e aos meus pais de consideração José e Júlia por todo o apoio e esforços para me ajudar, apoiar e incentivar nesse sonho realizado. Obrigada por tudo!

À minha irmã Louise, meu cunhado Maurício e minha linda e amada sobrinha Isabelle por todo carinho que sempre tiveram comigo.

Ao Thiago por todo amor e carinho, bons conselhos e me fazer sempre seguir em frente.

A todos os familiares que acreditaram em mim e me ajudaram no que foi preciso.

À Dr^a Marcia Reed pela orientação, paciência e dedicação.

À Liliandra pela grande amizade nesses cinco anos de faculdade, pelas conversas intermináveis sobre qualquer assunto e, principalmente, pela companhia e por estar ao meu lado em todos os momentos.

À Tatiana pelos momentos de descontração, risos e principalmente pela amizade que construímos.

À amiga Fabiana pela companhia, conversas e ajuda no estágio na Embrapa Agrobiologia.

Às analistas da Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia, Natália e Fernanda, pelos ensinamentos, ajuda e por toda simpatia.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela formação profissional e por todos os momentos nela vividos.

Aos amigos ruralinos que jamais serão esquecidos, em especial, Daiana, Gabriela, Isabel, Lorryne e Nicole.

À Embrapa Agrobiologia pelo excelente suporte para a realização deste trabalho.

À FAPERJ pela bolsa de iniciação científica concedida.

A todos que de alguma forma contribuíram para minha formação e para a realização desse trabalho.

RESUMO

A Embrapa Agrobiologia, uma das instituições pioneiras nos estudos de fixação biológica de nitrogênio, tem hoje uma das mais reconhecidas coleções de bactérias de importância agrícola do Brasil, a Coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas e Outros Microorganismos Multifuncionais (CCBD). A CCBD possui mais de 3200 isolados de bactérias nodulíferas e associativas, entretanto, devido a terem sido depositadas há várias décadas, onde as metodologias de caracterização ainda eram limitadas, não se tem conhecimento de parte desses isolados em termos de biodiversidade, principalmente quanto ao seu potencial de promoção de crescimento além da fixação biológica de nitrogênio. O presente trabalho teve como objetivo contribuir com a modernização da CCBD através do estudo de estirpes de rizóbio em relação a características de promoção de crescimento vegetal como a capacidade de solubilização de fosfato, a produção de compostos indólicos, sideróforos e celulase. Foram avaliadas qualitativamente 112 estirpes de rizóbios, sendo: 50 isoladas de feijão caupi (*Vigna unguiculata*), 43 de leguminosas arbóreas e 19 de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*). Os isolados de feijão caupi demonstraram dominância em resultados negativos para os mecanismos de promoção de crescimento vegetal avaliados, em contrapartida, a maioria dos isolados de leguminosas arbóreas mostraram capacidade de solubilizar fosfato e produzir sideróforos, com destaque para as estirpes do gênero *Burkholderia* isoladas da subfamília Mimosoideae. A maioria dos isolados de feijão comum foi capaz de produzir compostos indólicos. A capacidade de produção de celulase não foi expressiva para nenhum grupo de isolados.

Palavras-chave: Coleção de culturas, promoção de crescimento vegetal, rizóbio.

ABSTRACT

Embrapa Agrobiologia is one of the pioneering institutions on biological nitrogen fixation studies. Currently, Embrapa has one of the most important collections of bacteria from Brazilian agriculture, the Bacteria Culture Collection and Other diazotrophic Multifunction Microorganisms (CCBD). The CCBD has there about 8000 cultures of rhizobia and associative bacteria, however, because of being deposited over several decades, where the methods of characterization were limited, there is no knowledge of some of these isolates about biodiversity, especially regarding their potential promoting growth beyond biological nitrogen fixation. The present study aimed to contribute to the modernization of CCBD by studying strains of rhizobia in relation to characteristics of plant growth promotion ability as phosphate solubilization, production of indole compounds, siderophores and cellulase. Qualitatively 112 strains of rhizobia were evaluated, as follows: 50 isolated from cowpea (*Vigna unguiculata*), 43 legume and 19 common bean (*Phaseolus vulgaris*). Isolates of cowpea did not show a tendency to perform any of the mechanisms of plant growth promotion evaluated, in contrast, most of isolates from leguminous trees showed the ability to solubilize phosphate and produce siderophores, especially for strains isolated from the genus *Burkholderia* subfamily *Mimosoideae*. Most of isolates of the common beans were capable to produce indole compounds. The ability of cellulase production was not significant for any group of isolates.

Keywords: Collection of crops, plant growth promotion, rhizobia.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Coleções de Culturas	3
2.2. Rizobactérias Promotoras de Crescimento em Plantas (RPCP)	6
2.2.1 Solubilização de Fosfato	8
2.2.2 Produção de Compostos Indólicos (AIA)	9
2.2.3 Produção de Sideróforos	9
2.2.4 Produção de Celulase	10
2.3 Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN)	11
2.3.1 Rizóbios	11
2.4 Inoculantes	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Caracterização Funcional	15
3.1.1 Solubilização de fosfato de cálcio	15
3.1.2 Produção de compostos indólicos	16
3.1.3 Produção de Sideróforos	16
3.1.4 Produção de Celulase	17
4. RESULTADOS	18
4.1 <i>Phaseolus vulgaris</i>	18
4.2 Leguminosas arbóreas	21
4.3 <i>Vigna unguiculata</i>	28
5. DISCUSSÃO	32
6. CONCLUSÕES	34
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Resultados dos testes de solubilização de fosfato, produção de compostos indólicos, produção de sideróforos e produção de celulase aplicados em isolados obtidos de <i>Phaseolus vulgaris</i>	19
Tabela 2 Resultados de testes de solubilização de fosfato, produção de compostos indólicos, produção de sideróforos e produção de celulase aplicados em isolados de leguminosas arbóreas.....	22
Tabela 3 Resultados de testes de solubilização de fosfato, produção de compostos indólicos, produção de sideróforos e produção de celulase aplicados em isolados de <i>Vigna unguiculata</i>	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Meio de cultura NBRIP com crescimento bacteriano (A) BR4814 (<i>Burkholderia sabiae</i>) positiva para solubilização de fosfato; (B) BR3300 (<i>Bradyrhizobium iriomotense</i>) negativa para solubilização de fosfato.	15
Figura 2 Placa utilizada na análise de compostos indólicos, onde a coloração rosa expressa resultado positivo.	16
Figura 3 Meio 79 adicionado de solução de cromoazurol com crescimento bacteriano (A) BR 940 (<i>Rhizobium leucaenae</i>) positiva para produção de sideróforos; (B) BR 3303 (<i>Bradyrhizobium rifense</i>) negativa para produção de sideróforos.	17
Figura 4 Meio ágar-carboximetilcelulose com crescimento bacteriano . (A) BR 3461 (<i>Burkholderia oxyphila</i>) positiva para produção de celulase; (B) BR 3361 (<i>Bradyrhizobium rifense</i>) negativa para produção de celulase.	18
Figura 5 Resultados dos testes aplicados em estirpes isoladas de <i>Phaseolus vulgaris</i> . 20	
Figura 6 Resultados dos testes aplicados em estirpes do gênero <i>Ensifer</i> isoladas de <i>Phaseolus vulgaris</i>	20
Figura 7 Resultados dos testes aplicados em estirpes do gênero <i>Rhizobium</i> isoladas de <i>Phaseolus vulgaris</i>	21
Figura 8 Resultados dos testes aplicados em estirpes isoladas de leguminosas arbóreas.	25
Figura 9 Resultados dos testes aplicados em estirpes isoladas de leguminosas arbóreas, subfamília Papilionoideae.	26
Figura 10 Resultados dos testes aplicados em estirpes isoladas de leguminosas arbóreas, subfamília Mimosoideae.	27
Figura 11 Resultados dos testes aplicados em estirpes do gênero <i>Bradyrhizobium</i> isoladas de leguminosas arbóreas da subfamília Mimosoideae.	27
Figura 12 Resultados dos testes aplicados em estirpes do gênero <i>Burkholderia</i> isoladas de leguminosas arbóreas da subfamília Mimosoideae.	28
Figura 13 Resultados dos testes aplicados em estirpes isoladas de <i>Vigna unguiculata</i> . 31	
Figura 14 Resultados dos testes aplicados em estirpes do gênero <i>Bradyrhizobium</i> isoladas de <i>Vigna unguiculata</i>	32

1. INTRODUÇÃO

As rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP) são um grupo de micro-organismos capazes de colonizar a rizosfera, superfície das raízes e tecidos internos das plantas, e que desempenham mecanismos que beneficiam direta ou indiretamente os vegetais. Como forma direta de promoção de crescimento de plantas podemos citar a fixação biológica de nitrogênio atmosférico, a solubilização de fosfato, a mineralização de nutrientes, a produção de fitormônios, e de forma indireta, indução de resistência e a produção de sideróforos e antibióticos. Segundo Mariano (2004) os principais gêneros de bactérias promotoras de crescimento de plantas empregados na agricultura são: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Acetobacter*, *Herbaspirillum*, *Agrobacterium radiobacter* e *Enterobacter cloacae*, entre outras.

Dentre estas bactérias mais usadas, os rizóbios merecem destaque. São um grupo de bactérias gram-negativas, capazes de estabelecer relação simbiótica com plantas da família Fabaceae, popularmente conhecidas como leguminosas, formando nódulos em suas raízes onde realizam a fixação biológica de nitrogênio (FBN). Em troca, a planta hospedeira fornece-lhes carboidratos e proteção física. A FBN se caracteriza pelas reações químicas que transformam o N₂, que constitui 78% dos gases da atmosfera, em compostos nitrogenados assimiláveis pelas plantas (FERREIRA, 2007). Atualmente os rizóbios compreendem 132 espécies de bactérias pertencentes às classes α -Proteobacteria e β -Proteobacteria, e onde os gêneros *Rhizobium*, *Ensifer* (= *Sinorhizobium*), *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* abrigam cerca de 80% das espécies. Mais recentemente, espécies dos gêneros *Burkholderia* e *Cupriavidus* foram descritas como nodulantes e hoje se sabe que algumas destas são simbioses comuns de espécies arbóreas como, por exemplo, as da subfamília Mimosoideae em solos tropicais brasileiros (BONTEMPS et al., 2010).

O estudo da interação rizóbio – planta possibilitou o desenvolvimento de inoculantes para espécies de leguminosas. Os inoculantes são produtos que contêm micro-organismos benéficos à planta. No Brasil, a produção de inoculantes iniciou-se na década de 1950 (FREIRE, 1968) e, atualmente estes são comercializados em forma turfosa ou líquida.

A preservação de recursos genéticos de micro-organismos é de fundamental importância, pois oferece suporte para o desenvolvimento de pesquisas e tecnologias. Coleções de culturas são centros de conservação que tem a função de coletar e manter organismos relevantes para estudos científicos e aplicações tecnológicas, tornando-os disponíveis para usuários interessados. A maneira mais eficiente de conservar micro-organismos de importância econômica é a preservação em coleções. A preservação e manutenção das culturas devem ser feitas de forma a garantir sua sobrevivência, estabilidade e pureza durante períodos prolongados de tempo, conservando características genéticas e propriedades morfo/fisiológicas (ABREU e TUTUNJI, 2004).

A Coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas e Outros Microorganismos Multifuncionais da Embrapa Agrobiologia (CCBD), criada na década de 60, é referência nacional em coleções. Atualmente, possui cerca de 3200 estirpes depositadas, sendo grande parte destas, bactérias diazotróficas. A coleção conta tanto com estirpes do grupo rizóbio, formadoras de nódulos em leguminosas, quanto com associativas em espécies não leguminosas, como milho, cana-de-açúcar, capim-elefante, arroz, entre outras. Apesar de seu numeroso acervo de isolados, muitos destes foram selecionados, caracterizados morfofisiologicamente e depositados na coleção há várias décadas e não possuem estudos comprovando seu potencial de uso na agricultura.

Com o avanço do conhecimento dos mecanismos de promoção de crescimento vegetal por bactérias, as ferramentas de caracterização de micro-organismos evoluíram substancialmente (MARON et al., 2011). Assim, faz-se necessário um estudo da biodiversidade da Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia acerca de seu potencial de uso para a prospecção de estirpes para inoculantes e suporte a pesquisas agrotecnológicas. Diante disto, e em posse de ferramentas de caracterização, o presente trabalho teve como objetivo avaliar características de promoção de crescimento vegetal em rizóbios depositados na Coleção e isolados de culturas de importância econômica como: leguminosas arbóreas e arbustivas, feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) e feijão caupi (*Vigna unguiculata*). Foram avaliadas qualitativamente características de solubilização de fosfato de cálcio, produção de compostos indólicos, produção de sideróforos e produção de celulase.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Coleções de Culturas

A existência e a diversidade de seres vivos no planeta estão intimamente ligadas à diversidade e à atividade metabólica de micro-organismos na natureza. Os micro-organismos participam de processos ecológicos importantes, tais como fotossíntese e geração de oxigênio, ciclagem de matéria orgânica, ciclos biogeoquímicos (carbono, nitrogênio) e manutenção da fertilidade e da estrutura de solos. O número de espécies de micro-organismos conhecidos (diversidade de espécies), representado pelos organismos cultivados descritos na literatura, representa apenas uma pequena fração da diversidade microbiana encontrada na natureza (entre <0.1 a 1%, dependendo do habitat) (MANFIO, 2003).

Micro-organismos e material biológico têm sido historicamente preservados e distribuídos por coleções de culturas. Os diferentes tipos de coleções, sejam elas de trabalho, institucionais ou de serviço, têm uma importância destacada na conservação e exploração da diversidade genética e metabólica de micro-organismos, com a finalidade de pesquisa e desenvolvimento (CANHOS, 2003). Essas coleções biológicas adquiriram crescente importância na atuação do Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT), pois sendo centros depositários de material biológico, as coleções abrigam não só os espécimes coletados e estudados, mas também as informações associadas aos indivíduos e às populações de cada espécie (MANFIO, 2003).

As coleções utilizam métodos de conservação que asseguram a viabilidade dos micro-organismos a curto, médio e longo prazo, preservando suas características originais. Considerando que taxas de mutações espontâneas entre bactérias são sempre elevadas, o uso de qualquer método que permita a multiplicação do micro-organismo, invariavelmente, envolve o risco de que ocorram mutações e alterações na sua estabilidade genética (ROMEIRO, 1996; ABREU e TUTUNJI, 2004).

A primeira coleção de serviço que se tem registro é a Coleção Kral, estabelecida em Praga em 1890, com a finalidade de fornecer culturas puras para estudos comparativos e identificação de bactérias patogênicas. No início do século 20, outras coleções de serviço foram estabelecidas na Europa, Estados Unidos e Japão, com a finalidade básica de conservar e fornecer material de referência para estudos taxonômicos (CANHOS, 2003). Existem cerca de 647 coleções de culturas de microrganismos e células registradas no Centro Internacional de Dados da Federação

Mundial de Coleções de Culturas, sendo 65 destas pertencentes ao Brasil (WFCC, 2014).

Um ponto crítico citado como limitante ao desenvolvimento da microbiologia ambiental no Brasil refere-se à falta de apoio às coleções de referência de micro-organismos no país. Coleções científicas importantes, incluindo acervos de microalgas, protozoários, bactérias, fungos filamentosos, leveduras e linhagens celulares, são predominantemente localizadas nas regiões Sudeste e Sul, em centros de pesquisa e universidades, sendo que, regiões consideradas ricas em diversidade como Norte (Amazônia) e Centro-Oeste (Cerrado/Pantanal), apresentam um número pequeno de coleções (MANFIO, 2003).

No setor da agricultura, o conhecimento sobre a diversidade de organismos diretamente relacionados à fertilização biológica de solos encontra-se em estágio avançado em decorrência dos esforços da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). A Coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas e Outros Microorganismos Funcionais da Embrapa Agrobiologia possui um acervo valioso que inclui linhagens relevantes para a elucidação dos mecanismos de fixação biológica de nitrogênio e suas aplicações tecnológicas (CANHOS, 2003).

A CCBD possui cerca de 3200 isolados depositados, contemplando bactérias endofíticas e associativas de variados gêneros e espécies e isoladas de diversas culturas de interesse econômico, e agora tornar-se-á integrante do Centro de Recursos Biológicos (CRB) e do Sistema de Informações de Coleções de Interesse Biotecnológico (SICol).

Em 1991, no workshop da OECD (“Organisation for Economic Cooperation and Development”), cujo tema central foi “Science & Technology Infrastructure: Support for Biological Resource Centres” definiu-se Centros de Recursos Biológicos (CRBs) como coleções que contêm organismos “cultiváveis” (micro-organismos, tecidos de plantas e animais e células humanas), partes replicáveis destes (genomas, plasmídeos, vírus e DNAs), organismos viáveis mas não “cultiváveis”, células e tecidos, assim como material e bases de dados contendo informação molecular, fisiológica e estrutural (SICol, 2014).

O Sistema de Informação de Coleções de Interesse Biotecnológico, SICol, é fruto do Programa de Biotecnologia e Recursos Genéticos do Ministério da Ciência e Tecnologia e tem por objetivo, além de disseminar informações sobre os Centros de Recursos Biológicos do Brasil, servir de elemento integrador às diversas e diferenciadas

coleções de interesse biotecnológico, econômico e de aplicações industriais (SICol, 2014).

A CCBD foi criada em meados dos anos 60 em vista das diversas pesquisas realizadas pela Embrapa Agrobiologia com enfoque na fixação biológica de nitrogênio (FBN), visando a produção de inoculantes para a agricultura e, em algumas situações, o aprofundamento de estudo de biodiversidade, que contribuiu com a descrição de pelo menos 10 novas espécies associadas às gramíneas como, por exemplo, a *Beijerinckia fluminensis*, *Azospirillum brasilense*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Burkholderia tropica* (BALDANI e BALDANI, 2005) e algumas bactérias nodulíferas de leguminosas de grãos e arbóreas tais como *Rhizobium tropici* (MARTINEZ-ROMERO et al., 1991), *Burkholderia sabiae* e *Burkholderia nodosa* (CHEN et al., 2007; CHEN et al., 2008). Devido às limitações tecnológicas de caracterização da época, as bactérias isoladas eram classificadas morfológicamente, considerando-se características como meio de cultura no qual se desenvolviam, tempo de crescimento, morfologia colonial, entre outras. Pela Coleção tornar-se parte do Centro de Recursos Biológicos e pelas limitações sofridas na caracterização de seus isolados, a Embrapa Agrobiologia iniciou projeto de modernização da CCBD a fim de aumentar o conhecimento da biodiversidade do que está sendo preservado e seu potencial biotecnológico. Suas bactérias, identificadas com o prefixo BR, estão sendo caracterizadas molecularmente através do seqüenciamento do gene que codifica a molécula de 16S rRNA afim de se obter uma classificação taxonômica mínima de seus acessos.

Em relação à preservação, a manutenção dos depósitos da CCBD se dá por meio da preservação em óleo mineral, criopreservação em freezer e liofilização. A preservação em óleo mineral é uma técnica de duração a médio prazo. Consiste no recobrimento de uma cultura jovem de micro-organismo com óleo mineral esterilizado. Este método limita a quantidade de oxigênio disponível, devido ao óleo permitir uma lenta difusão de gases. Assim, há uma redução do metabolismo do micro-organismo e, conseqüentemente, redução de sua taxa de multiplicação.

A criopreservação e a liofilização são as técnicas mais largamente empregadas na conservação da biodiversidade microbiana. Essa é uma das chaves para a realização dos serviços de coleção de culturas microbiológicas (DAY e MCLELLAN, 1995; MYAMOTO-SHINOHARA et al., 2000; PAOLI, 2005; SOLA 2011).

A criopreservação é uma técnica de preservação a longo prazo. Estima-se um tempo de preservação de 20 a 30 anos. Essa técnica consiste na manutenção de uma

variedade de tipos celulares sob baixas temperaturas, tendo como objetivo maior minimizar o dano a materiais biológicos, incluindo tecidos, células animais e vegetais, bactérias, fungos e vírus durante o processo de congelamento e estocagem a frio (WOLFE e BRYANT, 2001; SOLA 2011). Este método compreende a manutenção de materiais a baixas temperaturas (-20°C a -80°C em freezers) e ultra baixas temperaturas (-150°C a -196 °C em containeres de nitrogênio líquido). No que tange a conservação dos microrganismos, a estocagem a baixas temperaturas, apesar de eficiente, pode comprometer a qualidade das amostras armazenadas, visto a possibilidade de variações de temperatura em freezers. Já os sistemas de nitrogênio líquido garantem o armazenamento a temperaturas constantes e por longos períodos (SU et al., 1996; WOLFE e BRYANT, 2001; PAOLI, 2005; SOLA, 2011).

Igualmente à criopreservação, a liofilização é uma técnica de preservação a longo prazo. Basicamente, a liofilização pode ser definida como um processo de desidratação sob condições de vácuo, constituído por três etapas: congelamento, desidratação primária e desidratação secundária. O congelamento promove a inércia do material a ser liofilizado, gerando uma interrupção das reações químicas e das atividades biológicas, sendo considerada uma das etapas mais críticas do processo. Após esta etapa, o espécime ou material é desidratado por sublimação, seguindo-se o emprego de temperaturas de secagem sob pressões reduzidas (PAOLI, 2005; COSTA et al., 2009; SOLA, 2011).

2.2. Rizobactérias Promotoras de Crescimento em Plantas (RPCP)

No solo existe um grande número de bactérias que se localizam na rizosfera, e aproximadamente cerca de 7 a 15% da superfície total das raízes é ocupada por estas células microbianas (GRAY e SMITH, 2005; LEMOS, 2009). Estudos já comprovaram a existência de diversos grupos de micro-organismos importantes para o desenvolvimento vegetal em sua rizosfera, região localizada próxima às raízes. Dentre estes micro-organismos estão as rizobactérias que são capazes de colonizar as raízes, estimulando-as diretamente ou beneficiando o crescimento e o desenvolvimento de diversas plantas. Essas bactérias são chamadas de “Rizobactérias Promotoras do crescimento de Plantas” (PGPR) (BISWAS et al., 2000; GYANESHWAR et al., 2001; GRAY e SMITH, 2005; BARRIUSO et al., 2005; KOKALIS-BURELLE et al., 2006; LEMOS, 2009) ou rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (RPCP).

A maioria das RPCPs estudadas na literatura são Gram-negativas, e o seu principal efeito sobre as plantas é o fornecimento de fitohormônios como auxinas, várias giberelinas e citocininas (EL-KHAWAS e ADACHI, 1999; DA SILVEIRA, 2008). A presença desses compostos auxilia o crescimento da raiz e da parte aérea do vegetal aumentando a captação de nutrientes pela planta (ANTOUN et al., 1998, ASGHAR et al., 2002; DA SILVEIRA, 2008). Além disso, estas bactérias também contribuem indiretamente para o desenvolvimento da plantas através da produção de diversos antibióticos ou outros mecanismos de biocontrole, os quais inibem o crescimento de diversos micro-organismos considerados fitopatogênicos (DASHTI et al., 1998, GRAY e SMITH, 2005; DA SILVEIRA, 2008).

GRAY e SMITH (2005) propuseram dois novos conceitos para se classificar ou dividir as bactérias RPCPs:

(1) **iRPCPs** – são bactérias que residem dentro das células das plantas, induzindo a formação de nódulos, estruturas especializadas em fixação de nitrogênio em leguminosas. Atualmente, as bactérias pertencentes ao gênero *Rhizobium* são as mais estudadas deste grupo, mas existem outros gêneros bacterianos de solos que pertencem a essa categoria como: *Bradyrhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium* e *Allorhizobium*.

(2) **eRPCPs** – bactérias que se desenvolvem extracelularmente nos tecidos das raízes de diversas plantas, não produzindo nódulos, mas com capacidade de promover o crescimento vegetal através da produção de sinais ou substâncias específicas. Nesta categoria podem ser incluídas bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Serratia*.

Além destas, existem bactérias que podem ser classificados tanto como iRPCPs ou eRPCPs, como as pertencentes ao gênero *Burkholderia* (GRAY e SMITH, 2005; DA SILVEIRA, 2008).

A maior parte dos estudos com bactérias promotoras de crescimento vegetal está relacionada com espécies de interesse agrícola como o feijão caupi (*Vigna unguiculata* L.), o feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), a soja (*Glycine max* L.) dentre outras, sendo poucos os estudos envolvendo leguminosas florestais (LUCY et al., 2004). Estudos com espécies arbóreas podem beneficiar o setor comercial dessas espécies e também o reflorestamento de ambientes degradados, em diversas regiões (LUCY et al., 2004; SANTOS, 2013). Os benefícios da utilização de bactérias promotoras de crescimento vegetal em espécies florestais são significativos, aumentando a sobrevivência das plantas e potencializando o crescimento e também o controle de doenças (ENEBAK et al., 1998).

2.2.1 Solubilização de Fosfato

O fósforo (P) é o segundo elemento essencial mais requerido pelas plantas, ficando atrás apenas do nitrogênio. O fósforo é importante para a planta, pois é o principal componente de combinações vitais como a lecitina, nucleotídeos, entre outras, estando relacionado aos fenômenos de armazenamento e transferência de energia na planta, sob a forma de ATP (FORNASIERI FILHO, 1992).

A reduzida disponibilidade de fósforo nos solos tropicais decorre da reatividade das formas solúveis de P com cálcio (Ca), ferro (Fe), magnésio (Mg) e alumínio (Al), formando compostos de baixa solubilidade. Nos solos ácidos, os fosfatos são os formados predominantes pela associação de P com Fe e/ou Al, enquanto que nos solos com pH mais elevado predominam as formas associadas ao Ca (BARROSO e NAHAS, 2005; CHAGAS JUNIOR, 2010).

Os microrganismos solubilizadores de fosfato inorgânico (MSFI) constituem cerca de 5 a 10% da microbiota total dos solos e a diversidade e as populações dos MSFI são consideravelmente superiores na rizosfera (NAHAS et al., 1994; NAUTIYAL, 1999). As associações com micro-organismos solubilizadores de P estão entre os fatores que influenciam no potencial das espécies ou cultivares em absorver P do solo (SIQUEIRA et al., 2004; SOUSA, 2010). Diversos micro-organismos do solo, incluindo bactérias e fungos possuem a capacidade de solubilizar fosfatos por meio de diferentes mecanismos, especialmente pela produção de ácidos orgânicos (SOUCHIE *et al.*, 2005; 2006; BARROSO e NAHAS, 2008). O ácido orgânico identificado em estirpes com habilidade de solubilização de fosfato foi o ácido 2-cetoglucônico, produzido por em *Rhizobium leguminosarum* e *Rhizobium meliloti* (IGUAL et al., 2001; CHAGAS JUNIOR, 2010).

Estudos com diferentes espécies bacterianas, quanto a sua capacidade de solubilização, mostram que espécies de *Rhizobium*, *Pseudomonas* e *Bacillus* apresentam o maior potencial de solubilização (RODRÍGUEZ et al., 1999; SANTOS, 2013). Segundo dados encontrados na literatura, estes micro-organismos solubilizam o fosfato inorgânico por dois mecanismos principais: pela produção de ácidos orgânicos ou pela secreção de prótons H⁺ (ILLMER et al., 1995).

A inoculação de micro-organismos solubilizadores de fosfatos no solo tem sido sugerida como alternativa para se substituir ou se diminuir o uso de fertilizantes fosfatados solúveis, mediante melhor aproveitamento do nutriente (IGUAL et al., 2001; VESSEY, 2003; CHAGAS JUNIOR, 2010).

2.2.2 Produção de Compostos Indólicos (AIA)

O termo auxina foi criado pelos cientistas que examinavam substâncias de crescimento da planta na urina humana nomeado de auxinas A e B (KÖGL e SMIT, 1931; MARCHIMORO, 2006). Um composto estrutural distinto com atividade de auxina isolado de fungos foi chamado de heteroauxina; as auxinas A e B foram descartadas gradualmente para heteroauxina bioativa, que foi determinada mais tarde como ácido 3-indol acético (AIA) (THIMANN, 1977; MARCHIMORO, 2006).

As rizobactérias fitoestimuladoras do crescimento de plantas atuam de forma direta, por meio da produção de fitormônios, como auxinas, citocininas, giberelinas e etileno (DOBBELAERE et al., 2003; BRUNETTA, 2006).

O ácido 3-indol acético, pertencente à classe das auxinas, que promove o crescimento por meio da estimulação da mitose, conseqüentemente com relativo aumento no número de células ou a alongação das células já existentes. Estima-se que, aproximadamente, 80% das rizobactérias possam produzir esse regulador de crescimento (PATTEN et al., 1996).

Apesar das auxinas serem biossintetizadas por vias bioquímicas variadas, a maioria das espécies bacterianas que sintetizam o AIA utilizam, preferencialmente, o aminoácido L-triptofano como precursor desse fitohormônio (PATTEN et al., 1996; ROSENBLUETH et al., 2006).

2.2.3 Produção de Sideróforos

O ferro é um importante constituinte ou ativador de enzimas e possui também função estrutural, além de participar de importantes processos, entre os quais estão a fotossíntese, respiração, fixação biológica de nitrogênio, assimilação de nitrogênio e enxofre, síntese de lignina e suberina e metabolismo de auxina (MALAVOLTA, 2006). Muito abundante na crosta terrestre, o ferro nem sempre encontra-se numa forma disponível às plantas: em solos com valor de pH próximo ou acima de 6, encontra-se na forma oxidada (Fe^{3+}), que se precipita e não é absorvida pelos vegetais (FROEHLICH e FEHRX, 1981).

A produção de sideróforos (moléculas de baixo peso molecular que formam quelatos de ferro) está entre os mecanismos nos quais os micro-organismos da rizosfera inibem os patógenos de plantas. Essa inibição ocorre porque muitos organismos necessitam do ferro a uma concentração insuficiente. Assim, as rizobactérias desenvolveram sistemas altamente eficientes de resgate de ferro, através da produção e

secreção de sideróforos. Os quelatos de ferro são produzidos sob condições de biodisponibilidade limitada, sendo as moléculas de ferro complexadas atraídas por membranas protéicas receptoras específicas e transportadas para dentro da célula. Os sideróforos produzidos por *Pseudomonas* são altamente específicos e não são utilizados por outros micro-organismos (BUCHENAUER, 1998). Guerinot (1994) afirmou que para o grupo dos rizóbios, a capacidade de produzir sideróforos parece ser mais difundida entre o gênero *Rhizobium* do que no *Bradyrhizobium*, uma vez que esse gênero evoluiu em solos ácidos, onde o ferro está normalmente mais disponível. Os rizóbios podem utilizar sideróforos de outros rizóbios, chamado sinergismo interestirpe, desde que possuam proteínas receptoras da membrana externa específica para o sideróforo em questão.

2.2.4 Produção de Celulase

Celulases são enzimas pertencentes à classe de hidrolases que constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais a glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol (OLSSON e HAHNHAGERDAL, 1996; CASTRO e PEREIRA, 2010).

A classificação das celulases, de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico, as divide em três grandes grupos: a) Endoglucanases (EGases), que clivam ligações internas da fibra celulósica; b) Exoglucanases (ExGases), que atuam na região externa da celulose; e c) β - glicosidases (β Gases), que hidrolisam oligossacarídeos solúveis a glicose (LYND et al., 2002; FLORENCIO, 2011).

Os micro-organismos sintetizam inúmeros compostos de importância industrial, como vitaminas, antibióticos, ácidos orgânicos e enzimas. Dentre esses metabólitos, as enzimas têm sido utilizadas em diversos processos industriais, principalmente no processamento de produtos alimentícios e no tratamento de resíduos (SCHMIDELL et al., 2001).

O isolamento e a seleção de micro-organismos produtores de celulase são de imensa importância, tendo em vista a demanda por novas enzimas e seu uso em aplicações biotecnológicas (KASANA et al., 2008). Grande parte da produção industrial de celulases é realizada com o emprego de alguns fungos filamentosos, mas existem

alguns gêneros bacterianos como *Bacillus*, *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Alteromonas* reportados na literatura como produtores de celulase.

A produção de celulase além de ser vista como um mecanismo para auxiliar a colonização da planta hospedeira, foi reportada por El-Tarabily (2003) como forma de supressão de doenças através da degradação da parede celular do patógeno.

2.3 Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN)

O nitrogênio (N) é o elemento essencial mais requerido pelas plantas e se encontra em grande quantidade na atmosfera em forma de gás (N₂). Apesar de abundante, o nitrogênio do ar é quimicamente inerte e poucos são os organismos capazes de utilizá-lo.

A Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) é responsável por cerca de 139 toneladas de Nitrogênio fixado por ano, só nos ecossistemas terrestres, dando a esse processo enorme importância na manutenção da vida no planeta, situando-se o como o segundo processo biológico mais importante na terra, juntamente com a decomposição da matéria orgânica, estando atrás apenas da fotossíntese (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002; FERNANDES-JUNIOR, 2006).

Como alternativa ao uso de fertilizantes químicos, a fixação biológica do nitrogênio contribui com a preservação ambiental, eliminando o impacto negativo causado pelos produtos químicos (STRALIOTTO et al., 2002).

A capacidade diazotrófica está restrita a Bacteria e Archaea, incluindo cianobactérias e bactérias Gram positivas e Gram negativas (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Bactérias fixadoras de nitrogênio podem ser de vida livre, que fixam nitrogênio para o próprio uso, ou se associarem a vegetais. Dessas, algumas são capazes de estabelecer uma complexa relação simbiótica com a planta hospedeira e formar estruturas diferenciadas, denominadas nódulos, onde é realizada a fixação do nitrogênio (EVANS & BURRIS, 1992; KUKOLJ, 2009). Estes micro-organismos simbiontes são denominados genericamente como rizóbios.

2.3.1 Rizóbios

Os micro-organismos genericamente nomeados como rizóbios são bactérias Gram-negativas, aeróbicas não formadoras de esporos, pertencentes ao filo α -Proteobactéria e β -Proteobactéria, fixadoras de nitrogênio atmosférico (diazotróficas)

e que possuem a capacidade de associação simbiótica com plantas da família Fabaceae, também conhecidas como leguminosas, por meio da formação de nódulos em suas raízes e, excepcionalmente, no caule. Segundo Rothballeret al. (2009), os rizóbios podem promover o crescimento de outras espécies vegetais como milho, trigo e arroz.

Os rizóbios podem realizar promoção de crescimento vegetal por três mecanismos: biofertilização, fitoestimulação e controle biológico. A biofertilização consiste na atuação dos micro-organismos como fertilizantes e visa melhorar o estado nutricional da planta hospedeira (VESSEY et al., 2003). Segundo Muniz (2011) a fitoestimulação consiste na produção de substâncias que induzem ao crescimento vegetal na ausência de patógenos e o controle biológico na supressão de patógenos vegetais na presença dos rizóbios.

A formação dos nódulos em leguminosas, por bactérias, é estimulada por fatores de nodulação. Os genes *nod*, *nol* e *noe* codificam as proteínas que são responsáveis pela comunicação química entre a bactéria simbiote e a planta hospedeira durante o processo de nodulação (KRISHNAN *et al.*, 1995). Nos nódulos, após invasão pelo cordão de infecção, o rizóbio se diferencia em bacteróides e é envolto em uma membrana produzida pela planta, formando o simbiosoma. Após a formação do simbiosoma, o rizóbio fixa o nitrogênio que é fornecido à planta, recebendo, em troca, compostos ricos em carbono, aminoácidos e vitaminas (UDVARDI e POOLE, 2013).

De acordo com a descrição no Bergey's Manual (GARRITY e HOLT, 2001) citado por Campos (2008), a maioria dos rizóbios está assim classificada:

Domínio: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Classe: α -proteobacteria

Ordem: Rhizobiales

Família: Rhizobiaceae; Bartonellaceae; Brucellaceae; Phyllobacteriaceae; Methylocystaceae; Beijerinckiaceae; Bradyrhizobiaceae; Hyphomicrobiaceae; Methylobacteriaceae; Rhodobiaceae.

Gênero: *Rhizobium*; *Agrobacterium*; *Allorhizobium*; *Carbophilus*; *Chelatobacter*; *Ensifer*; *Bartonella*; *Brucella*; *Mycoplana*; *Ochrobactrum*; *Phyllobacterium*; *Aminobacter*; *Aquamicrobium*; *Delfuvibacter*; *Mesorhizobium*; *Pseudoaminobacter*; *Methylocystis*; *Albibacter*; *Methylosinus*; *Beijerinckia*; *Chelatococcus*; *Methylocella*; *Bradyrhizobium*; *Afipia*; *Agromonas*; *Blastobacter*; *Bosea*; *Nitrobacter*; *Oligotropha*; *Rhodoblastus*; *Rhodopseudomonas*;

Hyphomicrobium; Ancalomicrobium; Ancylobacter; Angulomicrobium; Aquabacter; Azorhizobium; Blastochloris; Devosia; Dichotomicrobium; Filomicrobium; Gemmiger; Labrys; Methylohabdus; Pedomicrobium; Posthecomicrobium; Rodomicrobium; Rhodoplanes; Seliberia; Starkeya; Xanthobacter; Methylobacterium; Rhodobium.

Recentemente estudos reportaram novos simbioses que não se inseriam na classe α -Proteobacteria e sim na β -Proteobacteria. Esses simbioses foram vulgarmente nomeados de β -rizóbios. Chen *et al.* (2001) isolaram o gênero *Cupriavidus* (*C. taiwanensis*) a partir de nódulos de *Mimosa* spp., Moulin *et al.* (2001) isolaram o gênero *Burkholderia*, enquanto Vandamme *et al.* (2002) reportaram o gênero *Burkholderia*, abrangendo quatro espécies (*B. tuberum*, *B. phymatum*, *B. caribensis*, *B. cepacia*) isoladas de cinco leguminosas tropicais.

2.4 Inoculantes

A inoculação de estirpes de rizóbio é uma tecnologia que permite alcançar elevadas produtividades com a diminuição ou a completa exclusão dos fertilizantes nitrogenados. Diversos estudos já comprovaram que a inoculação de estirpes selecionadas de rizóbio pode resultar em produtividades iguais ou superiores quando comparadas com a adição de fertilizantes nitrogenados (FERNANDES JÚNIOR, 2006). A adoção da prática de inoculação de rizóbio, em detrimento da utilização de fertilizantes nitrogenados, representa uma diminuição significativa nos custos de produção vegetal, uma vez que os fertilizantes nitrogenados são onerosos (DÖBEREINER, 1997).

De acordo com o protocolo da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbiológicos de Interesse Agrícola (RELARE), um inoculante é “todo produto que contenha micro-organismos com ação estimulante para o crescimento das plantas”. Os inoculantes comercializados no Brasil têm sua qualidade controlada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, que utiliza os parâmetros determinados pelo protocolo da RELARE (FERNANDES JÚNIOR, 2006).

Alguns gêneros bacterianos com o grande potencial para utilização como inoculantes para as culturas são *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Aereobacter* e *Flavobacteriu*. (RODRIGUES e FRAGA, 1999).

O Brasil, na 15ª Conferência das Partes (CPO 15), ocorrida em Copenhague, em 2009, assumiu o compromisso de reduzir suas emissões de gases de efeito estufa (GEE) até o ano de 2020. Em junho de 2010 foi estabelecido o “Plano Setorial para a Consolidação de uma Economia de Baixa Emissão de Carbono na Agricultura”, convencionalmente nomeado de Plano ABC (Agricultura de Baixa Emissão de Carbono), o qual prevê o incentivo de práticas de agricultura sustentável, entre estas a fixação biológica de nitrogênio e a recuperação de pastagens degradadas.

No mesmo ano, 2010, houve grandes discussões a cerca das futuras alterações no Código Florestal Brasileiro, Lei nº 4.471, alterações estas que, quando aprovadas, pressionariam a restauração e recuperação florestal de áreas de preservação permanente (APPs) e de reserva legal (RL). Neste cenário, a consolidação do Plano ABC no campo e a iminência de um novo Código Florestal Brasileiro, haveria grandes demandas de inoculantes contendo bactérias diazotróficas (fixadoras de nitrogênio), tecnologia de baixo custo e impacto quando comparada à adubação mineral.

A Instrução Normativa de nº 13, de 24 de março de 2011 do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2011) estabeleceu que em 2013 seriam retiradas da lista oficial de micro-organismos destinados à produção de inoculantes de interesse agrícola, diversas estirpes de rizóbios indicadas para a produção de inoculantes para 36 leguminosas, incluindo adubos verdes, forrageiras e arbóreas. A restrição se deu basicamente por não haver validação da eficiência agronômica dessas estirpes. Portanto, devem ser apresentados ao MAPA relatórios conclusivos baseados em pesquisas científicas que comprovem a eficiência agronômica dos rizóbios para que estes possam retornar à lista oficial de microorganismos destinados à produção de inoculantes e, assim, suprir a futura demanda pelo produto.

A Embrapa Agrobiologia juntamente com outras unidades da Embrapa e instituições de pesquisa, está inserida na realização de pesquisas que visam comprovar a eficiência agronômicas das estirpes de rizóbios retiradas da lista oficial, assim como na recomendação de novas estirpes para a produção inoculantes.

Para a validação de uma estirpe, devem ser realizadas ao menos quatro fases de avaliação, são elas: I) testes em tubos, II) testes em vasos com substrato estéril, III) testes em condições controladas em vasos com solo estéril e IV) teste em campo ou produção de mudas de acordo com a finalidade do inoculante.

3. MATERIAL E MÉTODOS

As análises foram realizadas no laboratório da Coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas da Embrapa Agrobiologia (CCBD), município de Seropédica, RJ. Foram avaliadas 112 estirpes de rizóbios, sendo: 50 isoladas de feijão caupi (*Vigna unguiculata*), 43 de leguminosas arbóreas e 19 de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*). Todas as estirpes avaliadas encontravam-se depositadas na CCBD.

3.1 Caracterização Funcional

3.1.1 Solubilização de fosfato de cálcio

Avaliou-se a capacidade de solubilização de fosfato inorgânico de acordo com NAUTIYAL et al. (1999), utilizando o meio de cultura NBRIP sólido (*National Botanical Research Institute's Phosphate*) contendo 10 g de glicose; 5 g de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; 5 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,25 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,2 g de KCl; 0,1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 15 g de ágar em volume de 1 litro e pH 7,0. O método descreve o cultivo das estirpes por 24h, porém este tempo não foi suficiente para o cultivo das estirpes selecionadas e, portanto, estas foram cultivadas por 72h a 30°C em meio 79 líquido, pH 6,8. Após crescimento, através do método de plaqueamento em gota, 4 alíquotas de 20µL cada foram inoculadas na superfície de uma placa Petri contendo o meio NBRIP solidificado. As placas foram incubadas em estufa por 10 dias a 30°C. O surgimento de halo translúcido ao redor das colônias caracterizou a solubilização de fosfato pelo isolado. Para controle positivo, foi utilizada a estirpe BR 11281 (*Gluconacetobacter diazotrophicus*).

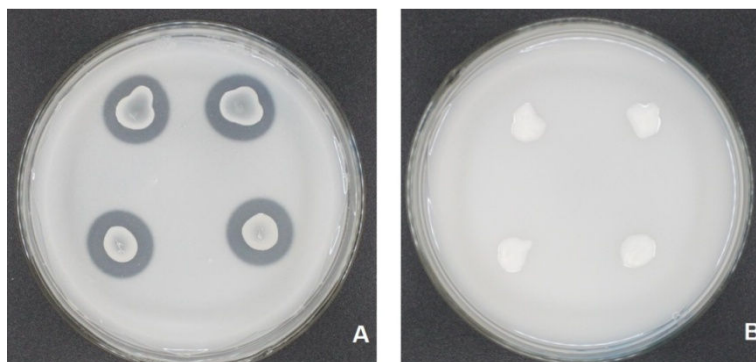


Figura 1 Meio de cultura NBRIP com crescimento bacteriano (A) BR4814 (*Burkholderia sabiae*) positiva para solubilização de fosfato; (B) BR3300 (*Bradyrhizobium iriomotense*) negativa para solubilização de fosfato.

3.1.2 Produção de compostos indólicos

Na avaliação de produção de compostos indólicos, utilizou-se o método da microplaca, descrito por SARWAR e KREMER (1995). As estirpes foram cultivadas em meio 79 líquido isento de indicador, suplementado com L-Triptofano ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), pH 6,8 e incubadas no escuro por 72 horas a 30°C . Em seguida, 1 mL do cultivo foi sedimentado em centrífuga a rotação de 1500 rpm por 5 minutos. Foram aplicados $150 \mu\text{L}$ do sobrenadante em microplaca de 96 poços juntamente com $100 \mu\text{L}$ do reagente de Salkowski (1 mL de 0,5 M FeCl_3 em 49 mL de ácido perclórico 35 %) previamente preparado. A placa permaneceu em repouso por 1 hora no escuro, devido aos reagentes serem fotossensíveis. O resultado positivo para a produção de compostos indólicos foi caracterizado pela coloração rosa das amostras. Para controle positivo, foi utilizada a estirpe BR 11281 (*Gluconacetobacter diazotrophicus*).

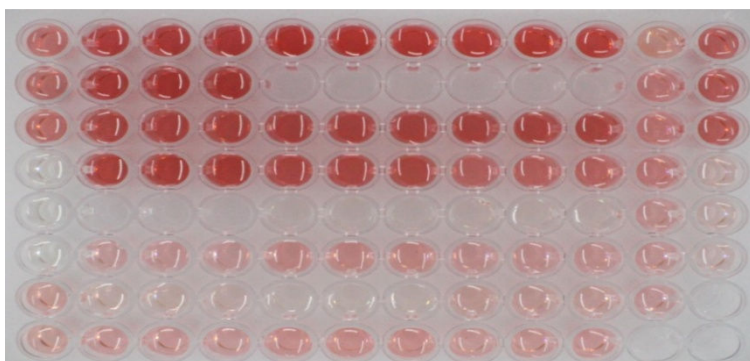


Figura 2 Placa utilizada na análise de compostos indólicos, onde a coloração rosa expressa resultado positivo.

3.1.3 Produção de Sideróforos

O teste de produção de sideróforos foi adaptado ao método de SCWYN e NEILANDS (1987). Para eliminar qualquer resquício de ferro proveniente da lavagem das vidrarias necessárias para a realização dos testes, estas foram imersas em solução de HCl a 10% por 24h e em seguida, lavadas com água deionizada. Os isolados foram cultivados em meio 79 líquido com baixas concentrações de ferro, isento de indicador e pH 6,8 por 72h a 30°C . Após crescimento, usando o método de plaqueamento em gota, 4 alíquotas de $20 \mu\text{L}$ cada foram inoculadas na superfície de placa de Petri plástica contendo o meio 79 solidificado, suplementado em 10% com solução de Cromoazurol S [5mL da solução de FeIII (1 mM de $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 10mM de HCl), 30,2 mg de Cromoazurol S, 36,5 mg de CTAB, 40 mL de água deionizada] e pH 6,8. As placas foram incubadas em estufa por 10 dias a 30°C . A formação de halo rosa ao redor das

colônias indicou a produção de sideróforos. Para controle positivo, utilizou-se a estirpe BR 11281 (*Gluconacetobacter diazotrophicus*).

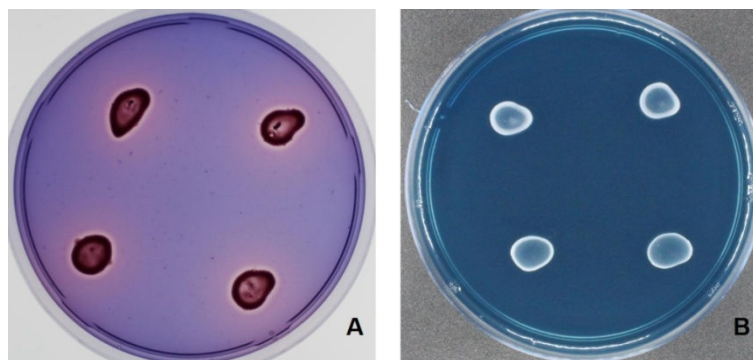


Figura 3 Meio 79 adicionado de solução de cromoazurol com crescimento bacteriano (A) BR 940 (*Rhizobium leucaenae*) positiva para produção de sideróforos; (B) BR 3303 (*Bradyrhizobium rifense*) negativa para produção de sideróforos.

3.1.4 Produção de Celulase

Para a avaliação de produção de celulase, de acordo com KASANA et al. (2008), as estipes foram cultivadas em meio de cultura 79 líquido, pH 6,8, por 72h a 30°C. Em seguida, através do método de plaqueamento em gotas, 4 alíquotas de 20µL cada foram inoculadas na superfície de placa Petri contendo meio Ágar-Carboximetilcelulose (1g de K₂HPO₄; 2g de (NH₄)₂SO₄; 0,5g MgSO₄.7H₂O; 0,5g de KCl; 0,2g de peptona; 17g de ágar; 2g de carboximetilcelulose; 1L de água destilada), pH 6,8, e incubadas por 7 dias em estufa a 30°C. Em seguida, as placas foram coradas com solução de Iodine de Gram (2g de KI; 1g de iodine; 300mL de água destilada) previamente preparada, por 5 minutos. O surgimento de halo amarelo ao redor das colônias indicou a produção de celulase pelos isolados. Como controle positivo, foi utilizada a estirpe BR 12332 (*Stenotrophomonas maltophilia*).

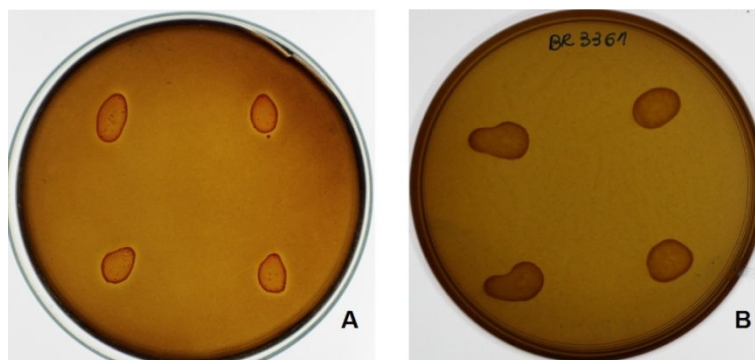


Figura 4 Meio ágar-carboximetilcelulose com crescimento bacteriano . (A) BR 3461 (*Burkholderia oxyphila*) positiva para produção de celulase; (B) BR 3361 (*Bradyrhizobium rifense*) negativa para produção de celulase.

4. RESULTADOS

Os testes de características de promoção de crescimento vegetal apresentaram resultados variados quando se compara o grupo dos hospedeiros dos quais as estirpes foram isoladas. Já quando se analisa os gêneros das bactérias presentes dentro do grupo de cada hospedeiro é possível observar uma tendência nos resultados. A seguir serão apresentados os resultados por grupo de hospedeiros.

4.1 *Phaseolus vulgaris*

Foram analisados 19 isolados a partir de *Phaseolus vulgaris* abrangendo os seguintes gêneros: 11 estirpes de *Ensifer* (= *Sinorhizobium*), 7 de *Rhizobium* e 1 de *Agrobacterium* (Tabela 1).

Tabela 1 Resultados dos testes de solubilização de fosfato, produção de compostos indólicos, produção de sideróforos e produção de celulase aplicados em isolados obtidos de *Phaseolus vulgaris*

Isolado	Taxonomia	Solub. Fosfato	Comp. Indólicos	Prod. Sideróforos	Prod. Celulase
BR 530	<i>Rhizobium phaseoli</i>	-	+	+	-
BR 531	<i>Sinorhizobium fredii</i>	-	+	-	-
BR 532	<i>Sinorhizobium fredii</i>	+	+	-	-
BR 868	<i>Sinorhizobium fredii</i>	-	+	-	-
BR 869	<i>Sinorhizobium fredii</i>	+	+	-	-
BR 920	<i>Rhizobium leucaenae</i>	-	+	+	-
BR 921	<i>Sinorhizobium fredii</i>	-	+	+	-
BR 922	<i>Sinorhizobium fredii</i>	-	-	-	-
BR 923	<i>Sinorhizobium fredii</i>	+	+	-	-
BR 924	<i>Sinorhizobium fredii</i>	-	+	-	-
BR 926	<i>Sinorhizobium fredii</i>	+	+	-	-
BR 927	<i>Rhizobium leucaenae</i>	-	+	+	-
BR 935	<i>Rhizobium leucaenae</i>	+	+	+	-
BR 939	<i>Rhizobium leucaenae</i>	-	+	+	+
BR 940	<i>Rhizobium leucaenae</i>	-	+	+	-
BR 941	<i>Rhizobium leucaenae</i>	-	+	+	-
BR 942	<i>Sinorhizobium fredii</i>	+	+	-	-
BR 943	<i>Sinorhizobium fredii</i>	-	+	-	-
BR 944	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	-	+	+	-

As abreviações significam: solub. fosfato: solubilização de fosfato; comp. indólicos: produção de compostos indólicos; prod. sideróforos: produção de sideróforos; prod. celulase: produção de celulase. (+) resultado positivo e (-) resultado negativo

Analisando os resultados gerais para esse hospedeiro (Figura 5), foi possível perceber que a maioria dos isolados apresentou resultado negativo para a solubilização de fosfato (6 positivos e 13 negativos) e que houve grande discrepância nos resultados para a produção de compostos indólicos (18 positivos e 1 negativo) e produção de celulase (1 positivos e 18 negativos). Em relação à produção de sideróforos, os resultados foram homogêneos (9 positivos e 10 negativos). Portanto, nota-se que a maioria dos isolados de feijão-comum são capazes de produzir compostos indólicos (94,7%), enquanto que 94,7% não são capazes de produzir celulase, o que já era esperado como resultado, visto que esta característica é pouco comum nas bactérias do grupo rizóbio. Portanto, com exceção a essa característica, apenas 1 isolado (BR 935) apresentou-se positivo para todos os demais testes (solubilização de fosfato de cálcio, produção de compostos indólicos e produção de sideróforos) e 12 isolados (63,2%)

apresentara-se positivos para 2 parâmetros avaliados, o que pode ser suficiente para ser promotora de crescimento e/ou garantir a competitividade.

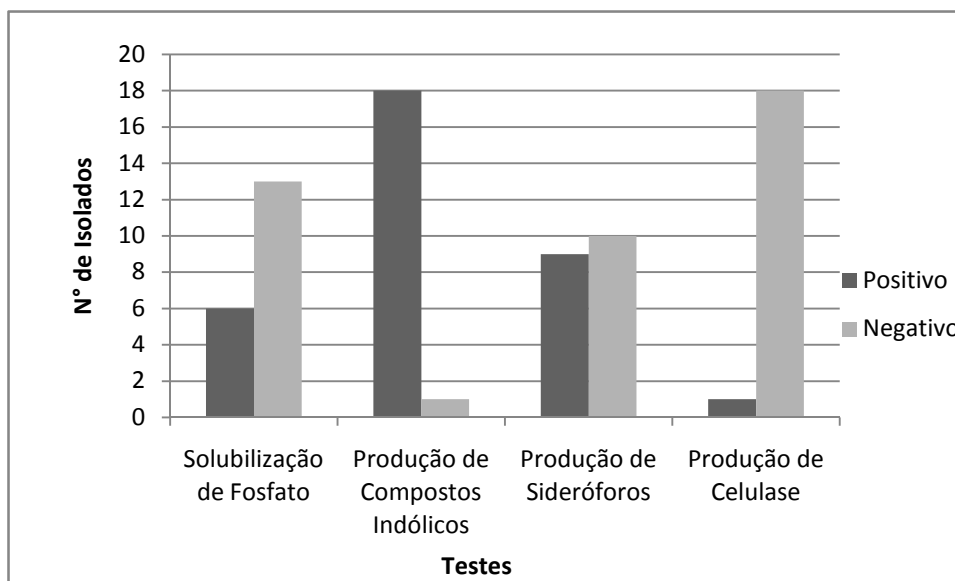


Figura 5 Resultados dos testes aplicados em estirpes isoladas de *Phaseolus vulgaris*.

Em relação aos gêneros bacterianos analisados, os 11 isolados do gênero *Ensifer* (= *Sinorhizobium*) (Figura 6) não apresentaram dominância nos resultados do teste de solubilização de fosfato de cálcio (5 positivos e 6 negativos). Em relação as outras análises, a maioria dos isolados apresentou resultado positivo para produção de compostos indólicos (10 positivos e 1 negativo), negativo para produção de sideróforos (1 positivo e 10 negativos) e negativo em sua totalidade para produção de celulase.

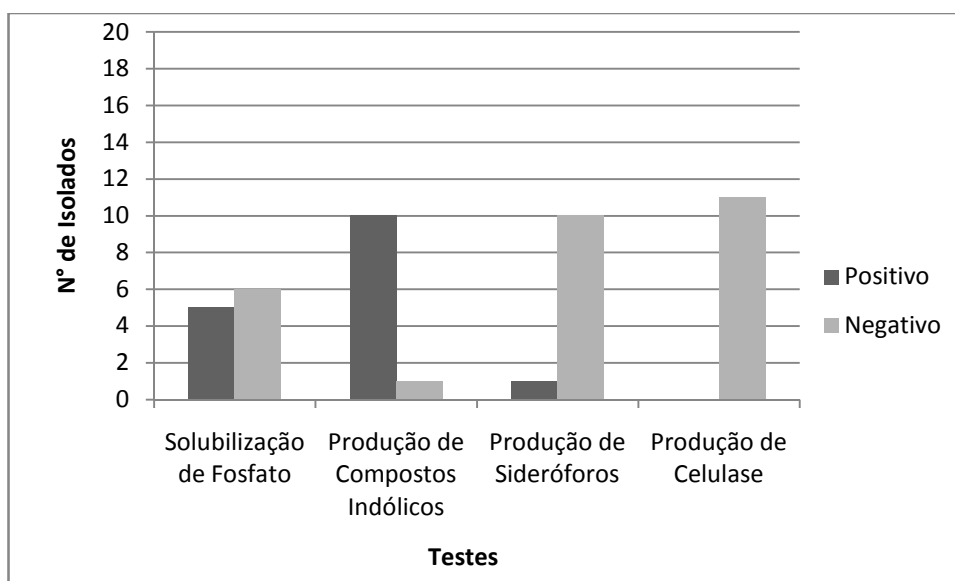


Figura 6 Resultados dos testes aplicados em estirpes do gênero *Ensifer* isoladas de *Phaseolus vulgaris*.

Para os 7 isolados do gênero *Rhizobium* observou-se o seguinte comportamento nos resultados: a maioria apresentou resultado negativo para solubilização de fosfato e produção de celulase (1 positivo e 6 negativos para ambos os testes) e para produção de compostos indólicos e de sideróforos todos os isolados foram positivos (Figura 7).

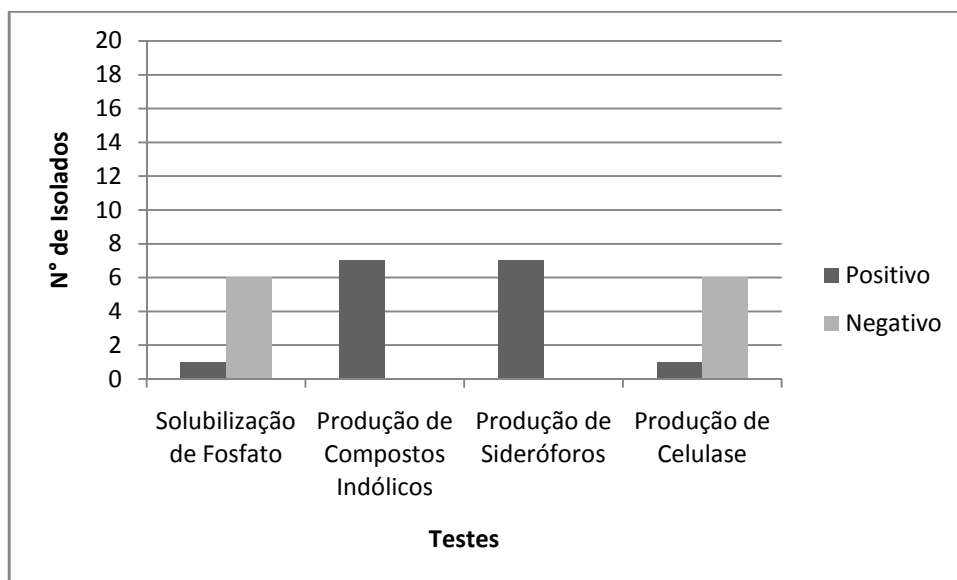


Figura 7 Resultados dos testes aplicados em estirpes do gênero *Rhizobium* isoladas de *Phaseolus vulgaris*.

4.2 Leguminosas arbóreas

Para análise de resultados das estirpes isoladas de leguminosas arbóreas, foram separados dois grupos de acordo com a subfamília dos hospedeiros. Os testes foram aplicados em 43 estirpes (Tabela 2) onde 9 foram isoladas da subfamília Papilionoideae e 34 da Mimosoideae.

Tabela 2 Resultados de testes de solubilização de fosfato, produção de compostos indólicos, produção de sideróforos e produção de celulase aplicados em isolados de leguminosas arbóreas.

Isolado	Taxonomia	Hospedeiro	Subfamília	S. Fosfato	Comp. Indól.	Prod. Sideróf.	Prod. Celulase
BR 3102	<i>Bradyrhizobium elkaniii</i>	<i>Galactia sp.</i>	Papilionoideae	+	-	+	+
BR 3458	<i>Burkholderia mimosarum</i>	<i>Mimosa flocculosa</i>	Mimosoideae	+	+	+	-
BR 3461	<i>Burkholderia oxyphila</i>	<i>Mimosa bimucronata</i>	Mimosoideae	+	-	+	+
BR 3462	<i>Burkholderia phenoliruptrix</i>	<i>Mimosa sp.</i>	Mimosoideae	+	-	+	-
BR 3463	<i>Burkholderia mimosarum</i>	<i>Mimosa sp.</i>	Mimosoideae	+	-	+	-
BR 3470	<i>Burkholderia nodosa</i>	<i>Mimosa bimucronata</i>	Mimosoideae	+	+	+	+
BR 3508	<i>Burkholderia phenoliruptrix</i>	<i>Mimosa sp.</i>	Mimosoideae	+	-	+	-
BR 3605	<i>Burkholderia sabiae</i>	<i>Acacia sp.</i>	Mimosoideae	+	+	+	-
BR 3607	<i>Bradyrhizobium elkaniii</i>	<i>Acacia decurrens</i>	Mimosoideae	+	-	+	-
BR 3608	<i>Bradyrhizobium rifense</i>	<i>Acacia decurrens</i>	Mimosoideae	+	-	+	-
BR 3609	<i>Bradyrhizobium elkaniii</i>	<i>Acacia auriculiformes</i>	Mimosoideae	-	-	+	-
BR 3611	<i>Bradyrhizobium elkaniii</i>	<i>Acacia podalyriaefolia</i>	Mimosoideae	+	-	+	-
BR 3613	<i>Bradyrhizobium cytisi</i>	<i>Acacia decurrens</i>	Mimosoideae	+	+	+	-
BR 3614	<i>Burkholderia phenoliruptrix</i>	<i>Acacia sp.</i>	Mimosoideae	+	-	+	-
BR 3617	<i>Bradyrhizobium elkaniii</i>	<i>Acacia mangium</i>	Mimosoideae	+	+	+	-

Continua...

Isolado	Taxonomia	Hospedeiro	Subfamília	S. Fosfato	Comp. Indól.	Prod. Sideróf.	Prod. Celulase
BR 3627	<i>Bradyrhizobium rifense</i>	<i>Acacia decurrens</i>	Mimosoideae	-	-	+	-
BR 3630	<i>Mesorhizobium plurifarum</i>	<i>Acacia angustissima</i>	Mimosoideae	+	-	+	-
BR 3804	<i>Mesorhizobium silamurunense</i>	<i>Chamaecrista sp.</i>	Caesalpinioideae	+	-	+	-
BR 4301	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	<i>Calliandra calothyrsus</i>	Mimosoideae	+	-	+	-
BR 4406	<i>Bradyrhizobium elkaniiii</i>	<i>Enterolobium sp.</i>	Mimosoideae	+	-	+	-
BR 4814	<i>Burkholderia sabiae</i>	<i>Piptadenia sp.</i>	Mimosoideae	+	-	+	-
BR 5004	<i>Bradyrhizobium elkaniiii</i>	<i>Dimorphandra sp.</i>	Mimosoideae	+	-	+	-
BR 5005	<i>Bradyrhizobium elkaniiii</i>	<i>Dimorphandra sp.</i>	Mimosoideae	-	+	-	-
BR 5201	<i>Bradyrhizobium rifense</i>	<i>Erythrina sp.</i>	Papilionoideae	+	-	+	-
BR 5202	<i>Bradyrhizobium rifense</i>	<i>Erythrina sp.</i>	Papilionoideae	+	-	+	-
BR 5203	<i>Bradyrhizobium rifense</i>	<i>Erythrina sp.</i>	Papilionoideae	+	-	+	-
BR 5204	<i>Bradyrhizobium rifense</i>	<i>Erythrina sp.</i>	Papilionoideae	-	-	-	-
BR 5205	<i>Bradyrhizobium rifense</i>	<i>Erythrina sp.</i>	Papilionoideae	-	-	-	-
BR 5401	<i>Azorhizobium doebereineriae</i>	<i>Sesbania sp.</i>	Papilionoideae	-	-	-	-
BR 5610	<i>Bradyrhizobium elkaniiii</i>	<i>Albizia sp.</i>	Mimosoideae	+	+	+	-

Continua...

Isolado	Taxonomia	Hospedeiro	Subfamília	S. Fosfato	Comp. Indól.	Prod. Sideróf.	Prod. Celulase
BR 5612	<i>Bradyrhizobium elkaniii</i>	<i>Albizia sp.</i>	Mimosoideae	+	-	+	-
BR 6205	<i>Bradyrhizobium elkaniii</i>	<i>Samanea sp.</i>	Mimosoideae	-	-	+	-
BR 6212	<i>Bradyrhizobium elkaniii</i>	<i>Samanea sp.</i>	Mimosoideae	+	-	-	-
BR 6604	<i>Xanthobacter flavus</i>	<i>Inga laurina</i>	Mimosoideae	-	-	-	-
BR 6605	<i>Bradyrhizobium iriomotense</i>	<i>Inga laurina</i>	Mimosoideae	-	-	n/a	-
BR 6606	<i>Starkeya novella</i>	<i>Inga laurina</i>	Mimosoideae	-	+	+	-
BR 6607	<i>Rhizobium tropici</i>	<i>Inga laurina</i>	Mimosoideae	+	+	+	-
BR 6608	<i>Bradyrhizobium elkaniii</i>	<i>Inga laurina</i>	Mimosoideae	+	-	+	-
BR 6609	<i>Bradyrhizobium elkaniii</i>	<i>Inga sessilis</i>	Mimosoideae	+	-	+	-
BR 8801	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	<i>Gliricidia sp.</i>	Papilionoideae	+	+	+	-
BR 8802	<i>Rhizobium jaguaris</i>	<i>Gliricidia sp.</i>	Papilionoideae	-	+	+	+
BR 9002	<i>Burkholderia oxyphila</i>	<i>Parapiptadenia sp.</i>	Mimosoideae	+	-	+	+
BR 9004	<i>Burkholderia oxyphila</i>	<i>Parapiptadenia sp.</i>	Mimosoideae	+	-	+	-
BR 10248	<i>Bradyrhizobium iriomotense</i>	<i>Inga sp.</i>	Mimosoideae	+	-	-	+

As abreviações significam: solub. fosfato: solubilização de fosfato; comp. indól.: produção de compostos indólicos; prod. sideróf.: produção de sideróforos; prod. celulase: produção de celulase; (+) resultado positivo; (-) resultado negativo; (n/a) não se aplica.

Numa análise geral (Figura 8), os isolados de leguminosas arbóreas apresentaram elevada tendência à solubilização de fosfato (32 positivos e 11 negativos) e à produção de sideróforos (35 positivos e 7 negativos). Por outro lado, esses isolados não mostraram predominância na capacidade de produção de compostos indólicos (11 positivos e 32 negativos) e produção de celulase (6 positivos e 37 negativos).

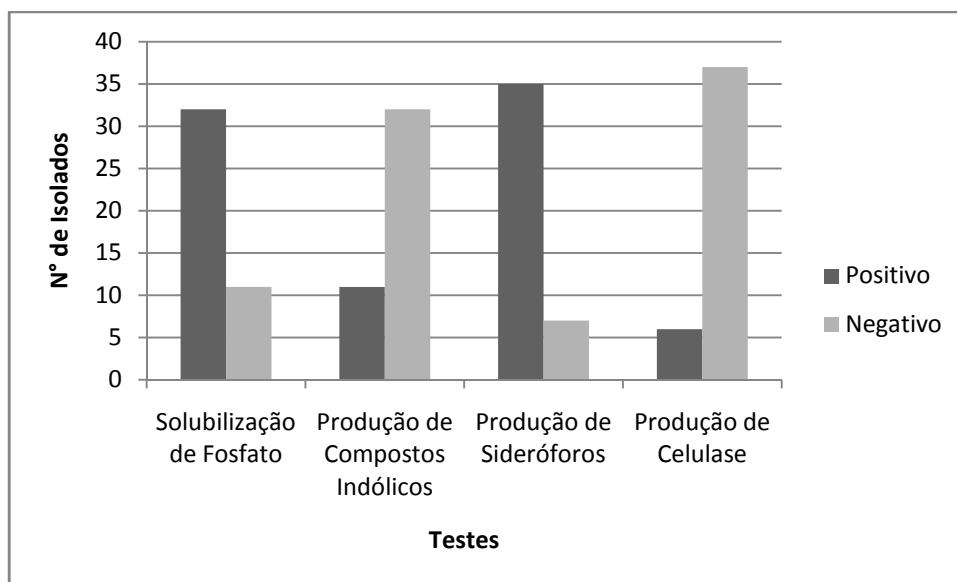


Figura 8 Resultados dos testes aplicados em estirpes isoladas de leguminosas arbóreas.

Com exceção ao teste de produção de celulase, que, como mencionado anteriormente, não é uma característica de promoção de crescimento vegetal comumente encontrada no grupo dos rizóbios, 8 estirpes mostraram-se positivos para todas as demais características avaliadas, são elas: BR 3458, BR 3605, BR 3613, BR 3617, BR 5610, BR 6607 e BR 8801.

Em relação à subfamília Papilionoideae (Figura 9) foram analisados 6 isolados do gênero *Bradyrhizobium*, 1 de *Azorhizobium*, 1 de *Agrobacterium* e 1 de *Rhizobium*. Seguindo a tendência de resultados da análise geral, dentro do gênero *Bradyrhizobium* houve predomínio de estirpes solubilizadoras de fosfato (4 positivos e 2 negativos) e produtoras de sideróforos (4 positivos e 2 negativos). Vale ressaltar que ainda no gênero *Bradyrhizobium* as mesmas estirpes que solubilizaram o fosfato de cálcio também produziram sideróforos. Foram elas: BR 3102, BR 5201, BR 5202 e BR 5203. Nos outros testes, houve predominância de resultados negativos: todos isolados foram negativos para produção de compostos indólicos e 5, dos 6 isolados, negativos para produção de celulase.

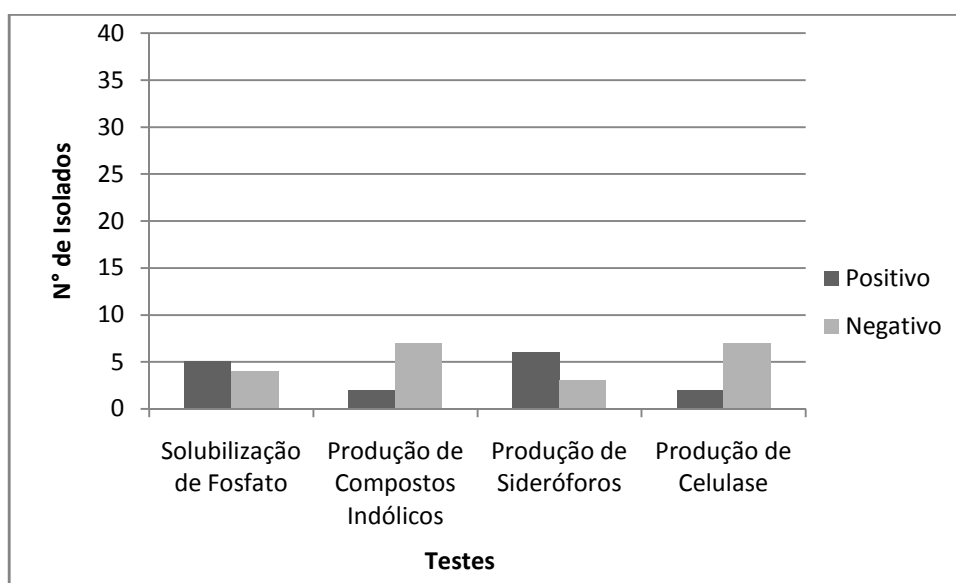


Figura 9 Resultados dos testes aplicados em estirpes isoladas de leguminosas arbóreas, subfamília Papilonoideae.

Dos 34 isolados testados da subfamília Mimosoideae (Figura 10): 18 pertenciam ao gênero *Bradyrhizobium*, 11 ao *Burkholderia*, 1 ao *Mesorhizobium*, 1 ao *Agrobacterium*, 1 ao *Xanthobacter*, 1 ao *Starkeya* e 1 ao *Rhizobium*. Assim como na subfamília Papilonoideae, os gêneros mais numerosos de isolados da subfamília Mimosoideae seguiram a tendência dos resultados da análise geral das estirpes de leguminosas arbóreas. Dos 18 isolados do gênero *Bradyrhizobium* (Figura 11) 13 apresentaram resultado positivo e 5 resultado negativo para solubilização de fosfato de cálcio, 4 foram positivos e 14 negativos para produção de compostos indólicos, 14 positivos e 3 negativos para a produção de sideróforos e 1 positivo e 17 negativos para a produção de celulase. Não foi possível aplicar o teste de produção de sideróforos na estirpe BR6605. Mesmo após várias repetições, a estirpe não apresentava crescimento no meio contendo solução de cromoazurol-S.

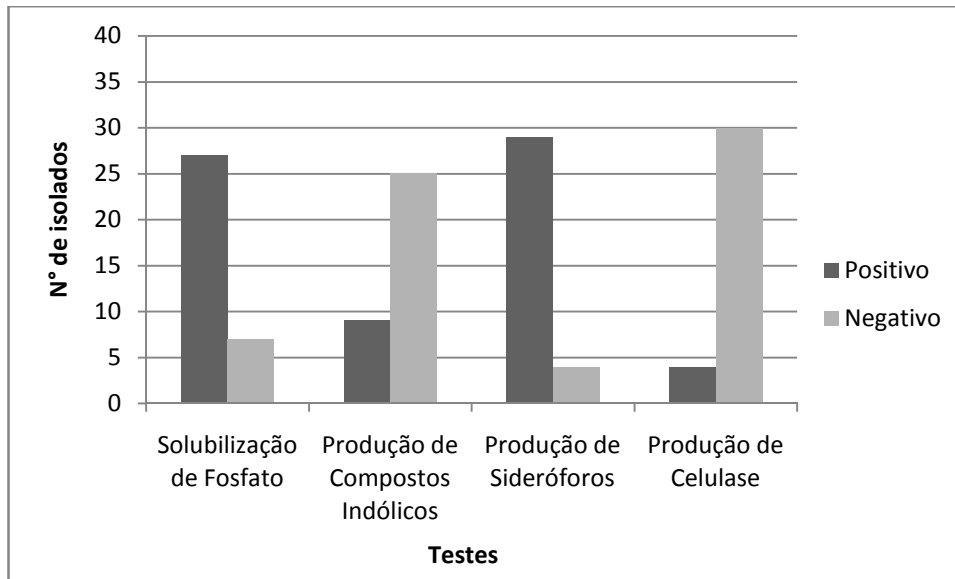


Figura 10 Resultados dos testes aplicados em estirpes isoladas de leguminosas arbóreas, subfamília Mimosoideae.

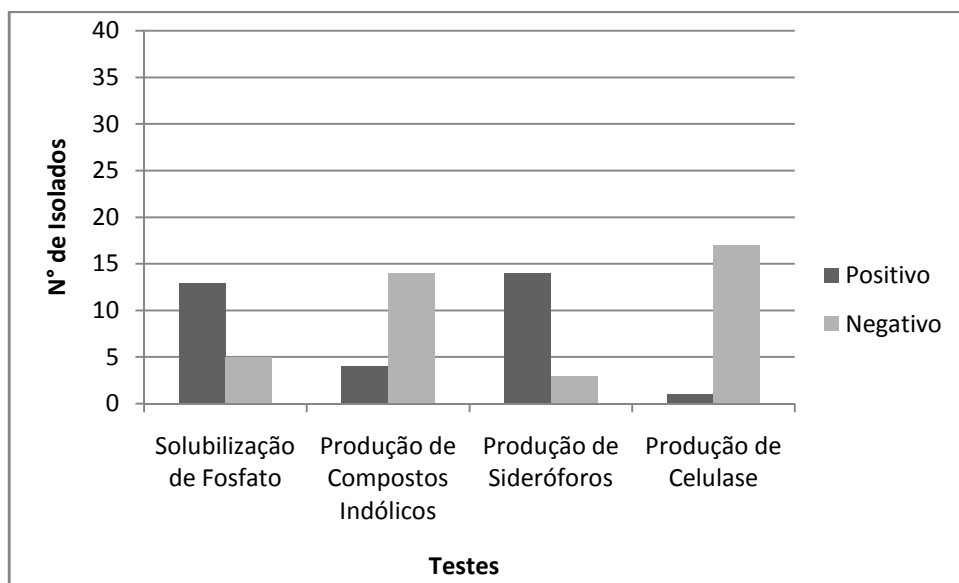


Figura 11 Resultados dos testes aplicados em estirpes do gênero *Bradyrhizobium* isoladas de leguminosas arbóreas da subfamília Mimosoideae.

Os 11 isolados analisados do gênero *Burkholderia* (Figura 12) apresentaram capacidade para solubilizar fosfato de cálcio e produzir sideróforos. Para os demais testes foram observados 4 resultados positivos e 7 negativos para produção de compostos indólicos e 3 positivos e 8 negativos para a produção de celulase. A estirpe BR 3470 merece destaque, pois foi a única estirpe avaliada a apresentar resultado positivo para todos os testes, mostrando assim ser uma possível candidata a recomendação para promotora de crescimento vegetal.

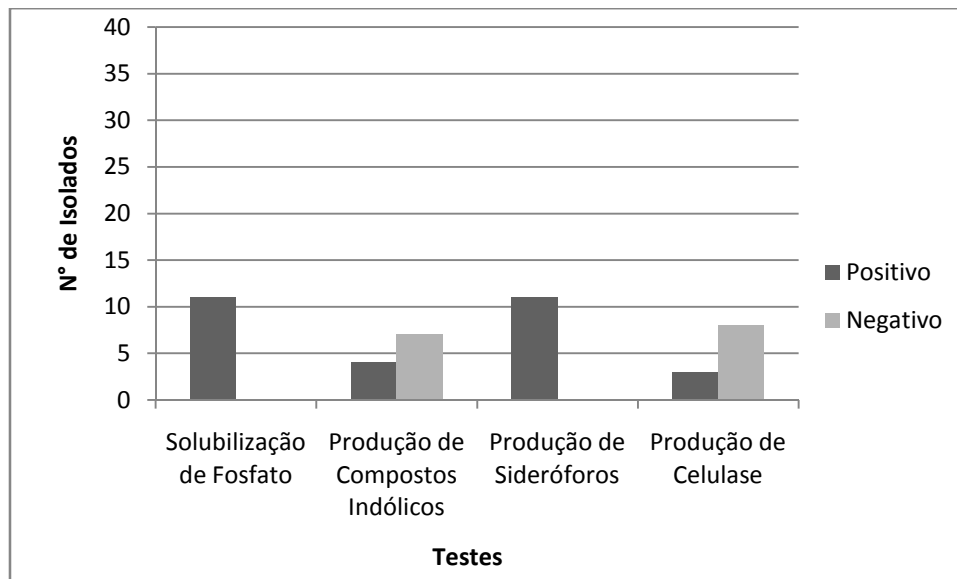


Figura 12 Resultados dos testes aplicados em estirpes do gênero *Burkholderia* isoladas de leguminosas arbóreas da subfamília Mimosoideae.

4.3 *Vigna unguiculata*

Foram avaliadas 50 estirpes isoladas de feijão caupi (*Vigna unguiculata*) pertencentes aos seguintes gêneros: 36 estirpes de *Bradyrhizobium*, 6 de *Microvirga*, 4 de *Ensifer* (= *Sinorhizobium*), 3 de *Rhizobium* e 1 de *Burkholderia* (Tabela 3).

Tabela 3 Resultados de testes de solubilização de fosfato, produção de compostos indólicos, produção de sideróforos e produção de celulase aplicados em isolados de *Vigna unguiculata*

Isolado	Taxonomia	Solub.	Comp.	Prod.	Prod.
		Fosf.	Indól.	Sid.	Celu.
BR 3250	<i>Sinorhizobium fredii</i>	-	+	+	-
BR 3251	<i>Sinorhizobium fredii</i>	-	+	-	-
BR 3252	<i>Sinorhizobium fredii</i>	-	+	-	-
BR 3253	<i>Sinorhizobium fredii</i>	-	+	-	-
BR 3254	<i>Bradyrhizobium huanghuaihaiense</i>	-	-	+	-
BR 3255	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	-	-	-	-
BR 3256	<i>Bradyrhizobium huanghuaihaiense</i>	-	-	+	-
BR 3260	<i>Rhizobium pusense</i>	-	+	+	-
BR 3261	<i>Rhizobium pusense</i>	-	+	+	-
BR 3262	<i>Bradyrhizobium elkani</i>	-	-	-	-
BR 3267	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>	-	-	+	-
BR 3277	<i>Bradyrhizobium elkani</i>	-	-	+	-
BR 3278	<i>Bradyrhizobium elkani</i>	-	-	+	-
BR 3279	<i>Bradyrhizobium elkani</i>	+	-	+	-
BR 3280	<i>Bradyrhizobium elkani</i>	-	+	+	-
BR 3281	<i>Bradyrhizobium elkani</i>	+	-	+	-
BR 3282	<i>Bradyrhizobium elkani</i>	-	+	-	-
BR 3283	<i>Bradyrhizobium elkani</i>	-	-	+	-
BR 3284	<i>Bradyrhizobium elkani</i>	-	+	+	-
BR 3285	<i>Bradyrhizobium elkani</i>	+	-	+	-
BR 3286	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	-	-	-	-
BR 3287	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	-	-	-	-
BR 3288	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	-	-	-	-
BR 3291	<i>Microvirga lupini</i>	-	-	+	-
BR 3292	<i>Rhizobium pusense</i>	+	+	+	-
BR 3293	<i>Bradyrhizobium elkani</i>	-	-	+	-
BR 3294	<i>Microvirga guangxiensis</i>	-	+	+	-
BR 3295	<i>Microvirga guangxiensis</i>	-	+	-	-

Isolado	Taxonomia	Solub.	Comp.	Prod.	Prod.
		Fosf.	Indól.	Sid.	Celu.
BR 3296	<i>Microvirga lupini</i>	-	+	+	-
BR 3297	<i>Burkholderia mimosarum</i>	+	+	+	-
BR 3298	<i>Microvirga lupini</i>	-	+	-	-
BR 3299	<i>Microvirga lupini</i>	-	-	-	-
BR 3300	<i>Bradyrhizobium iriomotense</i>	-	-	+	-
BR 3301	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	+	-	+	-
BR 3302	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	-	-	-	+
BR 3303	<i>Bradyrhizobium rifense</i>	-	-	-	-
BR 3304	<i>Bradyrhizobium rifense</i>	-	-	-	-
BR 3305	<i>Bradyrhizobium rifense</i>	-	-	-	-
BR 3306	<i>Bradyrhizobium rifense</i>	-	+	-	-
BR 3307	<i>Bradyrhizobium rifense</i>	-	-	-	-
BR 3308	<i>Bradyrhizobium rifense</i>	-	-	-	-
BR 3309	<i>Bradyrhizobium rifense</i>	-	-	-	-
BR 3310	<i>Bradyrhizobium rifense</i>	-	-	-	+
BR 3311	<i>Bradyrhizobium rifense</i>	-	-	-	-
BR 3315	<i>Bradyrhizobium rifense</i>	-	-	-	-
BR 3321	<i>Bradyrhizobium rifense</i>	-	-	-	+
BR 3323	<i>Bradyrhizobium rifense</i>	-	-	-	-
BR 3351	<i>Bradyrhizobium rifense</i>	+	-	-	-
BR 3352	<i>Bradyrhizobium rifense</i>	+	-	-	-
BR 3361	<i>Bradyrhizobium rifense</i>	-	-	-	-

As abreviações significam: solub. fosf.: solubilização de fosfato; comp. indól.: produção de compostos indólicos; prod. Sid.: produção de sideróforos; prod. celu.: produção de celulase; (+) resultado positivo; (-) resultado negativo.

De uma forma geral, os isolados de feijão caupi demonstraram tendência de resultados negativos para os testes de solubilização de fosfato (8 positivos e 42 negativos), produção de compostos indólicos (16 positivos e 34 negativos) e produção de celulase (3 positivos e 47 negativos). Para o teste de produção de sideróforos não foi observada uma dominância nos resultados como nos outros testes (22 positivos e 28 negativos) (Figura 13).

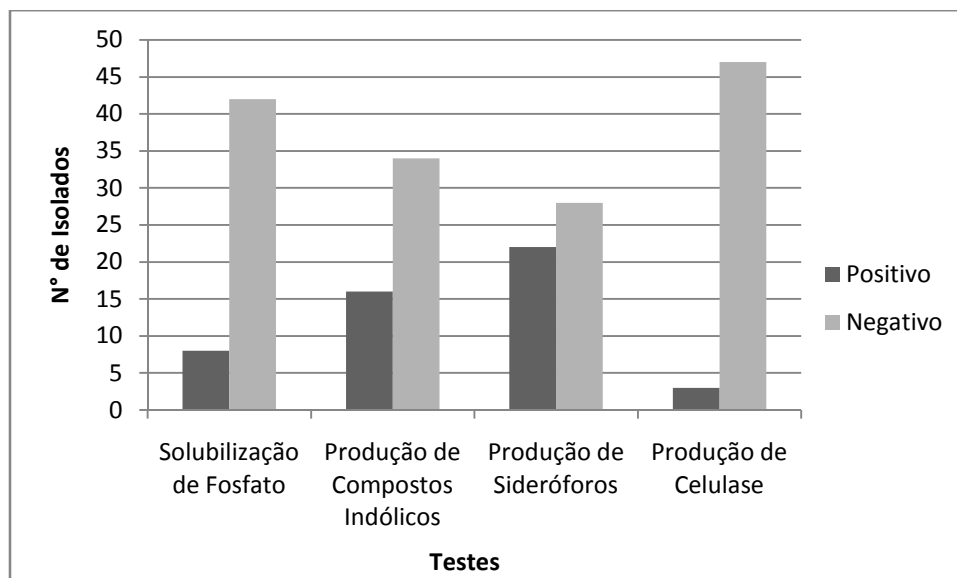


Figura 13 Resultados dos testes aplicados em estirpes isoladas de *Vigna unguiculata*.

Foram encontrados 19 isolados com resultados negativos para os 4 testes analisados, onde a maioria é classificada taxonomicamente como *Bradyrhizobium rifense* (13 isolados). Com exceção do teste de produção de celulase, 2 isolados demonstraram resultados positivos para todos os demais teste (BR 3292 e BR 3297).

No gênero *Bradyrhizobium* (Figura 14), o gênero com maior número de estirpes analisadas, 36 no total, houve predomínio de resultados negativos para todos os testes, sendo 30 negativos para solubilização de fosfato, 32 negativos para produção de compostos indólicos, 22 negativos para produção de sideróforos e 33 negativos para produção de celulase. Já para o gênero *Ensifer* (= *Sinorhizobium*), com 4 estirpes analisadas, os resultados foram bastante similares entre si, onde todas as estirpes se apresentaram negativas para a solubilização de fosfato e produção de celulase e todas positivas para a produção de compostos indólicos. Na produção de sideróforos 3 isolados apresentaram resultado negativo.

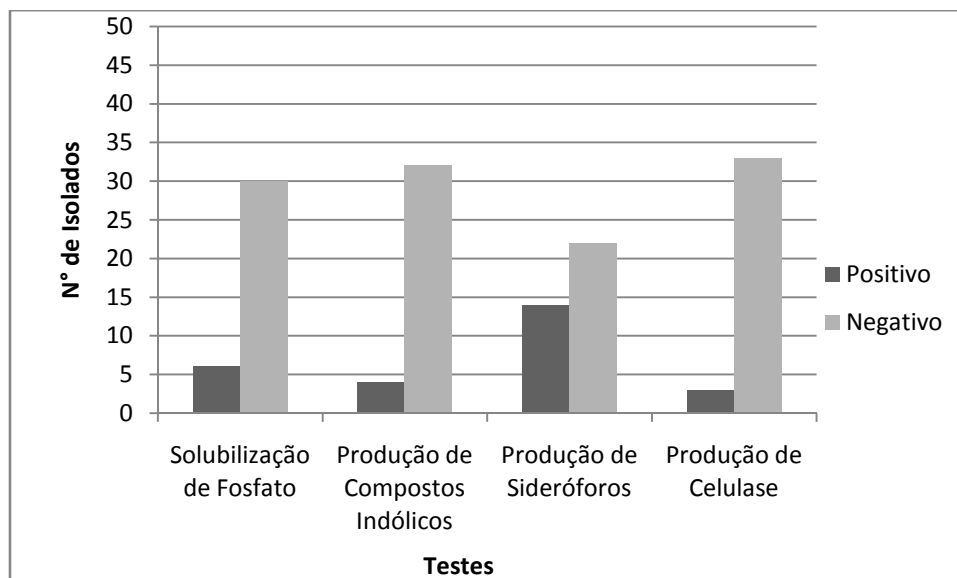


Figura 14 Resultados dos testes aplicados em estirpes do gênero *Bradyrhizobium* isoladas de *Vigna unguiculata*.

5. DISCUSSÃO

Neste estudo, os resultados dos testes de características de promoção de crescimento em plantas aplicados em estirpes de rizóbio foram analisados de acordo com o hospedeiro das bactérias. Dessa forma, foi possível observar que em laboratório os isolados demonstraram certa dominância nos resultados de cada teste, como demonstrado anteriormente. Os gêneros mais numerosos presentes em cada hospedeiro possibilitaram essa observação.

Analisando a capacidade da solubilização do fosfato de cálcio, os isolados de leguminosas arbóreas da subfamília Mimosoideae foram os que mais se destacaram, onde 79% dos isolados apresentaram esta característica. Na análise de 11 isolados pertencentes ao gênero *Burkholderia*, todos solubilizaram fosfato de cálcio, corroborando os dados da literatura, que descreve estas bactérias como eficientes solubilizadoras de fosfato (SONG et al., 2008). A solubilização biológica de fosfato é uma alternativa para melhorar a eficiência da utilização de fosfato natural na agricultura. O principal mecanismo envolvido na solubilização de fósforo está relacionado com ácidos orgânicos sintetizados pelos microrganismos, que promovem a acidificação do ambiente. Entre estes, o ácido glucônico, aparentemente, é o composto mais frequentemente sintetizado. Outros ácidos envolvidos na solubilização de fosfatos são o ácido 2-cetoglucônico, ácido láctico, ácido isovalérico, ácido isobutírico e ácido acético (RODRIGUEZ e FRAGA, 1999; SOUSA et al., 2008). Além dos ácidos orgânicos, a liberação de prótons H^+ para o exterior das células e a produção de

substâncias quelantes, podem constituir mecanismos alternativos para a solubilização de fosfatos orgânicos (OLIVEIRA et al., 2003; SOUSA et al., 2008).

A produção de compostos indólicos foi bastante observada nos isolados de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), onde 18 das 19 estirpes avaliadas mostraram essa capacidade. Ao produzir hormônios vegetais, os microorganismos estimulam o crescimento das plantas, principalmente das raízes, quando ocorre a produção de metabolitos por elas e que podem ser utilizados para o crescimento microbiano (OLIVEIRA et al., 2003).

Em relação à produção de sideróforos os isolados de leguminosas arbóreas destacaram-se. A maioria dos isolados das duas subfamílias analisadas mostraram essa capacidade. Foram avaliadas 11 estirpes do gênero *Burkholderia*, isoladas da subfamília Mimosoideae e todas, assim como no teste de solubilização de fosfato, apresentaram capacidade em produzir sideróforos, características que merecem atenção quando se pensa em leguminosas arbóreas para a recuperação de áreas degradadas. Nas estirpes do gênero de *Bradyrhizobium* isoladas da subfamília Papilonoideae, 4 das 6 estirpes estudadas produziram sideróforos, mas, interessante, assim como no gênero *Burkholderia*, essas 4 estirpes também solubilizaram fosfato de cálcio (BR 3102, BR 5201, BR 5202 e BR 5203). Portanto, foi possível perceber que para a maioria dos isolados, as duas características estavam frequentemente associadas. A produção de sideróforos admite aos micro-organismos uma competitiva vantagem, uma vez que estas moléculas capturam o ferro do solo em resposta à baixa disponibilidade desse elemento. Segundo Wei et al. (1996), estes micro-organismos ao produzirem os sideróforos atuam como promotores de crescimento devido à capacidade de inibir a proliferação de agentes patogênicos na rizosfera privando-os deste nutriente essencial.

Os resultados do teste de produção de celulase foram similares para todas as estirpes, independente do hospedeiro de origem, onde apenas 8,8% foram capazes de produzir celulase extracelular, o que já era esperado, visto que essa característica não é comumente encontrada nas bactérias do grupo rizóbio. Oliveira et al. (2006), avaliando a atividade de 67 isolados de rizóbios para produção de carboximetilcelulase, verificaram esta característica em apenas 6 dos isolados.

A maioria das estirpes isoladas de *Vigna unguiculata* não apresentou as características de promoção de crescimento vegetal estudadas. Apesar da estirpe BR 3267 ser recomendada como estirpe fixadora de nitrogênio na produção de inoculantes para essa cultura, esta apresentou resultado positivo apenas para produção de

sideróforos. Este fato sugere que as características de promoção de crescimento vegetal podem atuar independentemente na contribuição eficiente à planta.

Por outro lado, a estirpe BR 3470 pertencente ao gênero *Burkholderia*, isolada da família Fabaceae, subfamília Mimosoideae, foi o único isolado a apresentar resultado positivo para todos os testes aplicados. Cabe posteriormente, constatar se esta capacidade constatada “*in vitro*” pode ser refletida na melhoria do desenvolvimento dos vegetais advinda da inoculação desta bactéria em plantas .

Todas as 112 estirpes utilizadas neste estudo foram depositadas na CCBD apenas com informações sobre sua capacidade de fixação de nitrogênio. Neste estudo foi possível descrever outras características de promoção de crescimento vegetal que estas mesmas bactérias possam ter, fazendo-se uma análise qualitativa dos isolados a fim de complementar as informações da CCBD. Estas estirpes encontram-se agora com mais informações disponíveis para a pesquisa em inoculante microbiano. Entretanto, vale lembrar que este estudo foi realizado *in vitro* e, portanto, devem ser feitas outras análises observando o comportamento dessas bactérias aplicadas diretamente nos hospedeiros em condições controladas *in vivo* e posteriormente no campo.

6. CONCLUSÕES

- A maioria dos isolados de *Phaseolus vulgaris* (94,7% dos 19 isolados) demonstrou capacidade de produzir compostos indólicos;
- As estirpes isoladas de leguminosas arbóreas destacaram-se na solubilização de fosfato de cálcio e produção de sideróforos, 74,4% e 81,4% das 43 estirpes, respectivamente.
- Todas as 11 estirpes do gênero *Burkholderia*, isoladas a partir de leguminosas arbóreas, subfamília Mimosoideae, solubilizaram fosfato e produziram sideróforos;
- A estirpe BR 3470 apresentou resultado positivo para todos os testes submetidos;
- Em todos os testes aplicados em isolados de *Vigna unguiculata* houve predominância de resultados negativos;
- Apenas 8,8% das 112 estirpes estudadas produziram celulase;
- O estudo realizado contribuiu para a modernização da CCBD, enriquecendo as informações a cerca das estirpes depositadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, M.M.V., TUTUNJI, V.L. **Implantação e manutenção da coleção de cultura de microrganismos do UniCEUB.** Universitas Ciência da Saúde, v.2, n.2, p. 236-251, 2004. Disponível em: <http://www.publicacoesacademicas.uniceub.br/index.php/ciencia_saude/article/viewFile/535/356>. Acesso em 05 out. 2014.

ANTOUN, H.; BEAUCHAMP, C. J.; GOUSSARD, N.; CHABOT, R.; LALANDE, R. **Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on no-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.).** Plant and Soil, Dordrecht, v. 204, n.1, p. 57-67, 1998.

ASGHAR, H. N.; ZAHIR, M.; ARSHAD, M.; KHALIQ, A. **Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L.** Biology and Fertility of Soils, Berlim, v 35, p. 231-237, 2002.

ASGHAR, H. N.; ZAHIR, M.; ARSHAD, M.; KHALIQ, A. **Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L.** Biology and Fertility of Soils, Berlim, v 35, p. 231-237, 2002.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L. **History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience.** An.Bras. Acad. Cienc., v. 77, pp. 549-79, 2005.

BARRIUSO, J, PEREYRA, M.T., LUCAS GARCÍA, J.A., MEGÍAS, M., GUTIERREZ MAÑERO, F.J.& RAMOS, B. **Screening for putative PGPR to improve establishment of the symbiosis *Lactarius deliciosus*-*Pinus* sp.** Microbial Ecology. 50:.82-89, 2005.

BARROSO, C. B.; NAHAS, E. Solubilização de fosfato de ferro em meio de cultura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 4, p. 529-535, 2008. Biochemistry, Oxford, v. 37, p. 395-412, 2005.

BISWAS, J. C.; LADHA, J. K.; DAZZO, F. B. Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of Lowland rice. **Soil Scientific Society American**, 64: 1644-1650, 2000.

BONTEMPS, C.; ELLIOTT, G. N.; SIMON, M. F.; REIS JUNIOR, F. B.; GROSS, E.; LAWTON, R. C.; NETO, N. E.; LOUREIRO, M. F.; FARIA, S. M.; SPRENT, J. I. *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes. **Molecular Ecology**, 19:44–52, 2010.

BRUNETTA, J. M. F. C. **Isolamento e seleção de rizobactérias para a produção de mudas de *Pinus* spp.** 2006. 57 f. Tese (Doutorado em Ciências Florestais). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

BUCHERNAUER, H. **Biological control of soil-borne diseases by rhizobacteria.** Journal of Plant Diseases e Protection, v. 105, n. 4, p. 329-248, 1998.

CAMPOS, L. L. **Caracterização de bactérias isoladas de nódulos de leguminosas para estabelecimento da coleção de culturas da Universidade Federal de Mato Grosso.** 2008. 125f. Tese (Doutorado em Agricultura Tropical). Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, MT.

CANHOS, V. P. **Centros de recursos biológicos: suporte ao desenvolvimento científico e inovação tecnológica.** Ciência e cultura, v. 55, n. 3, p. 27-29, 2003. Disponível em: <http://www.cria.org.br/cgee/documentos/centros_de_recursos_biologicos.doc>. Acesso em : 12 out. 2014.

CASTRO, M. A.; PEREIRA Jr. N. **Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais.** Química Nova, v. 33, p. 181-188, 2010

CHAGAS JUNIOR, A. F.; de OLIVEIRA, L. A.; de OLIVEIRA, A. N.; WILLERDING, A. L. **Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia.** Acta Scientiarum Agronomy, Maringá, v. 32, n. 2, p. 359-366, 2010.

CHEN, W. M., DE FARIA, S. M., CHOU, J. H., JAMES, E. K., ELLIOTT, G. N., SPRENT, J. I., BONTEMPS, C., YOUNGM, J.P., VANDAMME, P. ***Burkholderia sabiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpinifolia***. Intl. J. Syst. Evol. Microbiol, v. 58, pp. 2174-2179, 2008.

CHEN, W. M.; LAEVENS, S.; LEE, T. M.; COENYE, T.; de VOS, P.; MERGEAY, M.; VANDAMME, P. ***Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosaspecies* and sputum of a cystic fibrosis patient**. International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 51, p. 1729–1735, 2001.

CHEN, W.-M., DE FARIA, S. M., JAMES, E. K. B., ELLIOTT, G. N., SPRENT, J. L., VANDAMME, P. ***Burkholderis nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella***. Intl. J. Syst. Evol. Microbiol, v. 57, p. 1055-1059, 2007.

COSTA, E. C.; TEIXEIRA, M. F. S.; DANTAS, T. V. M.; MELO, V. S. P.; ARAUJO, S. A. C.; ROLIM, B. N. **Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas**. Ciência Animal, Goiânia, v. 19, n. 2, p.111-122, 2009. Disponível em: <http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/artigo1_0_2009.pdf>. Acesso em 12 out. 2014.

DA SILVEIRA, E. L. **Inoculações de bactérias promotoras de crescimento no cultivo de arroz em solução nutritiva**. 2008. 83 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

DASHTI, N.; ZHANG, F.; HYNES, R.; SMITH, D. L. **Plant growth promoting rhizobacteria accelerate nodulation and increase nitrogen fixation activity by field grown soybean (*Glycine max* L. Merr) under short season conditions**. Plant and Soil, Dordrecht, v. 200, p. 205-213, 1998.

DAY, J. G.; MCLELLAN, M. R. **Cryopreservation and freeze-drying protocols**. New Jersey: Humana Press, 1995.

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

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

EL-TARABILY, K. A. An endophytic chitinase-producing isolate of *Actinoplanes missouriensis* with potential for biological control of root rot of lupim caused by *Plectosporium tabacinum*. **Aust J. Bot**, 51:257-26-, 2003.

ENEBAK, S. A.; WEI, G.; KLOEPPER, J. W. **Effects of plant growth promotion rhizobacteria on loblolly and slash pine seedlings.** Forest Science, Bethesda, v.44, n.1, p. 139-144, 1998.

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.** Chapman and Hall, New York, p. 1-42, 1992.

FERNANDER-JUNIOR, P. I. **Composições poliméricas a base de carboximetilcelulose (CMC) e amido como veículos de inoculação de rizóbio em leguminosas.** 2006. 43 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

FERREIRA, T. C. **Caracterização e seleção de rizóbios noduladores de leguminosas florestais para recuperação de áreas contaminadas por petróleo.** 2007. 30 f. Monografia (Bacharelado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

FLORENCIO, C. **Microrganismos produtores de celulase: seleção de isolados de *Trichoderma spp.*** 2011, 83 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de São Carlos, SP.

FORNASIERI FILHO, D. A **cultura do milho**. Jaboticabal: FUNEP, 1992.

FREIRE, J.R.J.; RHOR, T.G.; OLIVEIRA, P.J.; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N. G. Trabalhos em rizobiologia no Rio Grande do Sul. In: Reunião Latino Americana sobre Inoculantes para Leguminosas. 4., 1968, Porto Alegre. **Anais. Porto Alegre**: Secretaria de Agricultura, 1968. p.19-24.

FROEHLICH, D. M.; FEHR, W. R. **Agronomic performance of soybeans with differing levels of iron deficiency chlorosis on calcareous soil**. Crop Science, v. 21, p. 438-441, 1981.

GARRITY, G. M.; HOLT, J. G. The road map to the *Manual*. In: BOONE, D. R.; CATENHOLZ, R. W.,(eds.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. New York: Springer-Verlag, 2001. v.1, p. 119-166.

GRAY, E.J.; SMITH, D. L. **Intracellular and extracellular PGPR:commonalities and Distinctions in the plant-bacterium signaling processes**. Soil Biology And Biochemistry, Oxford, v. 37, p. 395-412, 2005.

GUERINOT, M. L. **Microbial iron transport**. Ann. Rev. Microbiol. v. 48, p. 734-772.

GYANESHWAR, P.; JAMES, E. K.; MATHAN, N.; REDDY, P. M.; REINHOL-HUREK, B.; LADHA, J. K. **Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens***. Journal of Bacteriology. 183: 2634-2645, 2001.

IGUAL, J. M.; VALVERDE, A.; CERVANTES, E.; VELÁZQUEZ, E. **Phosphate-solubilizing bacteria as inoculantes for agriculture: use of updated molecular techniques in their study**. Agronomie, v. 21, n. 2, p. 561-568, 2001.

ILLMER, P.; BARBATO, A.; SCHINNER, F. **Solubilization of hardly-soluble $AlPO_4$ with P-solubilizing microorganisms**. Soil Biology & Biochemistry, Elmsford, v. 27, n. 3, p. 265 -270, Mar. 1995.

KASANA, R. C.; SALWAN, R.; DHAR, H.; DUTT, S.; GULATI, A. A **Rapid and Easy Method for Preparing Plates Using Gram's Iodine**. *Current Microbiology*, v. 57, p. 503-507, 2008.

KÖGL, F.; SMIT, A.J.. **Über die Chemie des Wuchsstoffs**. *K. Akad. Wetenschap. Amsterdam Proceedings. Section Science* 34: 1411–1416, 1931.

KOKALIS-BURELLE, N.; KLOEPPER, J. W.; REDDY, M. S. **Plant growth promoting rhizobacteria as transplant amendments and their effects on indigenous microorganisms**. *Applied Soil Ecology*. v. 31, p. 91-100, 2006.

KRISHNAN, H. B.; KUO, C. I.; PUEPPKE, S. G. **Elaboration of flavonoid-induced proteins by the nitrogenfixing soybean *Rhizobium fredii* is regulated by both nodD1 and nodD2, and is dependent on the cultivar-specificity locus, nolXTWBTUV**. *Microbiology*, v.141, p. 2245-2251, 1995.

LEMOS, M. T. O. **Prospecção de rizobactérias promotoras de crescimento em quatro espécies arbóreas nativas do Brasil**. 2009. 59 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

LUCY, M.; REED, E.; GLICK, B. R. **Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria**. *Antonie van Leeuwenhoek, Dordrecht*, v. 86, n. 2, p. 1-25, Aug. 2004.

LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; ZYL, W.H van; PRETORIUS, I.S.. **Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology**. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. v. 66, n. 3, p. 506-577. 2002.

MALAVOLTA, E. **Elementos da nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. 638 p.

MANFIO, G. P. **Avaliação do Estado Atual do Conhecimento Sobre a Diversidade Microbiana no Brasil**. Disponível em: <[http://www.mma.gov.br/biodiversidade /item/7933-avalia%C3%A7%C3%A3o-do-conhecimento-sobre-a-diversidadebiol%C3%B3gica](http://www.mma.gov.br/biodiversidade/item/7933-avalia%C3%A7%C3%A3o-do-conhecimento-sobre-a-diversidadebiol%C3%B3gica)>. Acesso em: 12 out. 2014.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R.; DONATO, V. M. T. S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. Recife: **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, vol. 1, p.89-111, 2004

MARON, P. A., MOUGEL, C., RANJARD, L. **Soil microbial diversity: Methodological strategy, spatial overview and functional interest**. C. R. Biologies, v. 334, pp. 403–411, 2011.

MARTÍNEZ-ROMERO, E., SEGOVIA, L., MERCANTE, F. M., FRANCO, A. A., GRAHAM, P., PARDO, M. A. ***Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees**. Int. J. Syst. Bacteriol, v. 41, n. 3, pp. 417-26, 1991.

MIYAMOTO-SHINOHARA, Y.; IMAIZUMI, T.; SUKENOBE, J.; MURAKAMI, Y.; KAWAMURA, S.; KOMATSU, Y. **Survival rate of microbes after freeze-drying and long term storage**. Cryobiology, New York, [online], v. 4, n. 3, p. 251-255, nov. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11161557>>. Acesso em: 02 out. 2014.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUERA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: Editora UFLA. 2002. p. 625.

MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. **Nature**, 411:948-950, 2001.

MUNIZ, A. W. **Promoção do crescimento em ademas e macieira utilizando rizóbios de *Adesmia latifolia***. 2011. 85 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

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

NAUTIYAL, C. S.; BHADAURIA, S.; KUMAR, P.; LAL, H. E VERMA, M. D. **Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils.** FEMS Microbiol. Lett., 182 pp. 291–296. 2000.

OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J.I. **Processos e mecanismos envolvidos na influência de microorganismos sobre o crescimento vegetal.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2003. 40p.

OLIVEIRA, A.N.; OLIVEIRA, L.A.; ANDRADE, J.S.; CHAGAS JÚNIOR, A. F. **Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia central, Amazonas, Brasil.** Ciênc. Tecnol. Aliment. 26: 853-860. 2006.

OLSSON, L.; HAHN-HAGERDAL, B. **Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production.** Enzyme Microbiology Technology, v. 18, p. 312-331, 1996.

PAOLI, DE P. **Biobanking in microbiology: from sample collection to epidemiology, diagnosis and research.** FEMS Microbiology Reviews, Amsterdam, v. 29, p. 897-910, 2005.

PATTEN, C.L.; GLICK, B.R.. **Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid.** Canadian Journal of Microbiology, v. 42, p. 207-220, 1996.

ROBLEDO, M.; JIMÉNEZ-ZURDO, J. I.; VELÁZQUEZ, E., TRUJILLO, M. E., ZURDO-PIÑEIRO, J. L.; RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; RAMOS, B.; DÍAZ-MÍNGUEZ, J. M.; DAZZO, F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; MATEOS, P. F. ***Rhizobium* cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots.** PNAS 105: 7064-7069. 2008.

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

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. **Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion.** Biotechnology Advances, Elmsford, v. 17, n. 4-5, p. 319-339, Oct. 1999.

ROMEIRO, R. S. **Preservação de Bactérias Fitopatogênicas.** Mimeografado. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitopatologia – UFV. Viçosa, MG. 1996. 11p.

ROSENBLUETH, M.; MARTINEZ-ROMERO, E. **Bacterial endophytes and their interactions with hosts.** Molecular Plant and Microorganisms Interactions, v. 8, p. 827-837, 2006.

ROTHBALLER, M.; SCHMID, M.; HARTMANN, A. **Diazotrophic bacterial endophytes in *Gramineae* and other plants.** Microbiol Monogr., v.8, p. 273-302, 2009.

SANTOS, M. P. **Fixação de N₂, solubilização de fosfato e produção de AIA por estirpes de *Bradurhizobium* simbióticas em angico vermelho e tamboril.** 2013. 70 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia e Bioquímica do Solo). Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SARWAR, M.; KREMER, R.J. **Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria.** Plant and Soil, v.172, p.261-269, 1995.

SCHWYN, B. & NEILANDS, J.B. **Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores.** Anal. Biochem., v. 160, pp. 47-56, 1987.

SICOL – Sistema de informações de coleções de interesse biotecnológico. **CRB: o que são e qual é o panorama internacional.** Disponível em: <http://sicol.cria.org.br/pdf/panorama_internacional.pdf>. Acesso em: 12 out. 2014.

SIQUEIRA, J. O.; ANDRADE, A. T.; FAQUIM, V. O papel dos microrganismos na disponibilização e aquisição de fósforo pelas plantas. In: YAMADA, T.; ABDALLA, S. R. S., Eds. **Fósforo na agricultura brasileira**. Piracicaba, Potafos, p. 117-149, 2004.

SOLA, M. C. **Manutenção de micro-organismos: conservação e viabilidade**. 2011. 31 f. Seminário (Doutorado em Ciência Animal). Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

SONG, O.R., LEE, S.J., LEE, Y.S., LEE, S.C., KIM, K.K., CHOIN, Y.L. **Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderia cepacia* da23 isolated from cultivated soil**. Brazilian Journal of Microbiology, São Paulo, v. 39, p.151-156, 2008.

SOUCHIE, E. L.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M.; SAGGIN-JUNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R. **Solubilização de fosfatos em meio sólido e líquido por bactérias e fungos do solo**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 40, n. 11, p. 1149-1152, 2005.

SOUCHIE, E. L.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M.; SAGGIN-JUNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R. **Phosphate solubilization and synergism between P-solubilizing and arbuscular mycorrhizal fungi**. Pesquisa Agropecuária, v. 41, n. 9, p. 1405-1411, 2006.

SOUSA, C. S.; SOARES, A. C. F.; GARRIDO, M. S. **Characterization of streptomycetes with potential to promote plant growth and biocontrol**. Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.), v.65, n.1, p.50-55, January/February 2008

STRALIOTTO, R.; TEIXEIRA, M.G.; MERCANTE, F.M. Fixação biológica de nitrogênio. In: AIDAR, H.; KLUTHCOUSKI, J.; STONE, L.F. (Ed.). **Produção do feijoeiro-comum em várzeas tropicais**. Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, p.121-153, 2002.

SU, S. C.; GARBERS, S.; RIEPER, T. D. TONIOLO, P. **Temperature variations in upright mechanical freezers**. Cancer Epidemiologic Biomarkers, v. 5, p. 139-140, 1996.

THIMANN, K.V. **Hormone action in the whole life of plants.** Amherst, MA: The University of Massachusetts Press, 448p, 1977.

UDVARDI, M.; POOLE, P. S. **Transport and Metabolism in Legume-Rhizobia Symbioses.** Annual Review Plant Biology, v. 64, n. 29, p. 1–29.25, 2013.

VANDAMME, P.; GORIS, J.; CHEN, W. M.; de VOS, P.; WILLEMS, A. ***Burkholderia tuberum* sp. nov and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes.** Systematic and Applied Microbiology, v. 25, n. 4, p. 507-512, 2002.

VESSEY, J. K. **Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers.** Plant Soil, v. 255, p. 571-586, 2003.

WEI, G.; KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S. **Induced systemic resistance to cucumber disease and increased plant growth by plant growth promoting rhizobacteria under field conditions.** Phytopathology, v.86, p.221-224. 1996.

WFCC – World federation for culture collections. **Statistics of collections and cultures.** Disponível em: < <http://www.wfcc.info/ccinfo/index.php/home/statistics/#m3>>. Acesso em: 20 out. 2014.

WOLFE, J.; BRYANT, G. **Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects.** International Journal of Refrigeration, Surrey, v. 24, p. 438-450, 2001.

