

PARTE 4

MICROORGANISMOS PROMOTORES DO CRESCIMENTO DE PLANTAS

Bactérias promotoras do crescimento de plantas: estratégia para uma agricultura sustentável

*Márcia do Vale Barreto Figueiredo
Júlia Kuklinsky Sobral
Tânia Lucia Montenegro Stamford
Janete Magali de Araújo*

1. Introdução

1.1. Bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCPs)

A utilização de bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCPs), para o aumento da produção agrícola, será provavelmente uma das táticas mais importantes para a atualidade no mundo. Isso se deve à demanda emergente para a diminuição da dependência de fertilizantes químicos e a necessidade de desenvolvimento da agricultura sustentável (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Bactérias em habitats naturais colonizam o interior e exterior de órgãos de plantas e podem ser benéficas, neutras ou prejudiciais ao seu crescimento (MARIANO et al., 2004). As BPCPs estimulam diretamente a fixação de nitrogênio (HAN et al., 2005), podem ser capazes de solubilizar nutrientes (RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999), produzir hormônios de crescimento por meio da presença de 1-amino-ciclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminase (DONATE-CORREA et al., 2004); ácido

indol acético (AIA) (CATTELAN, 1999) e indiretamente por antagonismo a fungos patogênicos, produção de sideróforos, quitinase, β -1,3-glucanase, antibióticos, pigmentos fluorescentes, e cianetos (RENEWICK et al., 1991).

Pesquisas vêm sendo desenvolvidas no intuito de se conhecer cada vez mais as potencialidades das BPCPs. Rodríguez-Díaz et al. (2004), em estudo realizado na Antártica, encontraram três novas espécies de *Paenibacillus* (*P. cineris*, *P. cookii* e *P. wynnii*), fixadores de nitrogênio atmosférico. Seldin (2008) relata que, dentre as 89 espécies e 2 subespécies de *Paenibacillus* descritas na literatura, 14 possuem estirpes com a capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico; são elas: *P. polymyxa*, *P. macerans*, *P. peoriae*, *P. graminis*, *P. odorifer*, *P. brasilensis*, *P. durus*, *P. borealis*, *P. wynnii*, *P. massiliensis*, *P. sabiniae*, *P. zanthoxyli*, *P. donghaensis* e *P. forsythiae*.

Pesquisas sobre aplicações práticas de BPCPs têm tido sucesso na medida em que já existem produtos comerciais à base dessas bactérias nos Estados Unidos, China, Austrália, País de Gales e Nova Zelândia (LUZ, 1996). Na China, BPCPs são chamadas Yield increasing bactéria (YIB), sendo aplicadas extensivamente no campo, chegando a induzir aumentos médios de cerca de 21% em produtividade.

O papel dos microrganismos endofíticos nas plantas tem sido muito discutido; e embora pouco entendido, uma associação simbiótica têm sido sugerida (CREWS et al., 2004). Algumas bactérias endofíticas antagonistas têm sido testadas para o controle biológico de fungos fitopatogênicos (CHEN et al., 1995).

A grande vantagem dessas bactérias com relação às epifíticas é o fato de colonizarem internamente as plantas, um habitat protegido onde exercem mecanismos diversos (PEIXOTO NETO et al., 2002). Mendes e Azevedo (2007) sugerem, dentro da definição de microrganismos endofíticos, a divisão de endofíticos em dois tipos: a) tipo I, os que não produzem estruturas externas à planta, e b) tipo II, os que produzem estruturas externas à planta.

Tem sido demonstrado que estirpes isoladas de uma espécie vegetal são mais aptas a se restabelecer nas raízes, quando inoculadas na mesma espécie vegetal, sendo denominadas estirpes homólogas (BALDANI; BALDANI, 2005). Além disso, admite-se ser o genótipo da planta fator-chave para obtenção dos benefícios causados por bactérias

diazotróficas endofíticas (REIS et al., 2000). Lacava et al. (2008) relatam que os microrganismos endofíticos são uma nova fonte para busca de moléculas bioativas de interesse em diversas áreas, como as indústrias farmacêuticas e agrícolas.

1.2. Coinoculação: bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCPs) e rizóbios

Li e Alexander (1988) conseguiram incrementar a colonização e a nodulação de soja, por meio da coinoculação de *Bradyrhizobium japonicum* com bactérias do gênero *Bacillus*, produtoras de antibióticos. Outros relatos demonstram efeitos positivos na nodulação pela coinoculação de rizóbio com outras espécies de bactérias (FIGUEIREDO et al., 2007; SILVA et al., 2006, 2007). Essa contribuição foi relacionada com a produção de fito-hormônios, pectinase ou sinais moleculares em *Bacillus cereus* (HALVERSON; HANDELSMAN, 1991) e outras espécies de microrganismos (DAKORA, 2003).

Estudos de coinoculação com BPCP e rizóbios têm apresentado aumento na nodulação e fixação do N_2 (ARAÚJO; HUNGRIA, 1999; FIGUEIREDO et al., 2008; LI; ALEXANDER, 1988; SILVA et al., 2006; VESSEY; BUSS, 2002). A coinoculação de *Bradyrhizobium* com estirpe de *Bacillus* resultou no aumento da nodulação da *Vigna unguiculata* (Figura 1). Trabalhos conduzidos por Sindhu et al. (2002) também encontraram aumento na nodulação e crescimento da *Vigna radiata*.

A variedade de microrganismos, incluindo espécies de *Bacillus* e *Pseudomonas*, é comumente encontrada na rizosfera de plantas leguminosas e não leguminosas (LI; ALEXANDER, 1988). Em virtude da rápida colonização desses microrganismos na rizosfera e estimulação no crescimento da planta, existe considerável interesse em pesquisar esses e/ou outros microrganismos existentes na rizosfera visando otimizar a produção da cultura de interesse. Aumento na nodulação e benefícios nas plantas são encontrados em diferentes culturas, tais como feijão (CAMACHO et al., 2001; FIGUEIREDO et al., 2007, 2008; SRINIVASAN et al., 1996); soja (LAMBRECHT et al., 2000; VESSEY; BUSS, 2002); caupi (SILVA et al., 2006, 2007); e ervilha (COOPER; LONG, 1994).

Foto: Márcia do Vale Barreto Figueiredo



Figura 1. Raízes de caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) cv IPA 205 nodulada, inoculada com *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) (B) e coinoculada com *Bradyrhizobium* sp. + *Bacillus subtilis* 434(C1) (B+434). Experimento desenvolvido em casa de vegetação do Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA) no laboratório de biologia do solo em vasos de Leonard com areia + vermiculita na proporção 2:1.

Araújo e Hungria (1999) demonstraram a viabilidade da coinoculação em semente de soja, de metabólitos brutos ou formulados ou, ainda, de células de *Bacillus subtilis*, para incrementar a contribuição do processo de FBN.

Silva et al. (2007) verificaram que houve estímulo na nodulação específica do caupi coinoculado com *Bradyrhizobium* sp. (BR2001), *Paenibacillus polymyxa* (Loutit L) e *Bacillus* sp. (LBF-410), eviden-

ciado pela correlação positiva entre nitrogênio acumulado/ matéria seca da raiz (MSR) e nodulação específica. Efeitos indireto e direto na nodulação específica foram mostrados pela diminuição significativa do crescimento da raiz (40%) e pelo aumento não significativo do número de nódulos (46%) nas estirpes Loutit (L.) de *P. polymyxa* e na LBF-410 de *P. macerans*.

Em relação ao aumento nas concentrações de macro e microelementos, Silva et al. (2006), em estudos utilizando diferentes métodos de inoculação, verificaram que a coinoculação no caupi com estirpes de *Bradyrhizobium* sp. (BR 2001) e *Paenibacillus polymyxa* (Loutit L) introduzidas no solo proporciona aumentos nas concentrações de cálcio, ferro e fósforo na parte aérea das plantas.

1.3. Contribuição dos rizóbios como promotores de crescimento e mediadores de nutrientes

Segundo Dakora (2003), as maiores contribuições feitas separadamente por leguminosas e seus microssimbiontes que não estão relacionadas com a fixação de N_2 nos nódulos da raiz têm sido ignoradas. O rizóbio produz moléculas químicas que podem influenciar o desenvolvimento das plantas, incluindo fito-hormônios, fator Nod, lumicroma, riboflavina e evolução do H_2 por nitrogenase (Tabela 1). Quando presente no solo, o fator Nod pode estimular as leguminosas e não leguminosas por diferentes formas.

Os sinais moleculares excretados pelas raízes da planta hospedeira ativam a expressão dos genes de nodulação, pelo rizóbio, resultando na produção de fatores Nod (SUGAWARA et al., 2006). Além disso, têm sido verificados sinais hormonais da planta (sinais endógenos) que também são importantes para o estabelecimento da simbiose (HIRSCH et al., 1997). Os fatores Nod são responsáveis, em baixa concentração, pela síntese de proteínas denominadas nodulinas, que desempenham papel importante na formação e manutenção do nódulo radicular (ALMARAZ et al., 2007). O rizóbio é conhecido por formar nódulos em leguminosas pela simbiose (micro e macrossimbionte), além de suprimir a população de patógenos no solo.

Tabela 1. Moléculas de rizóbios com potencial para promoção de crescimento em sistema de cultivo.

Composto rizobiano	Papel funcional	Referência
Fator Nod (Nod factor)	Estimula a germinação das sementes Promove o desenvolvimento das plântulas Aumenta a taxa de fotossíntese foliar Induz a expressão dos genes flavonoides Estimula a colonização da raiz por fungo micorrízico arbuscular Causa divisão das células e embriogênese	Zhang e Smith (2001) Smith et al. (2002) Smith et al. (2002) Spaink e Lugtenberg (1991) Xie et al. (1995) Spaink (1996)
Lumicroma (Lumichrome)	Estimula o desenvolvimento das plântulas Estimula a produção de CO ₂ nas raízes	Phillips et al. (1999)
Riboflavina (Riboflavin)	Serve de vitaminas para plantas e bactéria	West e Wilson (1938)
Evolução do H ₂ por nitrogenase	Promove populações microbianas no solo Estimula a diversidade de fauna no solo Aumenta o C no solo	Dong e Layzell (2001)

Fonte: adaptado por Dakora (2003).

2. Identificação e caracterização de bactérias endofíticas promotoras do crescimento de plantas

2.1. Identificação de BPCPs

Os microrganismos apresentam imensa diversidade genética e desempenham funções únicas e cruciais na manutenção de ecossistemas, como componentes fundamentais de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos (MYERS, 1996). Apesar de sua grande importância, o número de grupos microbianos conhecidos e descritos (diversidade de espécies) representa apenas pequena fração da diversidade microbiana encontrada na natureza (AZEVEDO, 1998; PACE, 1997). Dados derivados de estudos comparativos apontam para o fato de que apenas uma pequena fração dos microrganismos na natureza (entre < 0,1% e 1%, dependendo do habitat) é cultivada por meio do emprego de métodos microbiológicos convencionais (AMANN et al., 1995). Um grande número de fatores pode ser apontado para a dificuldade no cultivo de microrganismos em condições de laboratório, incluindo o pouco conhecimento sobre seus requisitos nutricionais e a biologia de organismos presentes em diferentes amostras ambientais.

Nesse contexto, o habitat associado à planta é um ambiente dinâmico no qual muitos fatores, tais como mudanças sazonais, tecidos vegetais (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; MOCALI et al., 2003), cultivares e espécies de plantas, tipos de solo (DALMASTRI et al., 1999; FROMIN et al., 2001; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2005; TORRES et al., 2008) e interação com outros microrganismos benéficos ou patogênicos (ARAÚJO et al., 2001, 2002a), podem afetar a estrutura e composição de espécies das comunidades bacterianas que colonizam os tecidos das plantas, como as BPCPs.

A preservação da diversidade microbiana concentra-se, atualmente, em instituições que mantêm coleções de culturas disponíveis à comunidade científica, como *American Type Culture Collection* (ATCC) nos Estados Unidos da América, *Belgian Coordinated Collections of Microorganisms* (BCCM) na Bélgica, *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* (DSMZ) na Alemanha, *Embrapa Agrobiologia Diazotrophic Microbial Culture Collection* (Embrapa) no Brasil e *Japan Collection of Microorganisms* (JCM) no Japão¹. Esses institutos também são os principais responsáveis pela identificação e classificação bacteriana, incluindo os isolados obtidos do ambiente em grupos já definidos ou em novas taxa.

A identificação/classificação clássica de bactérias é baseada principalmente nas características morfológicas e bioquímicas de cada espécie. Dessa forma, a identificação bacteriana, geralmente, tem início com a separação dos grupos em Gram positivo ou Gram negativo. Para tanto, realiza-se a coloração de Gram. Após isso, as bactérias Gram negativas devem ser submetidas ao teste de O/F (oxidação fermentação de glicose). Nesse ponto, bactérias fermentadoras devem ser submetidas a testes específicos de fermentação de açúcares enquanto que as não fermentadoras devem ser submetidas a outros testes bioquímicos (ARAÚJO et al., 2002b; HOLT et al., 1994). A morfologia e o arranjo celular também devem ser considerados.

A evolução das metodologias de biologia molecular aplicadas ao estudo do meio ambiente tem contribuído significativamente para um grande avanço do conhecimento sobre a diversidade microbiana. Resultados de estudos independentes de isolamento e cultivo,

¹ Acesso a coleções de cultura no mundo. Disponível em: <<http://wdcm.nig.ac.jp/hpcc.html>>.

baseados em amplificação e sequenciamento de fragmentos dos genes de rRNA 16S (rDNA 16S), demonstraram que a diversidade de microrganismos em amostras ambientais é vasta (HEAD et al., 1998; HUNTER-CEVERA, 1998). A aplicação dessas metodologias na identificação de bactérias tem permitido a descoberta de um número extenso de novas linhas evolutivas nesse grupo. Métodos independentes de cultivo tendem a complementar os métodos baseados em isolamento e cultivo para a realização de levantamentos e comparações da composição, diversidade e estrutura de comunidades microbianas (ANDREOTE et al., 2009; HUGENHOLTZ; PACE, 1996; HUGENHOLTZ et al., 1998; RANJARD et al., 2000).

Nesse contexto, a aplicação de técnicas baseadas em ácidos nucleicos tem auxiliado muitos estudos de diversidade microbiana (COSKUNER, 2002; ELSAS et al., 1998; MUYZER; SMALLA, 1998; RANJARD et al., 2000). Existe um grande número de técnicas que revelam polimorfismo de DNA, sendo importante considerar o tipo de organismo em estudo.

2.2. Caracterização morfológica e bioquímica de BPCPs

A caracterização morfológica de BPCPs tem início com a observação do comportamento das colônias em meio de cultura sólido. Para tanto, diferentes aspectos são observados, como, cor da colônia, tempo de crescimento (rápido, médio ou lento), aspecto (liso, rugoso, cremoso, seco, brilhante), borda (regular ou irregular), produção de pigmento, dentre outros. Entretanto, é importante ressaltar que o comportamento morfológico de uma determinada espécie bacteriana é variável de acordo com as condições ambientais (temperatura, tensão de oxigênio, etc.) e nutricionais (concentração de sais, fonte de carbono, etc.) às quais é submetida.

Ainda considerando a caracterização morfológica das BPCPs, a microscopia é uma ferramenta muito importante. Além da microscopia ótica, largamente utilizada para classificação das bactérias em Gram positiva ou Gram negativa, como citado anteriormente, e para outros testes, a microscopia eletrônica de varredura e de transmissão tem permitido grandes avanços no estudo da interação bactéria-planta.

O equipamento utilizado permite localizar e caracterizar o microrganismo dentro do organismo superior ou aderido externamente. O modo de penetração ou adesão, a colonização do hospedeiro e as alterações mutuamente induzidas são outros aspectos caracterizados (JAMES; OLIVARES, 1997; NOGUEIRA; BARROSO, 1998).

Nos estudos de bactérias endofíticas, a microscopia eletrônica é um poderoso instrumento para reconhecer e localizar as bactérias em tecidos vegetais. A microscopia eletrônica de varredura convencional (MEV) tem sido satisfatoriamente usada para detectar bactérias endofíticas em várias plantas, como milho, trigo, arroz e cana-de-açúcar (JAMES; OLIVARES, 1997; QUADT-HALLMANN et al., 1997; REINHOLD-HUREK; HUREK, 1998).

2.2.1. Inoculação de BPCPs em plantas hospedeiras

As sementes da planta hospedeira devem ser lavadas em álcool (70%) por 1 minuto, desinfetadas em solução de hipoclorito de sódio (2% de Cl⁻ disponível) suplementado com Tween 20 (1 mL/L) por 10 minutos (otimizar tempo para diferentes vegetais), enxaguadas novamente em álcool (70%) e, posteriormente, lavadas três vezes em água destilada e esterilizada para a retirada do excesso de bactérias e para que permaneçam apenas as que estiverem agregadas às sementes. A água da última lavagem deve ser distribuída em meio de cultura rico em nutrientes, como controle do processo de esterilização.

Após a desinfecção superficial, as sementes devem ser incubadas em câmara úmida por 24 horas e posteriormente colocadas numa suspensão bacteriana (10^6 UFC/mL– 10^7 UFC/mL) em tampão fosfato e agitadas a 150 rpm por 18 horas. Depois as sementes devem ser enxaguadas com tampão fosfato salino (Phosphate Buffered Saline – PBS: 1,44 g/L Na₂HPO₄; 0,24 g/L KH₂PO₄; 0,20 g/L KCl; 8,00 g/L NaCl; pH 7,4) e reincubadas em câmara úmida por 24 horas para germinarem. Transcorrido o período, as sementes devem ser transferidas para tubos contendo meio MS (MURASHIGUE; SKOOG, 1962), e, após 15 dias, as amostras devem ser preparadas para a microscopia eletrônica.

O mesmo procedimento deve ser realizado para o material a ser analisado como controle, excetuando-se a etapa de inoculação de bactérias.

Composição do MS (MURASHIGUE; SKOOG, 1962) por litro: NH_4NO_3 1.650 mg; KNO_3 1.900 mg; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 440 mg; KH_2PO_4 170 mg; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 370 mg; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22,3 mg; H_3BO_3 6,2 mg; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,025 mg; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,025 mg; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,25 mg; KI 0,83 mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8,6 mg; Tiamina-HCl 0,1 mg; Ácido Nicotínico 0,5 mg; Piridoxina-HCl 0,5 mg; Glicina 2,0 mg; Inositol 100,0 mg; Ágar 1,8 g. pH 7,0–7,2.

2.2.2. Preparo das amostras para microscopia eletrônica por varredura (MEV)

Pequenos fragmentos (em torno de 2 cm x 2 cm) de diferentes tecidos vegetais devem ser seccionados, com o auxílio de estilete estéril. Esses devem ser fixados em solução de Karnovsky (glutaraldeído 2,5%; formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05 M; pH 7,2; CaCl_2 0,001 M) por 1 hora. Em seguida, realiza-se a lavagem em tampão cacodilato 0,05 M por 3 vezes durante 10 minutos cada. A pós-fixação deve ser feita com OsO_4 1% (em tampão cacodilato 0,05 M; pH 7,2) por 1 hora. Depois as amostras devem ser lavadas em água destilada por 5 vezes, e, então, realiza-se a desidratação numa série crescente (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) de acetona, 10 minutos em cada etapa, sendo que a de 100% deve ser realizada três vezes. Depois as amostras devem ser secas ao ponto crítico e metalizadas com ouro. Depois de metalizadas, as amostras devem ser montadas em suportes especiais (*stubs*) e observadas em microscópio eletrônico de varredura (KITAJIMA; LEITE, 1999).

2.2.3. Testes para caracterização bioquímica

Em relação à caracterização bioquímica, existem vários testes a serem utilizados, como o EPM (ácido e gás de glicose, urease, H_2S , L-triptofano desaminase), Mili (motilidade, indol – lisina), utilização de citrato, utilização de diferentes fontes de carbono, hidrólise do amido, oxidase, produção de indol, redução de nitrato a nitrito (ARAÚJO et al., 2002b). Atualmente, existem diversos kits comerciais para identificação bacteriana com bases em características bioquímicas, tornando-se uma análise rápida e barata. Contudo, esses kits geralmente são específicos para alguns grupos bacterianos. Dentre os

mais utilizados estão: sistemas API (*Appareils et Procédés d'Identification, bio Mérieux*); *Biolog Nutritional System* (testa a habilidade de uma bactéria em oxidar 95 diferentes fontes de carbono pré-selecionadas); Enterotubos e Micro ID System (identificação de bactérias da família *Enterobacteriaceae*).

2.3. Caracterização fisiológica de BPCPs

A caracterização fisiológica de BPCPs testa a capacidade do isolado bacteriano em relação a características envolvidas com a promoção de crescimento de plantas, como fixação de nitrogênio, produção de fito-hormônios e disponibilização de nutrientes.

2.3.1. Seleção de bactérias com capacidade de fixar N₂

A metodologia inicial, e mais comumente empregada, para a seleção de bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico é pelo cultivo em meio livre de fonte de nitrogênio. Existem meios apropriados para diferentes grupos bacterianos, mas o mais comum é o meio de cultura NFb [5 g/L de ácido málico; 0,5 g/L de K₂HPO₄; 0,2 g/L de MgSO₄.7H₂O; 0,1 g/L de NaCl; 0,01 g/L de CaCl₂.2H₂O; 4 mL/L de Fe.Edta (solução 1,64%); 2 mL/L de azul de bromotimol (0,5%); 2 mL/L de solução de micronutrientes (0,2 g/L de Na₂MoO₄.2H₂O; 0,235 g/L de MnSO₄.H₂O; 0,28 g/L de H₃BO₃; 0,008 g/L de CuSO₄.5H₂O); 1,75 g/L de ágar; pH 6,8]. Nesse caso, após o período de incubação, o resultado positivo é caracterizado pela presença de um halo de crescimento no interior do meio de cultura (DÖBEREINER et al., 1995).

2.3.2. Seleção de bactérias produtoras de fito-hormônios do tipo auxina

A detecção de auxinas pode ser realizada por um método mais preciso e quantitativo, como a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) ou por uma reação colorimétrica específica e sensível na qual utiliza-se o reagente de Salkowski, porém menos precisa quantitativamente (CROZIER et al., 1988; EHMANN, 1977). Existem diferentes metodologias que utilizam o reagente de Salkowski, algumas

utilizam microplacas, outras, membranas de nitrocelulose (BRIC et al., 1991; SARWAR; KREMER, 1995).

Resumidamente, inocula-se o isolado bacteriano em meio de cultura acrescido de 5 mM de L-triptofano, incuba-se sob agitação e na ausência de luz por tempo e temperatura adequados a cada espécie avaliada, e, após o cultivo, acrescenta-se o reagente de Salkowski (2% de FeCl_3 0,5 M em 35% de ácido perclórico). A reação será positiva quando o resultado expressar a coloração rosa, indicando a produção de auxina. Mais informações sobre auxinas estão descritas no capítulo 2 da parte 4.

2.3.3. Seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico

As bactérias solubilizadoras de fosfato dissolvem o fosfato insolúvel pela produção de ácidos orgânicos e inorgânicos e/ou pela diminuição do pH; conseqüentemente, ocorre a produção de fosfato disponível que pode ser capturado pelas plantas (NAUTIYAL, 1999; VASSILEV; VASSILEVA, 2003; VAZQUEZ et al., 2000).

Para a bioprospecção dessas bactérias, utiliza-se meio de cultura sólido contendo fosfato insolúvel (10 g/L de glicose; 5 g/L de NH_4Cl ; 1 g/L de NaCl ; 1 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,8 g/L de Ca_3HPO_4 ; 15 g/L de ágar; pH 7,2), tendo como resultado positivo a formação de um halo claro em torno da colônia, indicando, assim, a solubilização do fosfato.

3. *Streptomyces* promotores de crescimento em plantas

As plantas compreendem um microecossistema complexo, composto por diferentes habitats que podem ser colonizados simultaneamente por uma grande diversidade de microrganismos endofíticos e epifíticos (CHELIUS; TRIPLETT, 2001; LODEWYCKX et al., 2002). Essa população microbiana é essencial para o desenvolvimento das plantas uma vez que facilita a absorção de nutrientes ao mesmo tempo em que protege a planta contra fitopatógenos.

Dentro dessa diversidade microbiana, merecem destaque as actinobactérias, particularmente espécies de *Streptomyces* como os

endófitos e os da rizosfera que influenciam o crescimento da planta, além de funcionar como agentes biocontroladores protegendo a planta por diversos mecanismos (BLOEMBERG; LUGTENBERG, 2001; LODWYCKX et al., 2002).

Na rizosfera, os mecanismos desses agentes biocontroladores são antibiose, que envolve a produção de metabólitos secundários impedindo que o patógeno colonize a rizosfera e estabeleça doenças, e micoparasitismo, que ocorre pela destruição física da parede celular do fungo por meio da ação de enzimas hidrolíticas, produzidas pelo agente biocontrolador (ADAMS, 1990; DOUMBOU et al., 2001).

A colonização da rizosfera é determinada por uma série de fatores que varia de acordo com a planta, microrganismos e meio ambiente (RAMAMOORTHY et al., 2001). As actinobactérias endofíticas colonizam o tecido da planta obtendo nutrição e proteção da planta hospedeira sem causar sintomas de doença, ao mesmo tempo em que produzem uma grande variedade de metabólitos que estimulam o crescimento da planta. Essa associação é complexa e provavelmente ocorre variação de hospedeiro para hospedeiro e de microrganismo para microrganismo (HASEGAWA et al., 2006; OWEN; HUNDLEY, 2005). Todas as plantas examinadas mostram a ocorrência de actinobactérias endofíticas principalmente na raiz, indicando que essa associação é comum na natureza (HASEGAWA et al., 2006).

3.1. Atividade antagônica

O estímulo do crescimento da planta por actinobactéria endofítica pode ser influenciado pela produção de fito-hormônio ou pelo biocontrole de fitopatógenos por meio da produção de antibióticos, sideróforos, pela competição por nutrientes e indução de resistência a doenças (IGARASHI et al., 2002a, 2002b).

Tem sido documentado que algumas actinobactérias endofíticas apresentam atividade antagonista para alguns patógenos como *Pythium* spp., *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani*, entre outros. Cao et al. (2004) isolaram *Streptomyces* endofíticos de raízes de tomate (*Lycopersicon esculentum*) e observaram que 65% dos isolados inibiram o crescimento de *Rhizoctonia solani*, e entre esses isolados a linhagem de *Streptomyces* sp. S30 que apresentou atividade in

vitro e in vivo para esse fitopatógeno, indicando o seu potencial como agente de biocontrole. Taechowisan et al. (2003) também isolaram 330 actinobactérias endofíticas de 36 espécies de plantas herbáceas e lenhosas da Tailândia, das quais 10% apresentaram atividade para *Colletotrichum musae* e *Fusarium oxysporum*.

Pesquisas sobre a produção de fito-hormônio por *Streptomyces* endofíticos também têm sido realizadas mostrando o benefício dessa comunidade microbiana para o crescimento da planta. Ácido piterídico, substância similar à auxina, foi extraído de *S. higroscópicos* TP-A045, endófito da planta *Pteridium aquilinum*, e mostrou que, na concentração de 1 μ M, esse composto acelerou a formação e o crescimento das raízes em cultura de tecido de feijão tão efetivamente quanto o ácido indol acético (IGARASHI et al., 2002b). Igualmente Meguro et al. (2006) também relataram que o endófito *Streptomyces* sp. MBR-52 acelerou a emergência e o alongamento de raízes em cultura de tecido da planta ornamental *Rhododendron* indicando que essa linhagem produz algum tipo de fito-hormônio.

3.2. Isolamento de actinobactérias endofíticas

Microrganismos endofíticos podem ser observados por microscopia ótica ou eletrônica, mas sua identificação in vivo é difícil. Entretanto muitas pesquisas são realizadas, e diferentes tecidos vegetais passam por processos de desinfecção para eliminação dos epifíticos, e os endofíticos são isolados em diferentes meios de cultura e condições controladas, possibilitando a avaliação do seu potencial biológico in vitro (ARAÚJO et al., 2002b; OWEN; HUNDLEY, 2005).

A técnica de isolamento de actinobactérias endofíticas descrita abaixo está de acordo com Araújo et al. (2002b).

- a) Coletar as amostras de folhas, ramos ou raízes, tendo o cuidado de verificar que folhas e ramos não entrem em contato com o solo. Acondicionar cada amostra em sacos plásticos individuais, identificados, e transportar para o laboratório em baixa temperatura (isopor com gelo). O material pode ser armazenado em câmara fria (4 °C) durante 72 horas.
- b) No laboratório o material será separado e lavado com água corrente para eliminar resíduos de poeira. Em seguida raízes

- e caule são cortados em fragmentos de 10 cm para proceder a desinfecção.
- c) Em câmara de fluxo laminar, desinfetar cada amostra com álcool a 70% por 1 minuto, e em seguida transferir para solução de hipoclorito de sódio (2,6%) durante 5 minutos, e novamente tratar com álcool a 70% por 30 segundos. A seguir, lavar a amostra com água destilada esterilizada por duas vezes e avaliar a eficiência da desinfecção, plaqueando alíquotas da última água de lavagem nos meios sólidos utilizados para o isolamento dos endofíticos. Esse plaqueamento tem como finalidade comprovar se todos os epifíticos foram eliminados após a desinfecção.
 - d) Utilizando um estilete esterilizado cortar de 1,0 mm a 2,0 mm das bordas das folhas e as extremidades das raízes, e em seguida colocar de 8 a 10 fragmentos com 0,5 cm² das folhas e de 8 a 10 fragmentos de 5,0 mm das raízes na superfície de cada placa de Petri (ARAÚJO et al., 2001; PEREIRA et al., 1993) contendo os meios Arginina Glicerol Ágar (EL-NAKEEB; LECHEVALIER, 1963) e Caseína Amido Ágar (KUSTER; WILLIAMS, 1964) com ciclohexamida e nistatina na concentração de 100 µg/mL.
 - e) Cultivar as placas, durante 30 dias, a 28 °C–30 °C, para observar crescimento de colônias de *Streptomyces* que emergem dos fragmentos e apresentam crescimento muito lento.
 - f) Após o isolamento, calcular a frequência de isolamento-FI, dividindo o número de fragmentos que apresentou crescimento de colônias de *Streptomyces* pelo número total de fragmentos analisados e em seguida multiplicar por 100.

3.3. Isolamento de actinobactérias do solo

As actinobactérias, e em especial o gênero *Streptomyces*, ocorrem em diversos habitats, entretanto o solo é o maior reservatório dessas bactérias filamentosas, saprofíticas, que no solo, decompõem a matéria orgânica, especialmente polímeros como amido, lignocelulose e quitina que favorecem o desenvolvimento da população microbiana (SRINIVASAN et al., 1991; ZIMMERMAN, 1990).

Em áreas cultivadas, o número de *Streptomyces* pode conter aproximadamente 10^7 unidade formadora de colônia (UFC) por grama de solo, enquanto *Micromonospora* varia de 10^4 UFC/g a 10^5 UFC/g; entretanto, em menor frequência, outros gêneros de actinobactérias podem ocorrer (HUNTER et al., 1981; KIESER et al., 2000). A quantidade e o tipo das bactérias filamentosas Gram positivas são influenciados por vários fatores, como: temperatura, pH e outros atributos do solo, bem como o conteúdo da matéria orgânica, umidade e aeração (DAVIES; WILLIAMS, 1970; LABEDA; SHEARER, 1990). Várias pesquisas mostram que as actinobactérias são qualitativa e quantitativamente importantes na rizosfera, podendo influenciar o crescimento das plantas, além de proteger contra a invasão por fungos patogênicos radiculares (AGHIGHI et al., 2004; GETHA; VIKINESWARY, 2002).

3.3.1. Pré-tratamento

Em geral as bactérias filamentosas apresentam um crescimento muito lento durante o seu isolamento em meio de cultura sólido. Por isso se faz necessário eliminar microrganismos indesejáveis como as bactérias que são numericamente 10 vezes maiores que *Streptomyces*, e o pré-tratamento da amostra por aquecimento a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 2 horas, ou $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 10 minutos, elimina principalmente bactérias Gram negativas que crescem rapidamente (LABEDA; SHEARER, 1990). Outro pré-tratamento é a ativação dos esporos de actinobactérias que é importante no isolamento de bactérias filamentosas Gram positivas. Nessa técnica a suspensão do solo é tratada com uma solução de extrato de levedura (6,0%) mais dodecilsulfato de sódio – (SDS) (0,05%), a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 minutos, seguida da diluição seriada em água destilada esterilizada e plaqueamento em meio sólido seletivo (NONOMURA; HAYAKAWA, 1992). Existem vários pré-tratamentos que podem ser realizados visando a um gênero específico como relatado por Araújo (1998).

Para a determinação da diversidade de microrganismo cultivável no solo, a técnica do isolamento e quantificação em placa ainda é a mais indicada. Alguns métodos podem medir a função microbiana por meio da determinação da velocidade do processo metabólico, mas não é possível identificar a espécie microbiana (NANNIPIERI et al., 2003).

3.3.2. Isolamento pela técnica de diluição

Pesar assepticamente amostra do solo (10 g) e adicionar 90 mL de tampão fosfato (PBS) ou soro fisiológico esterilizado, colocar em agitação (150 rpm/10 minutos) e realizar diluição seriada. Das diluições 10^3 a 10^6 retirar 0,1 mL e colocar na superfície de cada placa contendo 20 mL do meio Caseína Amido Ágar-CAA (KUSTER; WILLIAMS, 1964) e/ou Ácido Húmico Ágar (NONOMURA; HAYAKAWA, 1992), e em seguida espalhar com alça de Drigalski. As placas devem ser cultivadas em estufa BOD à temperatura de 28 °C a 30 °C, durante 15 a 20 dias.

Composição do meio Caseína Amido Ágar-CAA (KUSTER; WILLIAMS, 1964): Amido solúvel 10,0 g; KNO_3 2,0 g; Caseína 0,3 g; K_2HPO_4 2,0 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05 g; NaCl 2,0 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g; CaCO_3 0,02 g; Ágar 20,0 g. pH 7,0–7,2.

Composição do meio Ácido Húmico Ágar (NONOMURA; HAYAKAWA, 1992): Ácido Húmico 1 g dissolvido em NaOH 0,2 M; Na_2HPO_4 0,5 g; KCl 1,7 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g; CaCO_3 0,01 g; vitamina B 10 mg; Ágar 18 g. pH 7,2.

Composição do meio Arginina-Glicerol Ágar (EL-NAKEEB; LECHEVALIER, 1963): Arginina-HCl 1,0 g; Glicerol 12,5 g; K_2HPO_4 1,0 g; NaCl 1,0 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g; $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,1 mg; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,0 mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,0 mg; Ágar 15,0 g. pH 6,9–7,1.

4. Atividade antimicrobiana

Para avaliação da atividade antifúngica e antibacteriana de *Streptomyces*, a metodologia mais simples é a seleção primária por meio do ensaio com blocos de gelos e segundo metodologia de Ichikawa et al. (1971).

- a) A partir de culturas de *Streptomyces* isoladas e cultivadas em tubos inclinados preparar suspensão de esporos em 2,0 mL de soro fisiológico esterilizado, contendo 0,1% de Tween 80, agitar o tubo em vortex e adicionar 0,1 mL dessa suspensão a cada placa de Petri contendo 15 mL dos meios Caseína Amido Ágar (CAA) e ISP2 (SHIRLING; GOTTLIEB,

- 1966). Em seguida, espalhar a suspensão com alça Drigalski sobre toda a superfície das placas, que devem ser cultivadas em BOD a 28 °C–30 °C durante 7 dias para observar o crescimento em forma de tapete.
- b) Para o ensaio antifúngico usar culturas de *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* ou outros fungos que se deseja testar. Preparar a suspensão de esporos e inocular como no item anterior usando placas com 15 mL de meio Sabouraud Ágar ou Batata Dextrose Ágar.
 - c) No ensaio antibacteriano utilizar linhagens de bactérias Gram positivas como *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* e Gram negativa como *Escherichia coli* com 24 horas de cultivo a 37 °C. Preparar as suspensões das bactérias com densidade 0,5 da escala de McFarland, segundo Kirby et al. (1966) e inocular como no item anterior em placas contendo 10 mL do meio TSA (Tryptona Soja Ágar) ou o meio Muller Hintton Ágar.
 - d) Após o crescimento dos *Streptomyces* (item a) serão feitos blocos de gelos e circulares, utilizando um furador de rolha (diâmetro de 6 mm) esterilizado em álcool e flambado. Cada bloco será transferido para as placas já inoculadas (item b e item c) levadas para estufa BOD a 37 °C para as bactérias, durante 24 horas, enquanto os fungos serão cultivados a 28 °C–30 °C, durante 72 horas–96 horas. Após esses períodos serão observados os halos de inibição os quais serão medidos em mm com auxílio de uma régua.

5. Considerações finais

Os benefícios dos processos ecológicos desempenhados por microrganismos por meio das bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCPs) têm contribuído para alcançar a sustentabilidade no setor do agronegócio. A tecnologia de inoculação de bactérias de interesse biotecnológico na agricultura é um recurso de grande importância econômica, além do que pode contribuir para reduzir o uso e consequente impacto dos agroquímicos.

A agricultura sustentável requer a utilização de estratégias que permitam o aumento da produtividade sem o prejuízo do meio ambiente, abrindo novas perspectivas para contribuir no desenvolvimento de novas tecnologias, métodos e estratégias na agroindústria. Os processos mediados pelos microrganismos tornam-se essenciais na preservação e na conservação dos recursos naturais.

6. Referências

- ADAMS, P. B. The potential of mycoparasites for biological control of plant diseases. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 28, p. 59-72, 1990.
- AGHIGHI, S. G. H.; BONJAR, S.; SAADOUN, I. First report of antifungal properties of a new strain of *Streptomyces plicatus* (strain 101) against four Iranian phytopathogenic isolates of *Verticillium dahliae*, a new horizon in biocontrol agents. **Biotechnology**, Faisalabad, v. 3, n. 1, p. 90-97, 2004.
- ALMARAZ, J. J.; ZHOU, X.; SOULEIMANOV, A.; SMITH, D. Gas exchange characteristics and dry matter accumulation of soybean treated with Nod factors. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 164, p. 1391-1393, 2007.
- AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology Review**, Washington, DC, v. 59, n. 1, p. 143-169, 1995.
- ANDREOTE, F. D.; CARNEIRO, R. T.; SALLES, J. F.; MARCON, J.; LABATE, C. A.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Culture-independent assessment of Rhizobiales-related Alphaproteobacteria and the diversity of *Methylobacterium* in the rhizosphere and rhizoplane of transgenic eucalyptus. **Microbiology Ecology**, New York, v. 57, n. 1, p. 82-93, 2009.
- ARAÚJO, F. B.; HUNGRIA, M. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum* / *Bradyrhizobium elkanii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 34, n. 9, p. 1633-1643, 1999.
- ARAÚJO, J. M. Estratégias para isolamento seletivo de actinomicetos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPNA, 1998. p. 351-367.
- ARAÚJO, W. L.; MACCHERONI, W.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; BARROSO, P. A. V.; SARIDAKIS, H. O.; AZEVEDO, J. L. Variability and interaction between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, CA, v. 47, n. 3, p. 229-236, 2001.

ARAÚJO, W. L.; MARCON, J.; MACCHERONI JUNIOR, W.; ELSAS, J. D. van; VUURDE, J. W. L. van; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 68, p. 4906-4914, 2002a.

ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S.; MARCON, J.; KUKLINSKY-SOBRA, J.; LACAVA, P. T. **Manual**: isolamento de microrganismos endofíticos. Piracicaba: CALQ, 2002b. 86 p.

AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPNA, 1998. p. 117-137.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 77, n. 3, p. 549-579, 2005.

BLOEMBERG, G. V.; LUGTENBERG, B. J. J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 4, p. 343-350, 2001.

BRIC, J. M.; BOSTOCK, R. M.; SILVERSTONE, S. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 57, p. 535-538, 1991.

CAMACHO, M.; SANTAMARIA, C.; TEMPRANO, F.; DAZA, A. Co-inoculation with *Bacillus sp.* CECT 450 improves nodulation in *Phaseolus vulgaris* L. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, CA, v. 47, p. 1058-1062, 2001.

CAO, L.; QUI, Z.; YOU, J.; TAN, H.; ZHOU, S. Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 39, p. 425-430, 2004.

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

CHELIUS, M. K.; TRIPLETT, E. W. The diversity of Archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. **Microbial Ecology**, New York, v. 41, n. 3, p. 252-263, 2001.

CHEN, C.; BAUSKE, E. M.; MUSSON, G.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; KLOPPER, J. W. Biological control of *Fusarium* wilt on cotton by use of endophytic bacteria. **Biological Control**, San Diego, v. 5, p. 83-91, 1995.

COOPER, J. B.; LONG, S. R. Morphogenetic rescue of *Rhizobium-melliloti* nodulation mutants by trans-zeatin secretion. **Plant Cell**, Rockville, v. 6, p. 215-225, 1994.

DONATE-CORREA, J.; LEON-BARRIOS, M.; PEREZ-GALDONA, R. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria in *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste), a forage tree-shrub legume endemic to the Canary Islands. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 266, n. 1-2, p. 261-272, 2004.

COSKUNER, G. A new molecular technique for the identification of micro-organisms in biological treatment plants: fluorescent *in situ* hybridization. **Turkey Journal of Biology**, Ankara, v. 26, p. 57-63, 2002.

CREWS, T. E.; BROCKWELL, J.; PEOPLES, M. B. Host-rhizobia interaction for effective inoculation: evaluation of the potential use of the ureide assay to monitor the symbiotic performance of tepary bean (*Phaseolus acutifolius* A. Gray). **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 36, n. 8, p. 1223-1228, 2004.

CROZIER, A.; ARRUDA, P.; JASMIM, J. M.; MONTEIRO, A. M.; SANDBERG, G. Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasiliense*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 54, p. 2833-2837, 1988.

DAKORA, F. D. Defining new roles for plant and rhizobial molecules in sole and mixed plant cultures involving symbiotic legumes. **New Phytologist**, Oxford, v. 158, p. 39-49, 2003.

DALMASTRI, C.; CHIARINI, L.; CANTALE, C.; BEVIVINO, A.; TABACCHIONO, S. Soil type and maize cultivar affect the genetic diversity of maize root-associated *Burkholderia cepacia* populations. **Microbial Ecology**, New York, v. 38, p. 273-284, 1999.

DAVIES, F. L.; WILLIAMS, S. T. Studies on the ecology of actinomycetes in soil: I. the occurrence and distribution of actinomycetes in a pine forest soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 2, n. 4, p. 227-238, 1970.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI, 1995. 60 p.

DOUMBOU, C. L.; SALOVE, M. K. H.; CRAWFORD, D. L.; BEAULIEU, C. Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and promote plant growth. **Phytoprotection**, Quebec, v. 82, p. 85-102, 2001.

EHMANN, A. The van urk-Salkowski reagent: a sensitive and specific chromogenic reagent for silica gel thin-layer chromatographic detection and

identification of indole derivatives. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, NL, v. 132, n. 2, p. 267-276, 1977.

EL-NAKEEB, M. A.; LECHEVALIER, H. A. Selective isolation of aerobic actinomycetes. **Applied Microbiology**, Washington, DC, v. 11, p. 75-77, 1963.

FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; MARTINEZ, C. R.; CHANWAY, C. P. Drought stress response on some key enzymes of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) nodule metabolism. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v. 23, n. 2, p. 187-193, 2007.

FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; MARTINEZ, C. R.; CHANWAY, C. P. Alleviation of water stress effects in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation *Paenibacillus* x *Rhizobium tropici*. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, NL, v. 40, p. 182-188, 2008.

FROMIN, N.; ACHOUAK, W.; THIERY, J. M.; HEULIN, T. The genotypic diversity of *Pseudomonas brassicacearum* populations isolated from roots of *Arabidopsis thaliana*: influence of plant genotype. **FEMS Microbiology Ecology**, Haren, v. 37, p. 21-29, 2001.

GETHA, K.; VIKINESWARY, S. Antagonistic effects of *Streptomyces violaceusniger* strain G10 on *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense race 4: Indirect evidence for the role of antibiosis in the antagonistic process. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Amsterdam, NL, v. 28, n. 6, p. 303-310, 2002.

HALVERSON, L. J.; HANDELSMAN, J. Enhancement of soybean nodulation by *Bacillus cereus* UW85 in the field and in a growth chamber. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 57, p. 2767-2770, 1991.

HAN, J.; SUN, L.; DONG, X.; CAI, Z.; SUN, X.; YANG, H.; WANG, Y.; SONG, W. Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various pathogens. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 28, p. 66-76, 2005.

HASEGAWA, S.; MEGURO, A.; SHIMIZU, M.; NISHIMURA, T.; KUNOH, H. Endophytic actinomycetes and their interactions with host plants. **Actinomycetologica**, Tokyo, JP, v. 20, p. 72-81, 2006.

HEAD, I. M.; SAUNDERS, J. R.; PICKUP, R. W. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganism. **Microbial Ecology**, New York, v. 35, p. 1-21, 1998.

HIRSCH, A. M.; FANG, Y.; ASSAD, S.; KAPULNIK, Y. The role of phytohormones in plant microbe symbioses. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 194, p. 171-184, 1997.

HOLT, J. G.; KREIG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787 p.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B. M.; PACE, N. R. Impact of culture independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 180, p. 4765-4774, 1998.

HUGENHOLTZ, P.; PACE, N. R. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, NL, v. 14, p. 190-197, 1996.

HUNTER-CEVERA, J. C. The value of microbial diversity. **Current Opinion Microbiology**, Oxford, v. 1, n. 3, p. 278-285, 1998.

HUNTER, J. C.; EVELEIGH, D. E.; CASELLA, G. Actinomycetes of a salt marsh. In: SCHAAL, K. P.; PULVERER, G. (Ed.). Actinomycetes. **Zentralblatt für Bakteriologie**, Stuttgart, suppl. 11, p. 195-200, 1981.

ICHIKAWA, T.; DATE, M.; ISHIKURA, T.; OZAKI, A. Improvement of Kasugamycin-producing strain by the agar piece method and prototroph method. **Folia Microbiologica**, Prague, CZ, v. 16, p. 218-224, 1971.

IGARASHI, Y.; LIDA, T.; SASAKI, Y.; SAITO, N.; YOSHIDA, R.; FURUMAI, T. Isolation of actinomycetes from live plants and evaluation of antiphytopathogenic activity of their metabolites. **Actinomycetologica**, Tokyo, JP, v. 16, p. 9-13, 2002a.

IGARASHI, Y.; LIDA, T.; YOSHIDA, R.; FURUMAI, T. Pteridic acids A and B, novel plant growth promoters with auxin-like activity from *Streptomyces hygroscopicus* TP-A0451. **Journal of Antibiotics**, Tokyo, JP, v. 55, n. 8, p. 764-767, 2002b.

JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Colchester, v. 17, n. 1, p. 77-119, 1997.

KIESER, T.; BIBB, M. J.; BUTNER, M. J.; CHATER, K. F.; HOPWOOD, D. A. **Practical streptomyces genetics**. Norwich: John Innes Centre, 2000. p. 1-42.

KIRBY, W. M. M.; BAUER, A. W.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotics susceptibility test by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, Philadelphia, v. 45, p. 493-496, 1966.

KITAJIMA, E. W.; LEITE, B. **Curso introdutório de microscopia eletrônica de varredura**. 2. ed. Piracicaba: NAP-MEPA; ESALQ-USP, 1999. 46 p.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, W. L.; MENDES, R.; GERALDI, I. O.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, Parkview Square, v. 6, n. 12, p. 1244-1251, 2004.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, W. L.; MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 273, n. 1-2, p. 91-99, 2005.

KUSTER, E.; WILLIAMS, S. T. Selective media for the isolation of *Streptomyces*. **Nature**, London, UK, v. 202, p. 928-929, 1964.

LABEDA, D. P.; SHEARER, M. C. Isolation of actinomycetes for biotechnological applications. In: LABEDA, D. P. (Ed.). **Isolation of biotechnological organisms from nature**. New York: McGraw-Hill, 1990. p. 1-19.

LACAVA, P. T.; ANDREOTE, F. D.; AZEVEDO, J. L. Metabólitos secundários produzidos por microrganismos endofíticos. In: FIGUEIREDO, M. do V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. de R. e. (Org.). **Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para agricultura**. Guaíba: Agrolivros, 2008. v. 1, p. 211-232.

LAMBRECHT, M.; OKON, Y.; BROEK, A. V.; VANDERLEYDEN, J. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signaling molecule in bacteria-plant interactions. **Trends in Microbiology**, Oxford, v. 8, n. 7, p. 298-300, 2000.

LI, D. M.; ALEXANDER, M. Co-inoculation with antibiotic-producing bacteria to increase colonization and nodulation by rhizobia. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 108, p. 211-219, 1988.

LODEWYCKX, C.; VANGRONSVELD, J.; PORTEOUS, F.; MOORE, E. R. B.; TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M.; LELIE, D. V. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Colchester, v. 21, p. 583-606, 2002.

LUZ, E. W. C. Rizobactérias promotoras de crescimento em plantas e de bioproteção. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 4, p. 1-49, 1996.

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. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 1, p. 89-111, 2004.

MENDES, R.; AZEVEDO, J. L. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 5., 2007, Recife. **Anais...** Recife: Sociedade Brasileira de Micologia, 2007. p. 129-140.

MEGURO, A. Y.; OHMURA, Y.; HASEGAWA, S.; SHIMIZU, M.; NISHIMURA, T.; KUNOH, H. An endophytic actinomycete, *Streptomyces* sp. MBR-52, that accelerates emergence and elongation of plant adventitious roots. **Actinomycetologia**, Tokyo, JP, v. 20, n. 1, p. 1-9, 2006.

MOCALI, S.; BERTELLI, E.; CELLI, F. D.; MENGONI, A.; SFALANGA, A.; VILANI, F.; CACIOTTI, A.; TEGLI, S.; SURICO, G.; FANI, R. Fluctuation of bacteria isolated from elm tissues during different seasons and from different plant organs. **Research in Microbiology**, Paris, FR, v. 154, p. 105-114, 2003.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid grown and biassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, DK, v. 15, p. 473-497, 1962.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, Delft, v. 73, p. 127-141, 1998.

MYERS, N. Environmental services of biodiversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, DC, v. 93, p. 2764-2769, 1996.

NANNIPIERI, P.; ASCHER, J.; CECCHERINI, M. T.; LANDI, L.; PIETRAMELLARA, G.; RENELLA, G. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 54, p. 655-670, 2003.

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

NOGUEIRA, N. L.; BARROSO, P. A. V. Microscopia eletrônica aplicada aos estudos de ecologia microbiana. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. p. 279-307.

NONOMURA, H. J.; HAYAKAWA, M. New methods for the selective isolation of soil actinomycetes. In: OKAMI, Y.; BEPPU, T.; OGAWARA, H. **Biology of actinomycetes**. Tokyo: Japan Scientific Society, 1992. 484 p.

OWEN, N. L.; HUNDLEY, N. Endophytes-the chemical synthesizers inside plants. **Science Progress**, Oxford, v. 87, p. 79-99, 2005.

PACE, N. R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, Washington, DC, v. 276, p. 734-740, 1997.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 29, p. 62-76, 2002.

PEREIRA, J. O.; AZEVEDO, J. L.; PETRINI, O. Endophytic fungi of *Stylosanthes*: a first report. **Muicologia**, New York, v. 85, p. 362-364, 1993.

QUADT-HALLMANN, A.; HALLMANN, J.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant-associated bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, CA, v. 43, p. 254-259, 1997.

RAMAMOORTHY, V.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRAKASAM, V.; SMAIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, Surrey, v. 20, n. 1, p. 1-11, 2001.

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, Paris, FR, v. 151, p. 167-177, 2000.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: identification, localization, and perspectives to study their function. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Colchester, v. 17, p. 29-54, 1998.

REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L.; DÖBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Colchester, v. 3, p. 227-247, 2000.

RENWICK, A. R.; CAMPBELL, R.; COE, S. Assessment of in vivo screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 40, n. 4, p. 524-532, 1991.

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

RODRÍGUEZ-DÍAZ, M.; LOGAN, N. A.; RODELAS, B. *Paenibacillus cineris*, *P. cookii* y *P. wynnii*, três nuevas especies fijadoras de nitrógeno atmosférico originarias de la Antártida: nuevos confines de la fijación biológica de nitrógeno. In: REUNIÓN NACIONAL DE FIJACIÓN DE NITRÓGENO, 10., 2004, Granada. **Libro de Resúmenes...** [Granada: SEFIN; Universidad de Granada; CSIC], 2004.

SARWAR, M.; KREMER, R. J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 20, p. 282-285, 1995.

SELDIN, L. *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio: parte II: microrganismos promotores de crescimento em plantas. In: FIGUEIREDO, M. do V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. de R. e S. **Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para agricultura**. Guaíba: Agrolivros, 2008. v. 1, p. 259-276.

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, DC, v. 16, p. 313-340, 1966.

SILVA, V. N.; SILVA, L. E. S. F.; FIGUEIREDO, M. V. B. Atuação de rizóbios com rizobactérias promotora de crescimento em plantas na cultura do caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp). **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 28, n. 3, p. 407-412, 2006.

SILVA, V. N.; SILVA, L. E. S. F.; MARTINEZ, C. R.; SELDIN, L.; BURITY, H. A.; FIGUEIREDO, M. V. B. Estirpes de *Paenibacillus* promovem a nodulação específica na simbiose *Bradyrhizobium-caupi*. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 29, p. 331-338, 2007.

SINDHU, S. S.; GUPTA, S. K.; SUNEJA, S.; DADARWAL, K. R. Enhancement of green gram nodulation and growth by *Bacillus* species. **Biologia Plantarum**, Prague, CZ, v. 45, n. 1, p. 117-120, 2002.

SRINIVASAN, M.; PETERSEN, D. J.; HOLL, F. B. Influence of indoleacetic-acid-producing *Bacillus* isolates on the nodulation of *Phaseolus vulgaris* by *Rhizobium etli* under gnotobiotic conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, CA, v. 42, p. 1006-1014, 1996.

SRINIVASAN, M. C.; LAXMAN, R. S.; DESPHARDE, M. V. Physiology and nutritional aspects of actinomycetes: an overview. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 7, n. 2, p. 171-184, 1991.

SUGAWARA, M.; OKAZAKI, S.; NUKUI, N.; EZURA, H.; MITSUI, H.; MINAMISAWA, K. Rhizobitoxine modulates plant-microbe interactions by ethylene inhibition. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 24, n. 4, p. 382-388, 2006.

TAECHOWISAN, T.; PEBERDY, J. F.; LUMYONG, S. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 19, p. 381-385, 2003.

TORRES, A. R.; ARAÚJO, W. L.; CURSINO, L.; HUNGRIA, M.; PLOTEGHER, F.; MOSTASSO, F. L.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic enterobacteria associated with different host plants. **Journal of Microbiology**, Seoul, KR, v. 46, p. 373-379, 2008.

ELSAS, J. D. van; DUARTE, G. F.; ROSADO, A. S.; SMALLA, K. Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environmental. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, NL, v. 32, p. 133-154, 1998.

VASSILEV, N.; VASSILEVA, M. Biotechnological solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, DE, v. 61, n. 5-6, p. 435-440, 2003.

VAZQUEZ, P.; HOLGUIN, G.; PUENTE, M. E.; LOPEZ-CORTES, A.; BASHAN, Y. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, DE, v. 30, n. 5-6, p. 460-468, 2000.

VESSEY, J. K.; BUSS, T. J. *Bacillus cereus* UW85 inoculation effects on growth, nodulation, and N accumulation in grain legumes: controlled-environment studies. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, CA, v. 82, n. 2, p. 282-290, 2002.

ZIMMERMAN, W. Degradation of lignin by bacteria. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, NL, v. 13, p. 199-203, 1990.