

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ACTINOBACTÉRIAS E
BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS PARA O
CRESCIMENTO DE PLANTAS

JUCIMARA ANUNCIAÇÃO DE JESUS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO – 2013

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ACTINOBACTÉRIAS E
BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS PARA O
CRESCIMENTO DE PLANTAS

JUCIMARA ANUNCIÇÃO DE JESUS

Dissertação apresentada ao Centro de
Ciências e Tecnologias Agropecuárias da
Universidade Estadual do Norte Fluminense
Darcy Ribeiro, como parte das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Produção Vegetal

Orientador: Prof. Dr. Fabio Lopes Olivares

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO – 2013

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ACTINOBACTÉRIAS E
BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS PARA O
CRESCIMENTO DE PLANTAS

JUCIMARA ANUNCIÇÃO DE JESUS

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal

Aprovada em 27 de março de 2013

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Alessandro Coutinho Ramos (D.Sc., Produção Vegetal) – UVV

Prof^a. Dr. Solange Silva Samarão (D.Sc., Biociências e Biotecnologia) – UENF

Prof. Dr. Fábio Cunha Coelho (D.Sc., Fitotecnia) – UENF

Prof. Dr. Fabio Lopes Olivares (D.Sc., Agronomia) – UENF
(Orientador)

À minha amada mãe Juçara e ao meu esposo Rony

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu seu amor incondicional, graça e conhecimento, me capacitando espiritual e fisicamente, dia após dia, para vencer os obstáculos e superar limitações, mostrando-me que n"Ele sonhos como este são possíveis;

À minha amada e mui digna mãe e amiga Juçara, pelo amor, demonstração de força e exemplo de perseverança. Por investir na minha educação e compartilhar comigo esta realização;

Ao meu querido esposo e eterno namorado Rony, pelo amor, apoio, cuidado, carinho e companheirismo constante em toda essa trajetória. Exemplo de compreensão e sabedoria;

Ao meu pai Berivaldo e aos meus irmãos Rose e Washington, pela alegria em minha vida;

Ao meu querido sobrinho e eterno xodó Jonathas, por sua ternura e amor sincero;

Aos demais familiares que torceram e acreditaram na realização de mais esta etapa;

Ao professor Dr. Fabio Lopes Olivares, pela orientação científica e exemplo de competência, responsabilidade e profissionalismo;

Ao professor Dr. Luciano Canellas pelos valiosos ensinamentos científicos e colaborações neste trabalho;

Ao Pr. Geraldo Dutra, Telma Dutra, Fernando e Thalita pela amizade e apoio espiritual;

À minha amiga Cátia de Paula, por sua amizade e primorosos conselhos;

Aos queridos amigos Manuela Aparecida, Bruna Pintor, Gilberto Pacheco, Mariana Barduco e Kamilla Aguiar pela colaboração, amizade, momentos de alegria e de descontração que tornaram mais feliz a execução deste trabalho;

À Natália Aguiar e Jhonnatan Gonçalves pelo auxílio nas análises;

A todos os colegas de trabalho do Núcleo de Desenvolvimento de Insumos Biológicos para a Agricultura, técnicos e demais funcionários do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual e ao Laboratório de Solos;

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal pela oportunidade de realização deste curso;

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado;

E a todos e todas que contribuíram, direta e indiretamente, para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 Promoção de crescimento vegetal por bactérias.....	5
2.1.1 Ambiente rizosférico.....	6
2.1.2 Ambiente endofítico.....	7
2.2 Mecanismos de promoção de crescimento vegetal por bactérias.....	7
2.2.1 Biofertilização.....	8
2.2.2 Bioestimulação.....	9
2.2.3 Biocontrole.....	10
2.3 Actinobactérias como agentes de PCV.....	10
2.4 Bactérias diazotróficas endofíticas como agentes de PCV.....	13
2.5 Tecnologia de Bioinoculantes.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Obtenção do solo e substrato orgânico.....	18
3.2 Material vegetal.....	18
3.3 Agentes microbianos.....	18
3.4 Ensaio de compatibilização entre isolados de actinobactéria e estirpes diazotróficas para produção de inóculo microbiano.....	20
3.4.1 Observações morfológicas e estruturais de actinobactérias.....	20

3.4.2 Teste de antagonismo actinobactérias x bactérias diazotróficas.....	21
3.4.2.1 Metodologia de Cuesta et al. (2010) modificada.....	21
3.4.2.2 Multiplicação de estirpes diazotróficas em redor de colônias actinobacterianas.....	22
3.4.2.3 Incubação de estirpes diazotróficas em extratos metabólicos das actinobactérias.....	22
3.4.2.4 Coinoculação de actinobactérias e estirpes diazotróficas em meio semissólido.....	23
3.4.3 Teste de antagonismo actinobactérias x actinobactérias.....	24
3.5 Caracterização fisiológica das actinobactérias.....	24
3.5.1 Produção de xilanase e celulase.....	24
3.5.2 Produção de lipase.....	25
3.5.3 Produção de catalase.....	25
3.5.4 Produção de amilase.....	25
3.6 Alteração da estrutura supramolecular de ácidos húmicos pelas actinobactérias.....	26
3.7 Uso de compostos alterados por actinobactérias como fonte de carbono para bactérias diazotróficas.....	27
3.7.1 Amido (macromolécula).....	28
3.7.2 Ácido húmico (supramolécula) em meio líquido.....	28
3.7.3 Ácido húmico (supramolécula) em meio semissólido.....	29
3.8 Promoção de crescimento vegetal por actinobactérias e estirpes diazotróficas.....	29
3.8.1 Extratos metabólicos das actinobactérias na germinação de sementes de milho (<i>Zea mays</i>).....	29
3.8.2 Efeito da coinoculação de actinobactérias e diazotróficos no crescimento de plantas de milho (<i>Zea mays</i>).....	30
3.8.3 Coinoculação de actinobactérias e <i>Herbaspirillum seropedicae</i> HRC54 no crescimento de plântulas de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>).....	31
3.8.3.1 Colonização do substrato comercial Vivatto® por actinobactérias.....	31
3.8.3.2 Promoção de crescimento de tomate em sistema axênico.....	32
3.9 Análise estatística dos dados.....	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34

4.1 Caracterização das colônias e observação microscópica de actinobactérias.....	34
4.2 Seleção de actinobactérias e estirpes diazotróficas compatíveis.....	37
4.3 Caracterização fisiológica dos isolados de actinobactérias.....	44
4.4 Alteração da estrutura supramolecular de ácidos húmicos pelas actinobactérias.....	47
4.5 Ocorrência de sucessão ecológica em combinações compatíveis de actinobactérias-bactérias diazotróficas na presença de ácidos húmicos.....	52
4.6 Efeito de extratos metabólicos das actinobactérias na germinação de sementes de milho (<i>Zea mays</i>).....	57
4.7 Efeito da coinoculação de actinobactérias e diazotróficos no crescimento de plantas de milho (<i>Zea mays</i>).....	58
4.8 Efeito da coinoculação de actinobactérias e <i>Herbaspirillum seropedicae</i> HRC54 no crescimento de plântulas de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>).....	60
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	65
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
7. APÊNDICE.....	84
7.1 Meios de cultura.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Isolados de actinobactéria e bactérias diazotróficas utilizadas no presente estudo.....	19
Tabela 2: Classificação morfológica das actinobactérias segundo Pridham et al. (1958).....	34
Tabela 3: Resultado do ensaio de compatibilidade entre bactérias diazotróficas e isolados de actinobactéria baseado no método de Cuesta et al. (2010) modificado.....	36
Tabela 4: Resultado do ensaio de compatibilidade entre bactérias diazotróficas e os isolados de actinobactérias baseado no método de multiplicação das bactérias em redor das colônias actinobacterianas.....	37
Tabela 5: Efeito de extratos metabólicos das actinobactérias na viabilidade celular de bactérias diazotróficas (percentual de mortalidade).....	39
Tabela 6: Resultado do ensaio de compatibilidade entre isolados de actinobactérias baseado no método de antagonismo em confrontação direta.....	40
Tabela 7: Resultado geral dos ensaios de compatibilidade entre actinobactérias e bactérias diazotróficas baseadas nas diferentes metodologias empregadas.....	42

Tabela 8: Características fenotípicas dos isolados de actinobactérias relacionadas à promoção de crescimento vegetal.....	44
Tabela 9: Índice enzimático de atividades xilanolítica, lipolítica, amilítica e celulolítica dos isolados de actinobactérias.....	46
Tabela 10: Percentual de germinação de sementes de milho tratadas com extratos metabólicos de isolados de actinobactérias.....	56
Tabela 11: Efeito da coinoculação de actinobactérias e estirpes diazotróficas no crescimento de plantas de milho (<i>Zea mays</i>).....	58
Tabela 12: Densidade microbiana em ensaio de PCV de plântulas de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) cv. Santa Clara.....	60
Tabela 13: Caracterização química do substrato Vivatto® após 45 dias de incubação com isolados de actinobactérias.....	60
Tabela 14: Efeito da coinoculação de actinobactérias e <i>H. seropedicae</i> HRC54 em plântulas de tomate.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Chave para classificação de grupos de actinobactérias do gênero <i>Streptomyces</i> (Adaptado de Pridham et al., 1958).....	21
Figura 2: Imagens de colônias das actinobactérias cultivadas em meio NB sólido.....	34
Figura 3: Microscopia óptica de contraste de fase e contraste interferencial. Visão geral do micélio e da cadeia de esporos.....	35
Figura 4: Teste de compatibilidade entre actinobactérias e bactérias diazotróficas segundo metodologia de Cuesta et al. (2010) modificada. Halo de inibição de <i>B. silvatlantica</i> UENF 103 confrontada com o isolado AC15 (A) e de <i>G. diazotrophicus</i> Pal5 confrontada com o isolado AC19 (B). Compatibilidade entre <i>H. seropedicae</i> HRC54 confrontada com os isolados AC09 e AC31 (C e D).....	37
Figura 5: Teste de compatibilidade entre actinobactérias e bactérias diazotróficas segundo metodologia de multiplicação de estirpes diazotróficas em redor das colônias actinobacterianas. Gradiente de crescimento de <i>B. silvatlantica</i> UENF 101 confrontada com o isolado AC31 (A) e de <i>H. seropedicae</i> HRC54 confrontada com o isolado AC04 (B). Compatibilidade de estirpe VM10, isolada de vermicomposto, confrontada com AC09 (C) e de <i>G. diazotrophicus</i> Pal5 confrontada com o isolado AC04 (D).....	38

Figura 6: Viabilidade celular de *G. diazotrophicus* Pal5 (**A**) e de *H. seropedicae* HRC54 (**B**) após incubação por 36 horas em extrato metabólico bruto de AC01 evidenciada por microscopia de fluorescência utilizando o LIVE/DEAD® BacLigth™ Bacterial Viability Kit..... 39

Figura 7: Compatibilidade entre *H. seropedicae* HRC54 confrontada com os isolados AC01, AC02, AC04, AC05, AC06, AC09, AC15 e AC31, evidenciada pelo seu crescimento e formação de película em meio JNFb semissólido na presença de actinobactérias..... 40

Figura 8: Teste de compatibilidade entre actinobactérias utilizando método de confrontação direta. Halo de inibição de AC09 quando confrontados com AC19 (A) ou AC15 (B). Compatibilidade entre AC31 e AC09 confrontados com AC02 (C e D).....	41
Figura 9: Produção de enzimas extracelulares pelos isolados de actinobactérias. Catalase (3A), lipase (3B) e amilase (3C e 3D).....	44
Figura 10: Espectros de IVTF/DRIFT AH no meio de cultivo antes (a - vermelho) e após incubação com actinobactérias (b “AC04”, c “AC01” e d “AC05”).....	48
Figura 11A: Cromatograma de exclusão dos AHs.....	49
Figura 11B: Análise quantitativa das duas regiões do cromatograma por exclusão de tamanho.....	49
Figura 11: Cultivo de bactérias diazotróficas em halo amilolítico de actinobactérias. Visão geral do perfil de crescimento de <i>H. seropedicae</i> HRC54 e <i>G. diazotrophicus</i> Pal5 em meio Amido-agar hidrolisado pelo isolado AC02 (8A). Evidências do crescimento de <i>H. seropedicae</i> HRC54 em halo produzido pelo isolado AC31 (8B) e do não crescimento de <i>G. diazotrophicus</i> Pal5 (8C) em halo produzido pelo isolado AC15 em meio Agar-amido corado com lugol.....	52
Figura 12: Número mais provável de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> HRC54 cultivada em filtrados de meio de cultura líquido, sais de JNFb e AH como única fonte de carbono, previamente incubados por 21 dias com os isolados AC01, AC04 ou AC05. C+, controle contendo 1 g L ⁻¹ de ácido málico como fonte de carbono.....	53
Figura 13: Crescimento micelial dos isolados AC04, AC06 e AC09 sobre superfície da película aerotóxica de <i>H. seropedicae</i> HRC54 (A). Ausência de crescimento micelial do isolados AC01, AC02, AC15.....	54
Figura 14: Crescimento de <i>H. seropedicae</i> HRC54 em meio semissólido suplementado com 25 µL de filtrados de meio de cultura líquido, sais de JNFb e AH previamente incubado por 21 dias com os isolados AC01, AC04 ou AC05 como única fonte de carbono. À esquerda, controle positivo (JNFb contendo 1 g L ⁻¹ de ácido málico como fonte de carbono) e à direita, controle negativo (JNFb sem quaisquer fonte de carbono).....	55

Figura 15: Visão geral das plântulas de tomate produzidas em substrato incubado com actinobactérias, inoculadas (I.) ou não inoculadas (N.I.) com *H. seropedicae* HRC54..... 61

RESUMO

JESUS, Jucimara Anunciação de, M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Março de 2013. POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ACTINOBACTÉRIAS E BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS PARA O CRESCIMENTO DE PLANTAS. Orientador: Prof. Fabio Lopes Olivares.

As actinobactérias são procariotos Gram positivos amplamente conhecidos, não só pela produção de antibióticos, como também pela produção de diversas enzimas envolvidas na mineralização de nutrientes e em processos de decomposição de moléculas orgânicas recalcitrantes presentes no solo, inclusive substâncias húmicas. A ação sobre compostos de carbono de difícil decomposição pode representar uma oportunidade para estudos de sucessão microbiana ou coinoculação com vias a transformação destes, em compostos mais lábeis para outros componentes da microbiota. Alinhado com esta visão, a combinação de actinobactérias com bactérias benéficas pode representar uma abordagem potencialmente interessante para formulação de novos inoculantes microbianos para promoção do crescimento de plantas. Assim, a compatibilidade entre seis bactérias diazotróficas, reconhecidamente promotoras do crescimento vegetal e nove isolados de actinobactérias, obtidos em estudos prévios em meio sólido contendo ácidos húmicos (AH) como fonte exclusiva de carbono, foi avaliada por meio de cocultivo *in vitro*. Todos isolados de actinobactéria foram caracterizados quanto à coloração da colônia, estrutura das células e dos

esporóforos e comparados com chaves taxonômicas, bem como avaliada a capacidade enzimática para compostos alvo. Três isolados foram testados quanto à capacidade de alterar a supraestrutura dos AH e fornecerem esqueletos de carbono para suportar o crescimento de bactérias diazotróficas em ensaios de sucessão ecológica simulada. Por fim, o efeito da coinoculação desses microrganismos no crescimento vegetal de plantas de milho e tomate foi avaliado. Interações mutualísticas entre *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe Pal5, *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 e a maioria dos isolados de actinobactérias foram observadas, com exceção de AC04, AC05, AC15 e AC19 em que se observou efeito antagônico moderado. Dentre os isolados 66,6, 88,9 e 100% foram capazes de produzir lipase, amilase e catalase, respectivamente. Análises de cromatografia líquida de alta eficiência revelaram possíveis reduções na distribuição da massa molecular aparente dos AH incubados com os isolados AC01, AC04 e AC05, as quais ocorreriam na ordem de 11 a 22% em moléculas maiores e 14 a 20% em moléculas menores. A espectroscopia de IV-TF/DRIFT demonstrou que esses isolados foram capazes de modificar funções químicas relativas a compostos aromáticos, sulfonados, polissacarídeos e grupamentos carboxílicos dos ácidos húmicos. As alterações químicas promovidas pelo isolado AC05 geraram compostos de carbono que sustentaram o crescimento de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54. Os ensaios de inoculação em plantas evidenciaram aumento no teor de clorofila e massa seca das raízes de plantas de milho inoculadas com *H. seropedicae* ou *G. diazotrophicus* e naquelas inoculadas com essas bactérias diazotróficas em conjunto os isolados AC01, AC04 e AC31. O isolado AC01 foi capaz de promover o incremento significativo da altura, área foliar, nº de raízes laterais e massa seca da parte aérea de plântulas de tomate. Estes resultados indicam que combinações compatíveis de actinobactérias e bactérias diazotróficas são capazes de promover o crescimento vegetal, possibilitando sua utilização conjunta em novas formulações para o desenho de bioinoculantes agrícolas.

Palavras-chave: interação microbiana; substâncias húmicas; promoção de crescimento vegetal; enriquecimento biológico de substratos.

ABSTRACT

JESUS, Jucimara Anunciação de, M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, March, 2013. BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF ACTINOBACTERIAS AND ENDOPHYTIC DIAZOTROPHIC BACTERIAS FOR PLANT GROWTH. Advisor: Prof. Fabio Lopes Olivares.

Actinobactérias are Gram positive prokaryotes widely known, not only for the production of antibiotics, but also for production of several enzymes involved in nutrient cycling and decomposition of recalcitrant organic molecules present in the soil, including humic substances. The action over recalcitrant carbon decomposition difficult compounds may represent an opportunity for studies of microbial succession or co-inoculation design since such carbon source would be converted in more labile compounds made available for other microorganisms. Aligned with this viewpoint, the combination of actinobacteria with beneficial bacteria may represent a potentially attractive approach for the development of new bioinoculants for plant growth promotion. Thus, the compatibility among six diazotrophic endophytic bacteria, recognized as plant growth promoter and nine strains of actinobacteria obtained in previous studies on solid medium containing humic acid (HA) as sole carbon source, was evaluated by *in vitro* co-culture assays. All strains were characterized as actinobacteria by colony traits and cellular structure of sporophores being compared to taxonomic keys, as well evaluated for the ability to produce enzyme compounds. Three isolates were

tested for the ability to alter the suprastructure of the HA and provide carbon skeletons to support growth of diazotrophic bacteria under simulated ecological succession trials. Finally, the effect of these microorganisms co-inoculated in maize and tomato plants was evaluated. Mutual interactions among *Gluconacetobacter diazotrophicus* strain Pal5, *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 and actinobacteria were observed, except for AC04, AC05, AC15 and AC19 such were we observed moderate antagonist effect. About the strains 66.6, 88.9 and 100% were able to produce amylase, lipase, and catalase, respectively. The high performance liquid chromatography analysis showed possible reductions in apparent molecular weight distribution of HA when incubated with the isolated AC01, AC04 and AC05 related to the non-modified humic acid, with a magnitude around 11 to 22% for higher molecular weight compounds and 14 to 20% for lower molecular weight compounds. IV-TF/DRIFT spectroscopy results showed that these strains were able to modify chemical functions on sulphonated, aromatic compounds, polysaccharides and the carboxylic groups of the humic acids. The changes provided by AC05 strain generate carbon compounds that sustained the *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 growth. The plant inoculation assay showed an increase in chlorophyll content in leaves of the corn plants inoculated with *H. seropedicae* or *G. diazotrophicus* and for the co-inoculated treatments diazotrophic bacteria and AC01, AC04 and AC31 actinobacteria strains. The strain AC01 was able to promote a significant increase in height, leaf area and number of lateral roots and dry weight of tomato seedlings. These results suggest that compatible combinations of actinobacteria and diazotrophic bacteria can potentially improve plant growth, which suggests their combined use in new bioinoculants design for sustainable agriculture.

Key-words: microbiological interactions; humic substances; plant growth promotion; biological substrate increasing.

1. INTRODUÇÃO

Atender à constante demanda de alimentos para uma população que cresce exponencialmente sempre foi um desafio mundial e a Revolução Verde foi o marco histórico da busca pela não concretização da teoria do economista inglês Thomas Robert Malthus de que “A população cresce em progressão geométrica, enquanto que a produção de alimentos cresce em progressão aritmética”. O pacote tecnológico de produção tinha como base a produtividade máxima por meio do uso intensivo das terras, da monocultura extensiva, aplicação de fertilizantes sintéticos, melhoramento genético e irrigação em algumas regiões (Siqueira et al., 1999).

Em 1970 a população mundial era de, aproximadamente, 3,7 bilhões de pessoas e 1,225 bilhões de toneladas de grãos eram produzidos em 695 milhões de hectares. O número da população subiu para 6,453 bilhões em 2005 e a produção agrícola para 2,219 bilhões de grãos em 681,7 milhões de hectares (Scolari, 2007). O aumento da produtividade, sem que houvesse a introdução de novas áreas agrícolas, ilustra o êxito da Revolução Verde em produzir alimentos. Contudo, essa produção apresentou um custo ambiental elevado.

A utilização maciça de fertilizantes sintéticos e defensivos está associada à eutrofização de aquíferos e reservatórios de água e à acidificação do solo. Ademais, ocorre perda de qualidade do solo devido ao revolvimento da camada arável e remoção da matéria orgânica, além do aumento na concentração

atmosférica de gases relacionados ao efeito estufa, em virtude da dependência da matriz energética do petróleo.

Os questionamentos sobre a eficácia de tal maneira de produzir têm levado a uma maior conscientização ambiental da população e órgãos governamentais, abrindo espaço para sistemas orgânicos e agroecológicos de produção, direcionando estudos e pesquisas ao desenvolvimento de tecnologias alternativas que atenuem os impactos danosos do modelo convencional de produção imediatista. O Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fixação Biológica do Nitrogênio (INCT-FBN) é um exemplo destas iniciativas. O instituto desenvolve, junto a entidades educacionais e de pesquisa, trabalhos em biologia molecular da fixação de nitrogênio, interação planta-bactéria, ecologia molecular de diazotróficos, seleção de estirpes fixadoras de nitrogênio e promotoras do crescimento vegetal; visando tecnologias para aplicação de inoculantes bacterianos e biofertilizantes em agroecossistemas produtivos.

Estudos voltados para o desenvolvimento de insumos biológicos tais como inoculantes, substratos biologicamente enriquecidos e fertilizantes organominerais estão entre as ações em pesquisa e tecnologia praticadas pelo grupo do Núcleo de Desenvolvimento de Insumos Biológicos para Agricultura (NUDIBA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). O desenvolvimento de um novo conceito de biofertilizante, baseado no uso combinado de ácidos húmicos e bactérias diazotróficas endofíticas, é um exemplo concreto destas iniciativas e evidencia a importância da adição de substâncias húmicas (SH) para incremento da amplitude de resposta de bactérias diazotróficas endofíticas, na promoção do crescimento de espécies agrícolas importantes (Canellas et al., 2012).

A aplicação isolada de ácidos húmicos ou a inoculação de bactérias diazotróficas do gênero *Herbaspirillum*, bem como o seu uso combinado, apresentou efeito bioestimulante do crescimento vegetal em plântulas de milho (Conceição et al., 2008). Incrementos da massa seca da parte aérea, no comprimento e área radicular foram promovidos pelo uso conjunto de ácidos húmicos e *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54, em toletes de cana tratados termicamente (Marques Jr et al., 2008). Outros estudos realizados pelo NUDIBA sobre o potencial de frações húmicas em estimular o crescimento vegetal (Façanha et al., 2002) e aumentar a população de bactérias (Ndaw et al.,

2011) sugerem a possibilidade de utilização dessas substâncias e microrganismos na composição de inoculantes. Estudos mais recentes conduzidos por Busato et al. (2012) evidenciaram o papel da aplicação de uma mistura de bactérias fixadoras de nitrogênio e solubilizadoras de fósforo durante o processo inicial de vermicompostagem, evidenciando o incremento dos conteúdos de N e P-lábil no vermicomposto maduro, trabalho este enquadrado nos princípios do enriquecimento biológico de substratos.

De modo paralelo, o grupo das actinobactérias, que consistem em procariotos Gram positivos que apresentam crescimento micelial, recebe atenção particular devido à produção de diversos metabólitos secundários como enzimas extracelulares capazes de atuar na decomposição da matéria orgânica (Goodfellow, 1988; Moreira e Siqueira, 2002). Ainda, como produto do metabolismo secundário destes procariotos, resulta a produção de antibióticos que podem atuar no controle de fitopatógenos e, assim, como a mineralização de nutrientes da matéria orgânica do solo, se constitui um mecanismo indireto de promoção do crescimento vegetal (Zago et al., 2000a). Soares et al. (2010) observaram que a incubação do solo com isolados de estreptomicetos, por 35 dias antes do plantio, promoveu incrementos significativos no crescimento e acúmulo de nutrientes de mudas de tomateiro.

As actinobactérias podem ainda atuar diretamente no crescimento vegetal, produzindo compostos com atividade fitormonal. Um isolado do gênero *Streptomyces* designado isolado C e caracterizado como produtor de ácido indol-3-acético foi capaz de promover incrementos significativos na altura e massa fresca de brotos, massa fresca e seca de raízes de trigo, além de aumentar a absorção de N, Fe, P e Mn (Sadeghi et al., 2012).

Estudos envolvendo actinobactérias e SH contemplam a capacidade desses procariotos em decompor tais substâncias. Essa capacidade é evidenciada por Fodil et al. (2012) que identificaram uma nova enzima peroxidase produzida por *Streptomyces* sp. isolado AH4 capaz de alterar quimicamente a estrutura de AH.

Observa-se que tanto bactérias diazotróficas endofíticas quanto actinobactérias dispõem de mecanismos para promoção do crescimento vegetal (PCV) e são capazes de interagir, de forma distinta com SH. No entanto, esses microrganismos têm sido alvos de pesquisas científicas que estudam os

potenciais individuais que apresentam para a promoção direta e/ou indireta de crescimento vegetal.

Diante disso, este trabalho objetiva avaliar a compatibilidade *in vitro* e *in vivo* de combinações selecionadas de actinobactérias e bactérias diazotróficas endofíticas, bem como o potencial de isolados de actinobactérias em decompor SH e influenciar no processo de promoção de crescimento vegetal por bactérias diazotróficas endofíticas.

OBJETIVO GERAL:

Estudar o potencial de isolados de actinobactérias ou bactérias diazotróficas endofíticas em promover o crescimento vegetal, visando à formulação de bioinoculantes mistos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- I. Avaliar a compatibilidade de isolados de actinobactérias e bactérias diazotróficas endofíticas para produção de inóculos mistos;
- II. Identificar características fenotípicas relacionadas à promoção de crescimento vegetal em isolados de actinobactérias;
- III. Investigar a capacidade de alteração da estrutura supramolecular de ácidos húmicos por isolados de actinobactérias;
- IV. Avaliar a capacidade de bactérias diazotróficas em utilizar ácidos húmicos alterados quimicamente por actinobactérias, como fonte de carbono;
- V. Avaliar o efeito da coinoculação de isolados de actinobactérias e bactérias diazotróficas endofíticas na promoção de crescimento de plantas de milho e tomate

HIPÓTESE

Actinobactérias e bactérias diazotróficas podem interagir, de forma sinérgica (ou não), promovendo o crescimento vegetal de plantas modelo e esse processo pode ser beneficiado pela adição de ácidos húmicos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Promoção de crescimento vegetal por bactérias

A produção de alimentos para atender à crescente população sempre foi um desafio para as sociedades. Hoje, esse desafio é ainda mais complexo, pois não basta atender a demanda quantitativa, mas também, qualitativa dos alimentos. A busca por uma dieta alimentar mais rica e segura tem direcionado estudos e pesquisas para o desenvolvimento de sistemas alternativos de produção agrícola que atenuem ou mesmo suprimam os efeitos danosos dos agroquímicos usados, indiscriminadamente, nos sistemas convencionais. Nesse contexto, a biologia do solo oferece diversas alternativas para a construção de novas biotecnologias aplicáveis a estes sistemas emergentes (Oliveira et al., 2003).

Bactérias que estabelecem associações benéficas com as plantas desempenham papel fundamental na manutenção e/ou incremento do crescimento vegetal, quer seja em ecossistemas naturais ou manejados. Muitos destes procaríotos derivam do ambiente edáfico (Compant et al., 2010) e podem ser empregados em ensaios de promoção de crescimento vegetal (PCV) para melhoria da produção agrícola.

Para melhor compreensão da interação planta-bactéria e sua utilização como recurso biotecnológico nos ecossistemas produtivos, é necessário o

entendimento do processo de colonização dos diferentes nichos associados às plantas, por estes microorganismos (Compant et al., 2010).

2.1.1 Ambiente rizosférico

O solo é um ambiente sistêmico e dinâmico que influencia o crescimento, a multiplicação, a sobrevivência e outras atividades dos organismos que nele vivem na forma de comunidades complexas (Pereira, 2000).

A região do solo, diretamente influenciada pela presença das raízes, é denominada rizosfera e nela ocorre a maior parte das interações entre microorganismos e plantas (Lynch, 1982; Foster, 1986). De acordo com Zago et al. (2000b), a rizosfera pode ser dividida em: endorrizosfera (várias camadas dos tecidos da raiz); rizoplano (superfície bidimensional da raiz) e ectorrizosfera (representando o solo adjacente à raiz).

As características químicas do solo rizosférico podem ser alteradas pela planta por meio, principalmente, da exsudação de compostos radiculares solúveis como açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos, peptídeos, nucleotídeos, vitaminas e outros compostos biologicamente ativos. Além disso, a absorção de íons de forma seletiva e água diminuem a concentração desses nutrientes, gerando gradientes necessários ao transporte dos mesmos, em direção às raízes (Pereira, 2000). A rizodeposição destas substâncias gera um microambiente favorável ao crescimento e desenvolvimento de microorganismos.

O tamanho da rizosfera varia de acordo com a morfologia da raiz (Cardoso et al., 1992) e a quantidade e composição dos exsudados são influenciados por características da espécie vegetal e dos fatores ambientais, sendo os valores mais comuns entre 10 e 100 mg de carbono/grama de raiz seca ou, aproximadamente, 20% dos fotossintatos (Whipps, 1985).

Uma extensiva colonização rizosférica pelos microorganismos é essencial para alcançar um eficiente controle biológico de fitopatógenos estimulando, assim, o crescimento das plantas (Zago et al., 2000b).

2.1.2 Ambiente endofítico

A palavra endófito ou endofítico é empregada para definir microrganismos que apresentam a capacidade de colonizar o interior das plantas, sem causar sintomas e que podem ser isolados de tecidos vegetais superficialmente desinfestados (Kloepper et al., 1997).

Segundo Oliveira et al. (2003), a maior concentração de fotoassimilados e nutrientes orgânicos que podem ser utilizados para suprir a demanda energética das atividades metabólicas dos endófitos e a baixa competitividade entre espécies microbianas são características que fazem do ambiente endofítico mais favorável à expressão de genes relacionados à PCV que a rizosfera. Os autores também afirmam que essa expressão que ocorre ao longo do ciclo da cultura da planta hospedeira sofre menor influência dos fatores ambientais.

Os processos benéficos promovidos pelos microrganismos endofíticos terão sucesso, desde que estes sejam capazes de estabelecerem-se endofiticamente no interior do vegetal, ocupando e se multiplicando nos tecidos do hospedeiro, superando os impedimentos físicos e químicos por ele estabelecidos, construindo assim, vias de infecção e sítios de colonização (Kuss, 2006).

2.2 Mecanismos de promoção de crescimento vegetal por bactérias

Bactérias e rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV/RPCV) podem estimular o crescimento de plantas, aumentando a produção de biomassa, reduzindo os danos causados por fitopatógenos e mimetizando o estresse causado por fatores bióticos e abióticos (Lugtenberg e Kamilova, 2009; van Loon and Backker, 2005; Welbaum et al., 2004).

Muitos desses mecanismos são utilizados por estes microrganismos durante o ciclo vegetal e os reflexos dessa atuação podem ser influenciados pelas características físicas, químicas e biológicas do solo (Oliveira et al., 2003). O entendimento do funcionamento destes mecanismos pode levar à alteração da microflora associada aos vegetais e, conseqüentemente, ao aumento da produtividade de agroecossistemas (Oliveira, 2003).

2.2.1 Biofertilização

Biofertilizante é um termo que recentemente ganhou maior amplitude, como aquela proposta por Vessey (2003), como substâncias que contêm microrganismos vivos que, quando aplicados sobre a semente, superfícies das plantas ou solo, são capazes de colonizar a rizosfera ou o interior do vegetal e promover o seu crescimento a partir do suprimento ou disponibilização de nutrientes primários ao hospedeiro.

A biofertilização é um mecanismo direto de PCV que engloba atividades como a fixação biológica do nitrogênio (Grimes e Mount, 1984), solubilização de fosfato (Anandham, 2007), solubilização de zinco (Sarathambal et al., 2010), oxidação de enxofre (El-Tarabily, 2006) e disponibilidade de nitrato (Nardi et al., 1989).

Em plantas de cana-de-açúcar micropropagadas, a inoculação com *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 promoveu o aumento de 28% da massa fresca (Baldani e Baldani, 2005). Também em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes combinações de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia* sp., Oliveira et al. (2002) verificaram aumentos significativos na massa seca das raízes, além de incrementar em 30% o teor total de nitrogênio em plantas inoculadas. Em plantas de arroz cv. IR42, inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae* Z67, o teor de nitrogênio foi incrementado em, aproximadamente, 30% (James et al., 2002).

Busato et al. (2012) observaram aumento da atividade fosfatase ácida e do teor de fósforo disponível em vermicomposto inoculado com *Burkholderia silvatlantica*, *Burkholderia* spp. e *Herbaspirillum seropedicae*, no estágio inicial da vermicompostagem. A secreção *in vitro* de ácidos orgânicos como oxálico, cítrico e tartárico pelos isolados de *Burkholderia* é sugerida pelos autores como principal mecanismo para a solubilização do nutriente.

Em estudos de solubilização de carbonato de zinco ($ZnCO_3$) e óxido de zinco (ZnO), Sarathambal et al. (2010) observaram que os compostos insolúveis de zinco foram efetivamente solubilizados e a maior absorção desse nutriente ocorreu por plantas de milho inoculadas com *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

A aplicação combinada de *Paracoccus versutus* CBS 114155 e enxofre elementar (S⁰) em plantas de milho, cultivadas em solo arenoso, elevaram o nível de sulfato no solo (SO₄⁻²) e a absorção de N, S, Fe, Mn e Zn pelas plantas (El-Trabily et al., 2006).

2.2.2 Bioestimulação

A bioestimulação é um mecanismo de PCV caracterizado pela produção de metabólitos, a exemplo de substâncias com atividade fitormonal de crescimento, que promovem diretamente o crescimento da planta. Seu espectro de ação envolve o desenvolvimento de meristemas apicais, estímulo da divisão e crescimento celular, crescimento de raízes, aumento do número de pelos radiculares, além de estimular a germinação (Cattelan, 1999; Luz, 1996; Tsavkelova et al., 2007).

Bastián et al. (1998) evidenciaram a produção de ácido indól-3-acético (AIA) e de giberelinas (GA) por *Acetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum seropedicae*.

A produção de GA por *Azospirillum* sp. e *Bacillus* sp. promoveu o aumento da absorção de ¹⁵N em raízes de trigos inoculadas com as bactérias (Bottini et al., 2004). Filtrados de culturas de actinobactérias do gênero *Streptomyces*, caracterizadas como produtoras de substâncias com atividade auxínica, giberélica e citocínica, foram eficientes na promoção de crescimento e aumento da produtividade plantas de trigo (Aldesuquy et al., 1998).

A inoculação de plantas de feijão com *Azospirillum brasiliense* estirpe Cd estimulou o crescimento e aumentou o acúmulo de massa seca e a superfície específica das raízes (German et al., 2000). A capacidade de produzir fitormônios, a exemplo daqueles de atividade auxínica, é sugerida pelos autores como justificativa para as alterações na arquitetura radicular promovida pela bactéria.

A produção de auxina por bactérias é um importante mecanismo de PCV, uma vez que este hormônio vegetal é capaz de ativar a enzima H⁺-ATPase da membrana plasmática, a qual é responsável pelo estabelecimento do gradiente eletroquímico necessário para o transporte de nutrientes através da membrana, como tem sido demonstrado por Takahashi et al. (2012). Estes autores

evidenciaram que a aplicação de ácido indol-3-acético ativa a H⁺-ATPase do hipocótilo de plantas de *Arabidopsis*.

2.2.3 Biocontrole

O termo doença pode ser definido como o produto da interação entre hospedeiro, agente causal e ambiente (Agrios, 2005). O processo doença envolve alterações na fisiologia do hospedeiro e, segundo McNew (1960) é classificada em cinco grupos: (I) doenças que destroem os órgãos de armazenamento; (II) que causam danos em plântulas; (III) que danificam as raízes; (IV) que atacam o sistema vascular; (V) que interferem na fotossíntese e (VI) que alteram o aproveitamento de fotossintatos. Diante disso, microrganismos capazes de atuar antagonicamente contra fitopatógenos reduzem os danos causados aos processos fisiológicos vitais da planta promovendo, indiretamente, o seu crescimento.

Assim, o biocontrole consiste na redução da intensidade do inóculo ou das atividades determinantes da fitomoléstia, por meio de outro(s) organismo(s) que não o homem (Cook e Baker, 1983). Este controle pode ocorrer por meio de antibiose, parasitismo, competição, predação ou hipovirulência (Cook e Baker, 1983).

A ação nematicida de filtrados da cultura de actinobactérias do gênero *Streptomyces* sobre nematoides juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* tem sido descrita (Damasceno, 2011; Sousa, 2006).

Soares et al. (2009) observaram o controle *in vitro* dos fungos fitopatogênicos do tomateiro, *Cladosporium fulvum* Cooke e *Fusarium oxysporium* f. sp. lycopersici, por isolados de estreptomicetos.

Bactérias endofíticas e da rizosfera de cana-de-açúcar, pertencentes ao gênero *Burkholderia*, produziram metabólitos com atividade antimicrobiana *in vitro* contra a bactéria fitopatogênica *Xanthomonas albilineans* (Santos, 2010).

2.3 Actinobactérias como agentes de PCV

As actinobactérias são procariotos Gram positivos que apresentam elevada proporção de G-C (guanina e citosina) em seu DNA, compondo mais de

70% do total de bases nucleotídicas (Rodrigues, 2006). Pertencem à classe Actinobacteria cuja distribuição ocorre principalmente no solo, podendo também ser encontrados na água e em outros ambientes (Goodfellow e Cross, 1984). Estes microrganismos também são aeróbios estritos, apresentando colônias pulverulentas, além de micélio aéreo de diferentes tonalidades e são mundialmente conhecidos pela produção de antibióticos e capacidade de colonização da rizosfera (Araújo, 1998; Padilha, 1998; Ujikawa, 2003). Outra característica importante das actinobactérias é a produção de um conjunto de enzimas extracelulares, como aquelas de atividade celulolítica que atuam na degradação de componentes da parede celular vegetal e de metabólitos secundários, que atuam direta e/ou indiretamente na promoção de crescimento de plantas (Sousa et al., 2009).

Igarashi et al. (2004) obtiveram ácidos pterídicos A e B produzidos por *Streptomyces hygroscopicus* TP-A0451, uma actinobactéria endofítica. Os autores observaram atividade hormonal auxínica do primeiro ácido que, na concentração de 20 ppm, promoveu o alongamento de raízes e, na concentração de 1 nM, induziu a formação de raízes adventícias em hipocótilos de feijão. Neste trabalho, também foi verificada a produção de antibióticos de atividade antagônica a *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida glabrata*. O isolado endofítico MBR-52 acelerou a emergência de raízes adventícias na base das hastes de mudas de azaléia (*Rhododendro*), obtidas por cultura de tecidos, além de apresentar boa capacidade de colonizar esse vegetal (Meguro, 2006).

O incremento significativo nos teores de nitrogênio da parte aérea e de até 76% da massa seca em raízes de mudas de tomateiro, produzidas em substratos infestados com isolados de actinobactérias foi observado por Damasceno (2011) e a produção *in vitro* de ácido indolacético, xilanases e celulases verificadas pela autora foi sugerida como justificativa para a promoção de crescimento.

Após cultivar plantas de girassol e pinhão manso em dois solos com características químicas e teores de matéria orgânica diferentes, porém infestados e incubados com isolados de actinobactérias do gênero *Streptomyces*, Brito (2010) verificou o aumento significativo do crescimento destas plantas. A boa capacidade de colonizar os solos estudados, a atividade de enzimas extracelulares e a produção de fitormônios observadas são características que,

segundo o autor, possivelmente explicam o efeito benéfico dos isolados. Lima (2002) obteve aumentos de 36,11% na biomassa seca da parte aérea e 27,19% na altura de plantas de tomateiro, obtidas a partir da microbiolização das sementes com isolados de actinobactérias.

Entretanto, a ocorrência de efeito fitotóxico na germinação de sementes de trigo (*Triticum aestivum* L), feijão (*Phaseolus radiatus* L.) e algumas gramíneas (*Paspalum notatum* e *Cynodon dactylon*), por metabólitos secundários de *Streptomyces lavendulae* var. *glaucescens*, foi observada por Zhi-Ki et al. (2005). Venkatachalam et al. (2010) verificaram a inibição da germinação de sementes de milho, grama e rabanete pela fosfotricina produzida por *Streptomyces viridochromogenes* e *Streptomyces clavifer*. Estes trabalhos, além de servirem como bases para pesquisas de biopesticidas, reforçam a necessidade dos estudos de compatibilidade entre o microrganismo com potencial biotecnológico agrícola, a microflora benéfica do solo e as espécies vegetais que compõem o agroecossistema.

Actinobactérias isoladas de fezes de minhoca e crescidas em meio de cultura apresentaram, por sua vez, atividade hormonal e aumentaram a eficiência na absorção de nitrato por mudas de arroz (Nardi et al., 1989). Além disso, a mesma cultura microbiana aumentou a massa seca e estimulou a assimilação de K, Ca, MG e Fe, nas duas primeiras semanas de crescimento das plântulas.

A matéria orgânica do solo (MOS) funciona como um imenso reservatório de nutrientes como C, N, P e S. Porém, com o processo de humificação, muitos destes nutrientes tornam-se bioestáveis. Diante disso, a possibilidade de mineralização destes compostos e disponibilização dos nutrientes à solução do solo e, conseqüentemente, às espécies vegetais, constitui-se uma importante ferramenta biotecnológica para promoção de crescimento de plantas e melhoria dos sistemas produtivos.

A decomposição de moléculas complexas e recalcitrantes como a lignina e a lignocelulose por actinobactérias, sobretudo do gênero *Streptomyces*, tem sido descrita por diversos autores (Pometto, 1986; Trigo e Ball, 1994; Kontchou e Blondeau, 1992). Yanagi et al. (2002) observaram a descoloração de ácidos húmicos, com considerável grau de aromaticidade, por *Streptomyces aureofaciens*. Aliado a isso, alguns estreptomicetos produzem melaninas escuras,

consideradas precursoras de húmus, reforçando o papel das actinobactérias nas transformações destas substâncias orgânicas (Vargas e Hungria, 1997).

A atividade biodegradadora de resíduos por estes microrganismos requer quantidades mínimas de nitrogênio capazes de manter a relação C:N adequada para este fenômeno. Presumivelmente, esta demanda pode ser subsidiada pela fixação biológica deste elemento por bactérias diazotróficas, além de outras fontes.

2.4 Bactérias diazotróficas endofíticas como agentes de PCV

O nitrogênio (N) pertence ao conjunto de macronutrientes essenciais aos vegetais, pois compõe biomoléculas importantes como ATP, NADH, NADPH, proteínas, clorofila e uma série de enzimas (Miflin e Lea, 1976; Harper, 1994). Embora sua concentração seja de aproximadamente 80% do ar atmosférico, na forma de N₂, as plantas não possuem a capacidade de absorvê-lo, caracterizando o nutriente como um fator limitante para as culturas agrícolas (Döbereiner, 1997; Dalla Santa et al., 2004).

O fornecimento de N às plantas, nas formas absorvíveis, nítrica (NO₃⁻) ou amoniacal (NH₄⁺) provém, principalmente, da aplicação de fertilizantes químicos nitrogenados, obtidos industrialmente pelo processo de Haber-Bosh, e da fixação biológica do N atmosférico (FBN), realizada por procariotos denominados diazotróficos (Dalla Santa et al., 2004). Estes microrganismos podem ser de vida livre, simbióticos ou associativos (Moreira et al., 2010).

Segundo Döbereiner (1997), a princípio trabalhava-se na idéia de que havia bactérias diazotróficas somente na rizosfera. Estas são as fixadoras de vida livre, capazes de completar seu ciclo de vida no solo e colonizarem a rizosfera e o rizoplano (Silva, 2009), onde estão presentes exsudados radiculares que podem ser utilizados como recurso de carbono para o metabolismo celular. A espécie *Beijerinckia fluminensis* foi a primeira isolada e descrita em solos tropicais por Döbereiner e Ruschel (1958). Posteriormente, várias outras espécies de diazotróficas de vida livre foram descobertas (*Azotobacter chroococcum*, *Azotobacter paspali*, *Derxia* spp., *Paenebacillus azotofixans*) (Moreira et al., 2010).

As bactérias diazotróficas simbióticas, por sua vez, são capazes de se associarem a espécies leguminosas na forma de nódulos radiculares ou caulinares, dentro dos quais se diferenciam em bacteroides capazes de reduzir o N atmosférico à amônia (Mercante et al., 2002). A relação simbiótica estabelecida entre leguminosas e bactérias do gênero *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Photorhizobium*, *Sinorhizobium* e *Frankia* são exemplos desse tipo de associação (Chueire et al., 2003).

Já as bactérias diazotróficas associativas ou endofíticas são aquelas que residem parte do seu ciclo de vida nos vegetais e são passíveis de serem isoladas desses tecidos, cuja superfície foi previamente desinfestada, ou mesmo extraídas da planta, e que não provocam danos evidentes ou induzem sintomas na espécie vegetal (Kloepper et al., 1997). Baldani et al. (1997) propõem o arranjo de bactérias diazotróficas associativas em dois grupos: endofíticos facultativos, que podem colonizar tanto a rizosfera como o interior das plantas, e endofíticos obrigatórios que colonizam o interior das plantas.

Além da FBN e produção de fitormônios, as bactérias diazotróficas endofíticas podem promover o crescimento vegetal das plantas, com elas associadas por meio da supressão de microrganismos deletérios presentes no ambiente endofítico, seja por competição ou antibiose (Nejad e Johnson, 2000; Chen et al., 1995; Brooks et al., 1994).

Bactérias diazotróficas endofíticas promoveram incremento significativo no comprimento de raízes e teor de N na parte aérea de diferentes genótipos de trigo inoculados com estes microrganismos (Sala et al., 2005).

A inoculação de diferentes combinações de diazotróficas endofíticas (*Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia* sp), em plantas de cana-de-açúcar micropropagadas, promoveu incrementos significativos na massa seca de raízes, além de contribuírem para um aumento de, aproximadamente, 30% no teor de N nas plantas, por meio da FBN (Oliveira et al., 2002).

Estudos pioneiros sobre a contribuição de bactérias diazotróficas em bananeira foram realizados por Weber et al. (2000), os quais evidenciaram que espécies do gênero *Burkholderia* e *Herbaspirillum* promoveram melhorias significativas do crescimento de mudas micropropagadas e cultivadas, *in vitro*, em substrato pobre em N. Os autores também observaram que o maior crescimento

das mudas foi obtido quando estas foram tratadas com a coinoculação de isolados relacionados à *Burkholderia cepacia*.

Para realizar a fixação do N atmosférico, as bactérias diazotróficas utilizam o carbono lábil como fonte de energia. Porém, existe um grande número de macromoléculas orgânicas que também são fonte de carbono e, entretanto, não são imediatamente acessíveis a essas bactérias, como ocorre com as SH e o amido. Diante disso, o estudo de microrganismos decompositores da matéria orgânica, a exemplo das actinobactérias como foi descrito anteriormente, é importante para contribuir no suprimento energético necessário à fixação biológica de nitrogênio e sua melhor exploração na agricultura.

2.5 Tecnologia de bioinoculantes

Segundo o Relatório sobre a Situação da População Mundial em 2011, produzido pela Divisão de Informações e relações Externas do Fundo de População das Nações Unidas (UNFPA), o mundo comporta atualmente uma população em torno de 7 bilhões de pessoas (UNFPA, 2012). Essa marca foi atingida em apenas 12 anos após registro de 6 bilhões de pessoas e as projeções da Organização das Nações Unidas (ONU) é que esse número chegue a 8 bilhões em 13 anos (UNFPA, 2012). Diante desse crescimento, quase que exponencial, a produção de alimentos, bem como a segurança alimentar, constituem-se um desafio para todas as nações, sobretudo, àquelas em desenvolvimento.

No Brasil, embora os níveis de produtividade encontrem-se elevados e supram às demandas do mercado, as estratégias empregadas na agricultura moderna para este fim, em sua maioria, causam impactos danosos ao meio ambiente comprometendo a sustentabilidade dos ecossistemas agrícolas (IBGE, 2010). No âmbito dessa conjuntura, o uso sustentável dos recursos naturais como solo, água, ar, plantas, rochas e minerais, assim como o desenvolvimento de tecnologias alternativas que aumentem a eficiência dos sistemas produtivos são fundamentais para garantir o suprimento alimentar às gerações futuras.

Segundo a Lei nº 6894, de 16 de novembro de 1980, regulamentada pelo Decreto nº 4954, de janeiro de 2004, bioinoculante é o produto que contém microrganismos com ação favorável ao crescimento de plantas (Bucher e Reis,

2008). No Brasil, a utilização de bioinoculantes teve início desde 1950 (Freire, 1968) e um exemplo clássico é o emprego daqueles à base de bactérias diazotróficas do gênero *Bradyrhizobium* na cultura da soja, o qual chega a fornecer, de forma eficiente, mais de 90% do N requerido pelas cultivares mais produtivas, gerando ganhos econômicos de até 3 bilhões de dólares anuais ao país (Hungria et al., 2005).

A Embrapa Agrobiologia lançou, em 2008, o primeiro inoculante para cana-de-açúcar que é composto por um coquetel de 5 estirpes: *Herbaspirillum seropedicae* (BR11335), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR11504), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR11281T), *Burkholderia tropica* (BR11366T) e *Azospirillum amazonense* (BR11145) (EMBRAPA, 2012). Segundo a pesquisadora Verônica Massena Reis (contato pessoal), a economia com o uso do inoculante pode chegar a 50 mil toneladas de fertilizantes nitrogenados por ano no país, reduzindo os gastos nacionais com importações.

Em 2009, após sucessivas pesquisas desenvolvidas pela Embrapa Soja e a Universidade Federal do Paraná (UFPR) utilizando estirpes de *Azospirillum* na promoção de crescimento de milho e trigo, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) concedeu autorização das estirpes *A. brasilense* Ab-V4, Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7 para a produção de bioinoculantes para a cultura do milho, devido ao incremento que estas proporcionaram no rendimento de grãos de 24% a 30% em relação ao controle não inoculado (Hungria, 2011). O produto final foi um bioinoculante líquido comercial contendo *Azospirillum* e moléculas protetoras para as condições tropicais, lançado em 2010 e capaz de incrementar o rendimento médio de grãos em 26%.

A composição dos bioinoculantes encontra-se entre os vários fatores que afetam a sua eficiência (Bucher e Reis, 2008). A compatibilidade entre os microrganismos que constituem sua formulação, por exemplo, é crucial para maior amplitude da resposta esperada pela aplicação do bioinoculante (Drozdowicz, 1997; Gottlieb, 1973).

Bactérias diazotróficas endofíticas e actinobactérias do gênero *Streptomyces* representam grupos microbianos amplamente descritos na literatura como promotores do crescimento vegetal (Damasceno, 2011; Igarashi, 2004; Soares et al., 2010). Porém, a despeito da sua potencialidade como promotoras do crescimento de plantas, poucos trabalhos exploram o uso de

actinobactérias na formulação de bioinoculantes mistos com bactérias diazotróficas, fato que pode ser justificado pela elevada produção de compostos antagônicos por esses procariotos (Pereira et al., 1999). O estudo desse tipo de formulação é relevante, tendo em vista que actinobactérias podem atuar na decomposição de compostos orgânicos recalcitrantes (Yanagi et al., 2002), resultando em moléculas de carbono, possivelmente mais lábeis às bactérias diazotróficas. Por outro lado, a FBN pode contribuir consideravelmente para a diminuição da relação C:N de compostos orgânicos recalcitrantes, favorecendo sua decomposição por actinobactérias.

Ainda no que diz respeito à composição de bioinoculantes, a utilização do veículo adequado e a adição de materiais que favoreçam o bom desenvolvimento e multiplicação dos microrganismos são fundamentais para alcançar o número mínimo de células viáveis (1×10^9 células/g ou mL do bioinoculante) exigidos pelo MAPA. Nessa óptica, SH tem sido sugeridas como veículo de inoculação nessas composições (Castañeda Asturias, 1989; Corkidi, 2004) visto que sua aplicação promove o aumento da população de bactérias diazotróficas (Marques JR, 2006; Ndaw et al, 2011). Além disso, a bioatividade de SH em espécies vegetais de interesse agrícola tem sido descrita. Façanha et al. (2002) observaram o estímulo da síntese e atividade da $H^+ATPase$ da membrana plasmática de plantas de milho e café por ácidos húmicos de lodo de esgoto e ácidos húmicos de vermicomposto. Não obstante, Silva et al. (2011) verificaram atividade auxínica, além da indução de pelos radiculares e raízes laterais por ácidos húmicos isolados de turfeira.

Estes resultados servem como base para o desenvolvimento de pesquisas que contemplem novas formulações de bioinoculantes, como aquelas constituídas de bactérias diazotróficas e actinobactérias, considerando ainda SH como veículos e/ou aditivos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do solo e substrato orgânico

Para os ensaios de promoção de crescimento foram coletadas amostras de solo do horizonte B de um oxisol amarelo, em área experimental do Colégio Agrícola Antônio Sarlo, município de Campos dos Goytacazes, RJ. Também foi utilizado o substrato comercial de produção de mudas Vivatto[®] nestes ensaios.

3.2 Material Vegetal

Plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) cultivar Santa Clara e de milho (*Zea mays*) var. UENF 506 - 11 foram utilizadas como material vegetal nos ensaios de promoção de crescimento, por serem plantas modelo de resposta rápida a ensaios experimentais.

3.3 Agentes microbianos

As actinobactérias e a bactéria diazotrófica designada VM10, utilizadas neste trabalho de pesquisa, foram isoladas de diferentes tipos de vermicompostos por meio de diluição seriada e plaqueamento em meio sólido contendo AH (20 mg L⁻¹) como única fonte de carbono, conforme descrito por Aguiar (2012). Os demais agentes microbianos consistem nas seguintes bactérias diazotróficas: UENF 101

(*Burkholderia* sp); UENF 103 (*Burkholderia silvatlantica*); Pal5 (*Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5); HRC54 (*Herbaspirillum seropedicae* HRC54); RAM10 (*Herbaspirillum seropedicae* RAM 10). Todos estes microrganismos pertencem ao estoque do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT) do Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

Tabela 1: Isolados de actinobactérias e bactérias diazotróficas utilizados no presente estudo

Designação do Isolado	Origem do isolado	Referência
AC01	Vermicomposto de TG ¹	Aguiar (2012)
AC02	Vermicomposto de TG ¹	Aguiar (2012)
AC04	Vermicomposto de TG ¹	Aguiar (2012)
AC05	Vermicomposto de TG ¹	Aguiar (2012)
AC06	Vermicomposto de TG ¹	Aguiar (2012)
AC09	Vermicomposto de TG ¹	Aguiar (2012)
AC15	Vermicomposto de TF ²	Aguiar (2012)
AC19	Vermicomposto de TG ¹	Aguiar (2012)
AC31	Vermicomposto de TG ¹	Aguiar (2012)
VM10	Vermicomposto BC ³	Aguiar (2012)
<i>Burkholderia silvatlantica</i>	Cana-de-açúcar, milho e abacaxi	Perin et al. (2006)
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> Pal5	Colmo de cana-de-açúcar	Cavalcante e Döbereiner (1988)
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> HRC54	Raízes de cana-de-açúcar	Olivares (1997)
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> RAM10	Raízes de Arroz	Monteiro et al. (2008)

¹Torta de girassol; ²Torta de filtro de cana; ³Bagaço de cana

3.4 Ensaio de compatibilização entre isolados de actinobactéria e estirpes diazotróficas para produção de inóculo microbiano:

3.4.1 Observações morfológicas e estruturais de actinobactérias

Para conhecimento inicial das características morfológicas gerais das actinobactérias foram feitas observações das colônias, após o cultivo dos isolados em meio de cultivo sólido caldo nutriente (NB), inoculados na forma de *spots*, e incubados por sete dias em câmara de crescimento do tipo B.O.D. a $28 \pm 2^\circ$ C. Ao fim deste período, foi feita a observação das colônias que foram fotografadas com câmara digital Sony[®] Cyber Shot 7.2 Megapixels.

A estrutura e o arranjo das células actinobacterianas foram observadas em microscópio óptico Zeiss Axioplan. Para isso, em ambiente de fluxo laminar, as actinobactérias foram inoculadas em meio sólido NB na forma de estrias, utilizando-se alça de platina devidamente flambada. Lâminas para microscopia, previamente esterilizadas, foram introduzidas perpendicularmente ao meio NB com auxílio de pinça também esterilizada. As placas foram protegidas com parafilme e incubadas em câmara de crescimento tipo B.O.D. ($28^\circ\text{C} \pm 2$) por 30 dias. Após incubação, as lâminas foram observadas no microscópio empregando-se as técnicas de campo claro, contraste de fase e contraste interferencial.

As imagens obtidas foram comparadas com as contidas no Guia para Classificação de Streptomicetos (Pridham et al., 1958) (Figura 1), a fim de identificar isolados possivelmente relacionados ao gênero *Streptomyces*.

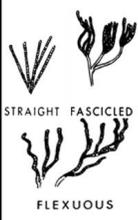
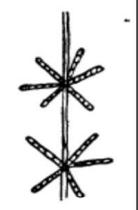
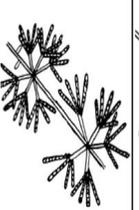
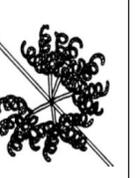
	1	2	3	4	5	6	7
Sessão (morfologia)	<i>Rectus - Flexibilis</i>	<i>Retinaculum - apertum</i>	<i>Spira</i>	<i>Monoverticillus</i>	<i>Monoverticillus - Spira</i>	<i>Biverticillus</i>	<i>Biverticillus</i>
							
Série (cor)							
	Branco	Oliva amarelado (amarelo ouro a oliva-amarelado)	Amarelo	Azul (azul ou azul esverdeado a verde)	Vermelho (cor de rosa, vermelho ou lavanda acinzentado)	Cinza (cinza claro ou cinza médio a marrom acinzentado ou cinza amarronzado)	

Figura 1: Chave para classificação de grupos de actinobactérias do gênero *Streptomyces* (Adaptado de Pridham et al., 1958)

3.4.2 Teste de antagonismo actinobactérias x bactérias diazotróficas

Foram empregadas 4 metodologias distintas, a fim de selecionar combinações microbianas compatíveis para a produção de inóculo.

3.4.2.1 Metodologia de Cuesta et al. (2010) modificada

Nove isolados de actinobactérias, provenientes de vermicomposto (Tabela 1), designados como AC01; AC02; AC04; AC05; AC06; AC09; AC15; AC19 e AC31, previamente selecionados quanto à capacidade de decompor substâncias húmicas, foram contrastados com 6 estirpes bacterianas fixadoras de nitrogênio codificadas como 101 UENF (*Burkholderia* sp); 103 UENF (*Burkholderia silvatlantica*); Pal5 (*Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5); HRC54 (*Herbaspirillum seropedicae* HRC54); RAM10 (*Herbaspirillum seropedicae* RAM 10) e VM10 (bactéria diazotrófica isolada de vermicomposto). O ensaio antagônico bacteriano foi feito, segundo a metodologia proposta por Cuesta et al. (2010) modificada. As bactérias diazotróficas foram cultivadas em meio de cultivo

DYG'S líquido (Döbereiner et al., 1995) por 36 horas em agitador orbital (140 rpm, 30°C). Após o crescimento 1 mL da cultura foi transferido, em ambiente de fluxo laminar, para tubos de ensaio contendo 15 mL de meio Caldo Nutriente (NB) sólido (40°C ± 2) e em seguida vertidos em placas de Petri esterilizadas. Quatro discos miceliais (6mm de diâmetro) dos isolados de actinobactéria cultivados durante 5 dias em meio NB sólido, em câmara de crescimento B.O.D. 28°C ± 2, foram sobrepostos, de forma equidistante, no meio contendo as bactérias diazotróficas. As placas foram protegidas com parafilme, incubadas em câmara de crescimento B.O.D. nas mesmas condições supracitadas e a presença de antagonismo foi verificada pela formação de um halo de inibição ao redor dos discos miceliais.

3.4.2.2 Multiplicação de estirpes diazotróficas em redor de colônias actinobacterianas

Dez microlitros de culturas das bactérias diazotróficas acima citadas, produzidas segundo Döbereiner et al. (1995), foram transferidos para placas de Petri, contendo meio NB, no qual haviam colônias estabelecidas das actinobactérias dispostas, equidistantemente, na forma de *spots* em quadruplicata. Cada cultura das bactérias diazotróficas foi distribuída em 3 pontos equidistantes em redor das colônias da actinobactéria distando 0,5 cm da colônia. As placas foram protegidas com parafilme e incubadas em câmara de crescimento B.O.D. 28°C ± 2 e a presença de antagonismo foi verificada pela formação de um gradiente de crescimento das bactérias diazotróficas ou pela ausência das mesmas.

3.4.2.3 Incubação de estirpes diazotróficas em extratos metabólicos das actinobactérias

Para obtenção dos extratos metabólicos, os isolados de actinobactérias AC01, AC04 e AC31 foram, inicialmente, cultivados em meio NB sólido e acondicionados em câmara tipo B.O.D. a 28±2°C por 5 dias. Posteriormente, 15 discos miceliais de 6 mm de diâmetro foram transferidos para frascos de Erlenmeyers com capacidade para 250 mL, contendo 100 mL de meio AGS

líquido e incubados por 10 dias em agitador orbital a 160 rpm e temperatura de $28\pm 2^{\circ}\text{C}$. Após incubação, o material foi centrifugado a 3000 rpm durante 50 minutos e, em seguida, filtrado em membrana de celulose $0,22\ \mu\text{m}$. Soluções com diferentes concentrações foram preparadas a partir da diluição ou não do extrato em água destilada esterilizada (concentrações finais: 100%; 10% e 1% do extrato).

As bactérias diazotróficas que se apresentaram mais compatíveis nos ensaios anteriores foram cultivadas, segundo a metodologia descrita no tópico acima e 100 μL de cada cultura foi transferido para microtubos, contendo 900 μL das diferentes diluições, os quais foram incubados por 36 horas em câmara tipo B.O.D. ($28\pm 2^{\circ}\text{C}$). O ensaio foi delineado inteiramente ao acaso e constituído tratamentos em esquema fatorial 3×3 (3 isolados de actinobactérias e 3 diluições) com 5 repetições e água destilada esterilizada foi empregada como controle. Após incubação, o material foi centrifugado (12.000 rpm por 10 minutos) e o pellet obtido foi ressuspenso por agitação em vortex em 100 μL de água destilada esterilizada. Este procedimento se repetiu por duas vezes para eliminação de resíduos de meio de cultura. O volume final foi corado com marcadores fluorescentes utilizando o LIVE/DEAD[®] BacLigthTM Bacterial Viability Kit. Amostras de 5 μL foram observadas em microscópio de epifluorescência Zeiss Axioplan e a contagem de células bacterianas viáveis (cor verde) e inviáveis (cor vermelha) foi realizada.

3.4.2.4 Coinoculação de actinobactérias e estirpes diazotróficas em meio semissólido

Os isolados de actinobactéria AC01, AC02, AC04, AC05, AC06, AC09, AC15 e AC31 foram cultivados durante 5 dias em meio NB sólido, em câmara de crescimento B.O.D. a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, foi extraído um disco micelial (6 mm de diâmetro) o qual foi inserido, com auxílio de alça de platina esterilizada, em meio JNFb semissólido contido em frascos de penicilina com capacidade para 15 mL. Em seguida, 50 μL da cultura de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 foram também inseridos no meio, inundando a superfície do disco micelial, com auxílio de pipeta automática. A compatibilidade entre os microrganismos foi observada pela formação da película aerotóxica típica da estirpe diazotróficas testada.

3.4.3 Teste de antagonismo actinobactérias x actinobactérias

A verificação de possível atividade antagônica entre as actinobactérias foi feita por meio da confrontação direta dos isolados, depositando-se discos miceliais de um dos isolados, cultivados durante 5 dias em meio NB sólido, em câmara de crescimento B.O.D. a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, na superfície de cultura dos outros isolados crescidos nas mesmas condições. A presença de antagonismo foi verificada pela formação de um halo de inibição ao redor dos discos miceliais.

3.5 Caracterização fisiológica das actinobactérias

As actinobactérias foram caracterizadas quanto à produção de enzimas extracelulares e a determinação do índice enzimático (IE) foi feita utilizando-se a seguinte equação: $IE = Dh/Dc$. Sendo Dh o diâmetro do halo de hidrólise e Dc o diâmetro da colônia das actinobactérias. A análise de variância dos dados foi realizada no programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2000), no qual também foi feita a comparação das médias dos IE pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

3.5.1 Produção de xilanase e celulase

As atividades celulolítica e xilanolítica das actinobactérias foram avaliadas segundo Lewis (1988), utilizando meio de cultivo sólido Mínimo de sais (Tuite, 1969), suplementado com metilcelulose ou xilana, como única fonte de carbono. As actinobactérias foram inoculadas nesse meio na forma de *spots*, em quadruplicata, e incubadas em câmara de crescimento tipo B.O.D., $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 10 dias. Após a incubação, foram adicionados 10 mL da solução de vermelho congo a 0,5% em cada placa, deixando-se agir por 15 minutos sob temperatura ambiente. Posteriormente, o excesso da solução foi drenado e 10 mL de solução de NaCl (1 M) foram adicionados em cada placa, deixando-se agir por 30 minutos

a temperatura ambiente. Após a remoção do excesso de solução salina, foi feita a observação de zonas de hidrólise em torno das colônias.

3.5.2 Produção de lipase

Para avaliar a produção de lipase, as actinobactérias foram inoculadas na forma de *spots* e em quadruplicata, no meio Sierra (1957), contendo Tween 80 como fonte de carbono. Em seguida foram incubadas em câmara de crescimento tipo B.O.D., $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 10 dias. A produção da enzima foi verificada pela observação de um halo branco difuso, constituído de minúsculos precipitados de oleato de cálcio, circundando o crescimento das colônias.

3.5.3 Produção de catalase

Para determinar a produção da enzima catalase, as actinobactérias foram multiplicadas em meio de cultura NB, segundo metodologia proposta por Mariano et al. (2000) modificada. As placas foram incubadas em câmara de crescimento tipo B.O.D., $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ por dez dias. Após esse período, amostras das colônias foram transferidas na forma de “esfregaços”, com auxílio de alça de platina esterilizada, para lâminas de microscopia. Algumas gotas de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foram adicionadas sobre o “esfregaço” e a reação positiva foi evidenciada pela formação de bolhas imediatamente após a adição do peróxido de hidrogênio (Mariano et al., 2000).

3.5.4 Produção de amilase

A produção de amilase foi determinada conforme descrito por Coon et al. (1957) modificada. As actinobactérias foram inoculadas na forma de *spots* e em quadruplicata no meio de cultura Agar-amido, constituído de 6,6% de amido solúvel. Posteriormente, as culturas foram incubadas em câmara de crescimento tipo B.O.D., a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 10 dias. Após o crescimento das colônias, foram adicionados 10 mL da solução de lugol nas placas. A produção da enzima

amilase foi detectada pela descoloração do meio em torno da colônia, devido à hidrólise do amido.

3.6 Alteração da estrutura supramolecular de ácidos húmicos pelas actinobactérias

Em estudos anteriores foi feito um ensaio para isolamento de microrganismos que utilizam ácido húmico (AH) como fonte de carbono. Foi idealizado um meio de cultura com AH isolado de vermicomposto de esterco de curral (AH, 25 mg C L⁻¹); K₂HPO₄ (0,6 g L⁻¹); KH₂PO₄ (1,8 g L⁻¹); MgSO₄.7H₂O (0,2 g L⁻¹); NaCl (0,1 g L⁻¹); CaCl₂.2H₂O (0,02 g L⁻¹); FeEDTA (solução 1,64%) (4 ml L⁻¹); solução de micronutrientes (2 ml L⁻¹); solução vitaminas (1 ml L⁻¹); 20 mg de extrato de levedura; pH 6,5; 15 g L⁻¹ de Agar. Neste meio foram inoculadas as diluições 10⁻³ e 10⁻⁴ obtidas de diferentes vermicompostos (esterco bovino; bagaço de cana + esterco bovino; torta de girassol + esterco bovino; bagaço de cana + torta de girassol + esterco) (Aguiar, 2012).

Para avaliar a capacidade de alterar a supraestrutura húmica foram utilizados os isolados AC01, AC04 e AC05. Para a preparação do inóculo, as actinobactérias foram inicialmente multiplicadas em meio sólido NB e incubadas por um período de 5 dias, em câmara de crescimento B.O.D. a 28±2°C. Posteriormente, discos miceliais de 6 mm de diâmetro serão extraídos da cultura e transferidos para frascos de Erlenmeyers contendo arroz autoclavado (Sousa, 2006) e incubados por 7 dias, em câmara de crescimento B.O.D. a 28±2°C.

Os AH utilizados foram extraídos de vermicomposto como segundo a metodologia proposta por Ceretta (1995) e foram diluídos em 50 mL de meio de cultivo líquido composto pelos sais do meio JNFb (concentração final de AH 0,01% e pH 6,8), contido em frascos de Erlenmeyers com capacidade para 250 mL. O meio foi autoclavado a 120°C por 20 minutos. A suspensão de esporos dos isolados foi obtida a partir de 5 g do arroz colonizado em 50 mL de água destilada e 1 mL dessa suspensão foi pipetado no meio com AH. Após inoculação foi feita a incubação em agitador orbital a 160 rpm e temperatura de 28±2°C por 21 dias. Após este período, o meio foi filtrado em membrana de celulose com 0.22 µm de diâmetro.

Uma alíquota de 5 mL de cada tratamento foi retirada e submetida à análise por cromatografia líquida de alta eficiência por exclusão de tamanho (CLAE), no sistema YoungLin Acme 9000 (Seul, Korea). A separação por exclusão de tamanho deu-se através da coluna BioSep- SEC S200 Phenomenex, com 300 mm de comprimento, 7,8 mm de diâmetro interno e 5 µm de diâmetro de poros. A pré-coluna Polysep-GFC-Guard Column, com 35 mm de comprimento, 7,8 mm de diâmetro interno e 0,2 µm de diâmetro de poros, foi usada para proteger a coluna de possíveis contaminações presentes nas amostras. Foi utilizado o tampão fosfato (NaH_2PO_4 0,0625 mol L⁻¹, pH 7,0 e força iônica 0,104 mol L⁻¹) como eluente (fase móvel), com fluxo de 1,5 mL min⁻¹ em alta pressão.

Parte do material restante foi reservada para análises posteriores e a outra parte foi submetida à análise espectroscópica na região do infravermelho com transformada de Fourier e reflectância difusa (IVTF/DRFIT) em espectrômetro (Shimadzu, Prestige 21). Os tratamentos avaliados foram: Controle absoluto (meio líquido); controle relativo (meio líquido com AH); T1 (meio com AH + AC01); T2 (meio com AH + AC04); T3 (meio com AH + AC05); todos os tratamentos foram inteiramente casualizados em 3 repetições.

3.7 Uso de compostos alterados por actinobactérias como fonte de carbono para bactérias diazotróficas

Herbaspirillum seropedicae HRC54 e *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 foram testadas quanto à capacidade de se multiplicarem em meios contendo AH ou amido, inicialmente cultivados com isolados compatíveis de actinobactérias, como única fonte de carbono.

3.7.1 Amido (macromolécula)

Os isolados de actinobactéria AC02, AC05, AC15 e AC31, selecionados pela alta performance nos ensaios de produção de amilase, foram inoculados na forma de spots e em quadruplicata no meio de cultura Agar-amido. Posteriormente, as culturas foram incubadas em câmara de crescimento tipo B.O.D., a 28±2°C por 10 dias.

Um mililitro de culturas das bactérias diazotróficas, produzidas segundo Döbereiner et al. (1995), foi transferido para microtubos com capacidade de 1,5 mL. O material foi centrifugado (12.000 rpm por 10 minutos) e o pellet obtido foi ressuspensão por agitação em vortex em 100 µL de água destilada esterilizada. Este procedimento se repetiu por duas vezes para eliminação de resíduos de meio de cultura. Sob fluxo laminar, gotículas de 3 µL do volume final das culturas foram distribuídas em redor das colônias das actinobactérias a 0,5 e 2,0 cm de distância de cada colônia. A distribuição das gotículas foi feita em duplicata e a maior multiplicação das estirpes diazotróficas, nas regiões mais próximas à colônia, foi o parâmetro para diagnosticar a ocorrência de sucessão ecológica.

3.7.2 Ácido húmico (supramolécula) em meio líquido

Os filtrados restantes do meio contendo AH como única fonte de carbono, após incubação com os isolados AC01, AC04 e AC05, citado no tópico 3.4, tiveram o pH ajustados para 6,0 e foram distribuídos em tubos de ensaio esterilizados, com capacidade para 5 mL (volume final 3 mL/tubo).

Quinhentos microlitros de culturas de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54, produzida segundo Döbereiner et al. (1995), foram transferidos para microtubos esterilizados com capacidade de 1,5 mL. O material foi centrifugado (12.000 rpm por 10 minutos) e o pellet obtido foi ressuspensão por agitação em vortex em 500 µL de água destilada esterilizada, sendo este procedimento repetido por mais uma vez para eliminação de resíduos de meio de cultura. Por fim, o pellet foi ressuspensão em 1 mL de água, do qual foi retirada uma alíquota de 10 µL e transferida para novos microtubos contendo 990 µL de água destilada esterilizada, para diluir o inóculo. Considerando que o inóculo inicial apresentava 10^9 unidades formadoras de colônia (u.f.c.), esse procedimento se repetiu até obtenção 10^5 u.f.c.. Uma alíquota de 10 µL desta última diluição foi transferida para os tubos de ensaio contendo os filtrados de meio JNFb + AH. Os tubos foram incubados em agitador orbital (160 rpm). Os tratamentos empregados foram: controle positivo (meio de cultivo contendo 1 g de ácido málico L⁻¹), controle negativo (meio de cultivo sem adição de carbono), T1 (meio de cultivo contendo ácidos húmicos previamente incubados com AC01), T2 (meio de cultivo contendo ácidos húmicos previamente incubados com AC04) e T3 (meio de cultivo

contendo ácidos húmicos previamente incubados com AC05), com 4 repetições. Após 24 e 96 horas, alíquotas de 500 µL foram retiradas para quantificação das bactérias por meio de diluição seriada seguida de contagem pelo método do número mais provável (NMP).

3.7.3 Ácido húmico (supramolécula) em meio semissólido

Vinte e cinco microlitros dos filtrados citados acima foram adicionados ao meio de cultivo semissólido JNFb (40°C ± 2) distribuído em frascos de penicilina (5 mL / frasco) e isento de carbono. A cultura de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 foi produzida segundo Döbereiner et al. (1995) e o inóculo foi diluído até 10⁵ u.f.c. semelhante à forma descrita no tópico anterior.

Os tratamentos empregados foram: controle positivo (meio de cultivo contendo 5 g de ácido málico L⁻¹), controle negativo (meio de cultivo sem adição de carbono), T1 (meio de cultivo contendo ácidos húmicos previamente incubados com AC01), T2 (meio de cultivo contendo ácidos húmicos previamente incubados com AC04) e T3 (meio de cultivo contendo ácidos húmicos previamente incubados com AC05), com 4 repetições.

3.8 Promoção de crescimento vegetal por actinobactérias e estirpes diazotróficas

3.8.1 Extratos metabólicos das actinobactérias na germinação de sementes de milho (*Zea mays*)

De posse dos extratos metabólicos das actinobactérias, obtidos conforme metodologia descrita no tópico 3.2.1.3, foi feita uma solução a partir da diluição de 1 mL do extrato em 9 mL de água destilada esterilizada (concentração final de 10% do extrato).

Sementes de milho var. UENF 506 – 11 foram superficialmente desinfestadas por meio de imersão em soluções de álcool 70% por 5 minutos e hipoclorito de sódio (1%) por 2 minutos, seguidas de 6 lavagens consecutivas com água destilada esterilizada. As sementes foram distribuídas sobre papel germitest esterilizado e umedecido com 10 mL da solução do extrato e contido em

caixas esterilizadas do tipo gerbox. O ensaio foi constituído de 11 tratamentos: 9 isolados de actinobactérias e 2 controles (água destilada esterilizada e meio de cultura líquido AGS) inteiramente casualizado, com 3 repetições, cada repetição contendo 20 sementes. As caixas foram acondicionadas em câmara do tipo B.O.D., sob temperatura de $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ e o número de sementes germinadas foi quantificado em períodos de 24, 32, 40, 48 e 56 horas após acondicionamento.

O percentual de sementes germinadas foi obtido a partir da seguinte equação: $\text{GR (\%)} = a/b \times 100$. Sendo GR a média de germinação, a o número de sementes germinadas e b o número de sementes totais. O resultado final foi submetido à análise de variância e a comparação de médias foi realizada pelo teste t (LSD) a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2000).

3.8.2 Efeito da coinoculação actinobactérias e bactérias diazotróficas no crescimento de plantas de milho (*Zea mays*)

Sementes de milho (*Zea mays*) var. UENF 506-11 foram desinfestadas por meio de imersão em soluções de álcool 70% por 5 minutos e hipoclorito de sódio por 2 minutos, seguidas de 6 lavagens consecutivas com água esterilizada. Em seguida, foram hidratadas por 4 horas em água esterilizada. Posteriormente, foram semeadas em substrato tipo solo (Oxisol amarelo) e areia (1:1), previamente esterilizado por 2 autoclavagens com duração de 2 horas cada, com intervalo de 48 horas, distribuídos em potes de polietileno com capacidade para 500 mL. As actinobactérias foram inicialmente cultivadas em meio NB sólido e acondicionadas em câmara tipo B.O.D. a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 5 dias. Posteriormente, discos miceliais de 6 mm de diâmetro foram transferidos para arroz autoclavado (Sousa, 2006) e incubado nas condições anteriores. Após incubação foi feita a suspensão de 5 g do arroz em 50 mL de água destilada.

A coinoculação foi feita por meio do recobrimento das sementes com 1 mL de um *mix* da suspensão com actinobactérias e 1 mL de um *mix* da cultura das estirpes diazotróficas, obtida de acordo com a metodologia descrita por Döbereiner et al. (1995). O ensaio foi inteiramente casualizado com 4 tratamentos: controle (sem microrganismos); T1 (AC01, AC04 e AC31); T2 (*Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 e *Herbaspirillum seropedicae* HRC54) e

T3 (coinoculação AC01, AC04, AC31, *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 e *Herbaspirillum seropedicae* HRC54), com 4 repetições. O ensaio foi conduzido em casa de vegetação por 25 dias e a umidade do solo mantida na capacidade de campo. Ao fim deste período, as plantas foram coletadas avaliando-se o número de folhas, altura com auxílio de uma régua milimetrada, área foliar por meio do medidor Modelo LI-3100, Li-cor, Lincoln, NE, USA e intensidade de verde utilizando o aparelho SPAD-502, Minolta, Japão. A parte aérea e raízes das plantas foram acondicionadas em estufa com ventilação forçada a 65°C, até atingir massa constante e, posteriormente, pesada em balança analítica. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e a comparação de médias foi realizada pelo teste t (LSD) a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico SISVAR 4.0.

3.8.3 Coinoculação de actinobactérias e *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 no crescimento de plântulas de tomate (*Solanum lycopersicum*)

Este ensaio foi conduzido em condições axênicas, em delineamento experimental inteiramente casualizado, sendo avaliados 3 isolados de actinobactérias e a estirpe diazotrófica *Hesbaspirillum seropedicae* HRC54, inoculados de forma isolada ou em combinação, com 4 repetições. Os tratamentos foram os seguintes: Controle; T1 (*Hesbaspirillum seropedicae* HRC54); T2 (AC01); T3 (AC01 + *Hesbaspirillum seropedicae* HRC54); T4 (AC04); T5 (AC04 + *Hesbaspirillum seropedicae* HRC54); T6 (AC31); T7 (AC31 + *Hesbaspirillum seropedicae* HRC54). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e a comparação de médias foi realizada pelo teste t (LSD) a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico SISVAR 4.0.

3.8.3.1 Colonização do substrato comercial Vivatto® por actinobactérias

Inicialmente, os isolados de actinobactérias AC01, AC04 e AC31 foram cultivados em arroz autoclavado, conforme metodologia de Sousa (2006). Uma suspensão foi obtida a partir da lavagem de 5g do arroz colonizado em 50 mL de água destilada esterilizada. Dez mililitros da suspensão foram usados para a infestação de cada 400 cm³ do substrato comercial Vivatto®, previamente

autoclavado. O substrato foi incubado por 45 dias, à temperatura ambiente ($28 \pm 2^\circ\text{C}$), em sacos de polietileno. A umidade do substrato foi mantida com a adição de água destilada autoclavada.

Após o período de incubação, amostras do substrato foram submetidas à análise química para avaliação de possíveis alterações nos teores nutricionais do substrato promovidas pela incubação com as actinobactérias. O substrato foi distribuído em tubos de ensaio esterilizados, com capacidade de 60 mL (30 g / tubo). A capacidade de colonização do substrato Vivatto[®] pelos isolados de actinobactérias testados foi verificada, fazendo-se a contagem por meio de diluição seriada, seguida de plaqueamento em meio de cultivo sólido NB.

3.8.3.2 Promoção de crescimento de tomate em sistema axênico

Sementes de tomate (*Solanum lycopersicum*) foram desinfestadas por meio de imersão em soluções de álcool 70% por 3 minutos e hipoclorito de sódio por 1 minuto, seguidas de 6 lavagens consecutivas com água destilada esterilizada. Após desinfestada, as sementes foram transferidas, com auxílio de pinça esterilizada, para placas de Petri, contendo meio de cultivo Agar-água com 0.6% de agar. As placas foram mantidas em câmara de crescimento sem luz, a 28°C até a emissão da radícula (período de 3 a 4 dias). Após a emissão da radícula, as sementes foram transferidas para os tubos contendo o substrato orgânico. O ensaio foi mantido em sala de crescimento a 26°C .

A coleta das plântulas foi realizada 15 dias após a semeadura, avaliando-se os seguintes parâmetros biométricos: altura com auxílio de uma régua milimetrada; área foliar por meio do medidor Modelo LI-3100, Li-cor, Lincoln, NE, USA; intensidade de verde utilizando o aparelho SPAD-502, Minolta, Japão; massa fresca da raiz e parte aérea com balança analítica e número de raízes laterais com auxílio de pinça esterilizada. Amostras das raízes das plantas foram retiradas para quantificação das bactérias diazotróficas por meio de diluição seriada, seguida de contagem pelo método do número mais provável (NMP). O plaqueamento das diluições em meio de cultivo sólido NB também foi realizado para verificar a presença das actinobactérias.

A parte aérea e o restante das raízes foram acondicionados em estufa com ventilação forçada a 65°C , até atingir massa constante e, posteriormente, pesada

em balança analítica. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e a comparação de médias foi realizada pelo teste t (LSD) a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico SISVAR 4.0.

3.9 Análise estatística dos dados

Os dados foram analisados utilizando o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2000), sendo realizada a análise de variância e, em seguida, a comparação das médias pelos testes de Skott & Knott ou t (LSD) ambos a 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização das colônias e observação microscópica de actinobactérias

A partir da observação das colônias dos isolados de actinobactéria cultivadas em meio NB (Figura 2) foi feita a caracterização quanto à cor apresentada, de acordo com a classificação proposta por Pridham et al. (1958), sendo que 33,3% dos isolados apresentaram coloração Azul, 22,2% Branca, 22,2% Cinza e 11,1% Vermelha (Tabela 2). A caracterização morfológica das colônias destes isolados, com base na classificação de Perin (2003), é descrita por Aguiar (2012) que identificou a forma circular, elevação pulvinada, bordo inteiro, superfície rugosa das colônias, características que podem ser observadas na Figura 2.

A análise microscópica das actinobactérias, também cultivadas em meio sólido NB, evidenciou o seu crescimento micelial e a ocorrência das estruturas de resistência, os esporos (Figura 3). A morfologia das cadeias de esporos dos isolados apresentou grande semelhança com aquelas sugeridas por Pridham et al. (1958) para classificar grupos do gênero *Streptomyces*, havendo predominância da forma flexuosa entre os isolados (Tabela 2). Além disso, todos os isolados observados apresentaram micélio de substrato bastante ramificado e também micélio aéreo que são características do gênero (Li et al., 2009). Diversas tentativas para extração do DNA genômico e sequenciamento do 16S rDNA foram feitas, porém sem sucesso, devido às especificidades na composição celular

desses microrganismos (Rong e Huang, 2010). No entanto, outras tentativas serão feitas para confirmação da posição taxonômica dos isolados. Embora não apresente o alto nível de precisão da técnica molecular de identificação, a morfologia do esporóforo é confiável, pois, sua estrutura pouco varia com as oscilações ambientais (Pridham et al., 1958). Assim, é sugerido que as actinobactérias deste estudo pertençam ao gênero *Streptomyces*.

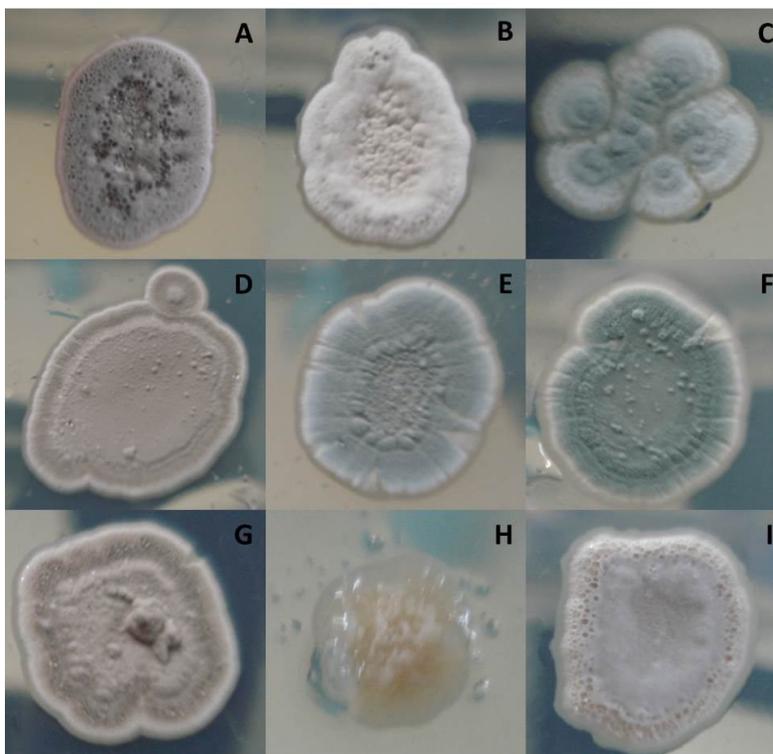


Figura 2: Imagens de colônias das actinobactérias cultivadas em meio NB sólido (.A: AC01; B: AC02; C: AC04; D: AC05; E: AC06; F: AC09; G: AC15; H: AC19; I: AC31).

Tabela 2: Classificação morfológica das actinobactérias, segundo Pridham et al. (1958)

Isolado	Origem	Forma do esporóforo	Cor do micélio
AC01	Vermicomposto TG ¹	<i>Spira</i> - espirais abertos	Vermelho
AC02	Vermicomposto TG ¹	<i>Rectus flexibilis</i> - Flexuoso	Branco
AC04	Vermicomposto TG ¹	<i>Rectus flexibilis</i> - Flexuoso	Azul
AC05	Vermicomposto TG ¹	<i>Rectus flexibilis</i> - Flexuoso	Cinza
AC06	Vermicomposto TG ¹	<i>Rectus flexibilis</i> - Flexuoso	Azul
AC09	Vermicomposto TG ¹	<i>Rectus flexibilis</i> - Flexuoso	Azul
AC15	Vermicomposto TF ²	<i>Rectus flexibilis</i> - Reto	Cinza
AC31	Vermicomposto TG ¹	<i>Rectus flexibilis</i> - Flexuoso	Branco

¹Torta de girassol; ²Torta de filtro de cana

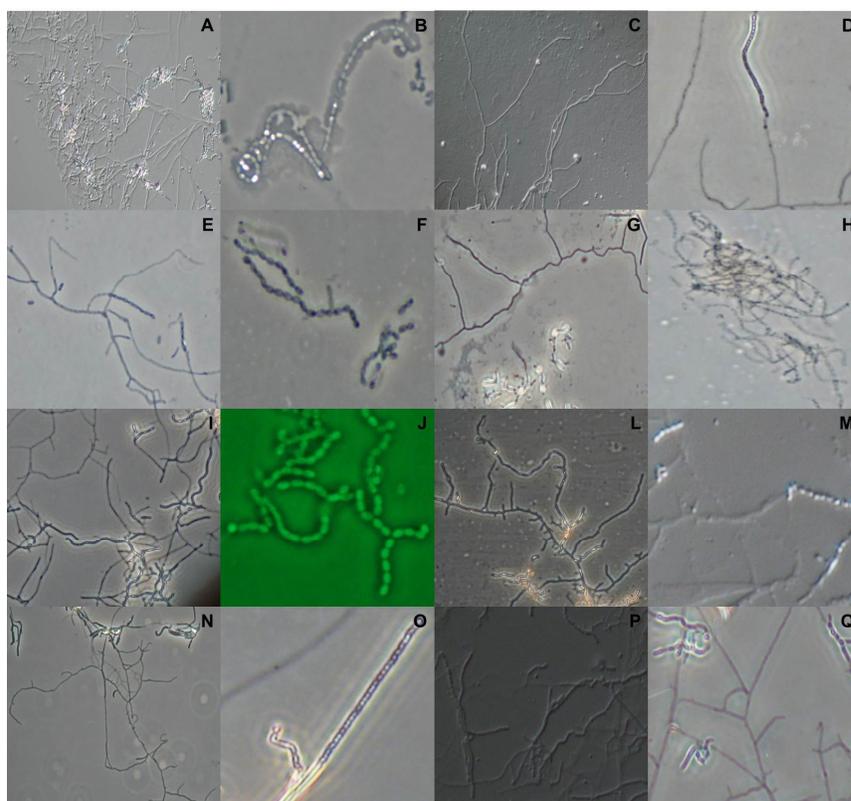


Figura 3: Microscopia óptica de contraste de fase (B, D, E, F, G, H, I, J, L, N, O, Q) e contraste interferencial (A, C, M e P). Visão geral do micélio (A: AC01; C: AC02; E: AC04; G: AC05; I: AC06; L: AC09; N: AC15 e P: AC31) e cadeia de esporos (B: AC01; D: AC02; F: AC04; H: AC05; J: AC06; M: AC09; O: AC15 e Q: AC31).

O gênero *Streptomyces* é constituído de actinobactérias produtoras, em sua maioria, de diversos compostos bioativos, principalmente antibióticos, enzimas líticas e agentes farmacologicamente ativos (Xu et al., 2004). Diante disso, estudos com procariotos desse gênero com vias à PCV são importantes para sugerir sua utilização como insumo biológico na agricultura.

4.2 Seleção de actinobactérias e estirpes diazotróficas compatíveis

O resultado do teste de compatibilidade entre as bactérias diazotróficas e os isolados de actinobactéria, empregando-se a metodologia de Cuesta et al. (2010) com modificações, é representado na Tabela 3. Neste método, foi possível identificar a predominância de interações antagônicas entre os isolados e as estirpes de *Burkholderia silvatlantica* UENF 101 e UENF 103, verificada pela formação do halo de inibição. A estirpe *Herbaspirillum seropedicae* Ram10, por sua vez, apresentou unicamente relações mutualísticas com todos isolados de actinobactérias (Figura 4).

Tabela 3: Resultado do ensaio de compatibilidade entre bactérias diazotróficas e isolados de actinobactéria baseado no método de Cuesta et al. (2010) modificado

Actinobactérias	Estirpes diazotróficas					
	UENF 101	UENF 103	Pal 5	HRC 54	RAM 10	VM 10
AC01	I	C	C	C	C	C
AC02	I	C	I	C	C	C
AC04	I	C	C	C	C	C
AC05	I	I	I	I	C	I
AC06	I	C	C	C	C	C
AC09	I	C	C	C	C	C
AC15	I	I	I	I	C	I
AC19	C	C	I	C	C	I
AC31	C	C	C	C	C	C

C: compatíveis; I: incompatíveis

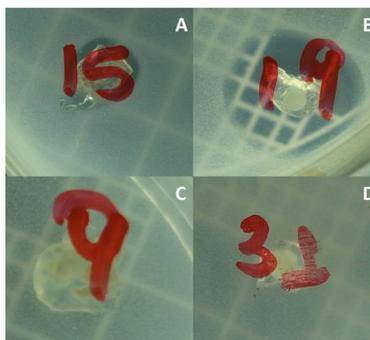


Figura 4: Teste de compatibilidade entre actinobactérias e bactérias diazotróficas, segundo metodologia de Cuesta et al. (2010) modificada. Halo de inibição de *B. silvatlantica* UENF 103 confrontada com o isolado AC15 (A) e de *G. diazotrophicus* Pal5 confrontada com o isolado AC19 (B). Compatibilidade entre *H. seropedicae* HRC54 confrontada com os isolados AC09 e AC31 (C e D).

Na Tabela 4 e Figura 5 estão dispostos os resultados do ensaio de compatibilidade entre os isolados actinobactéria e as bactérias diazotróficas, realizado, segundo a metodologia de multiplicação das estirpes diazotróficas em redor das colônias actinobacterianas. Neste ensaio, foi observado antagonismo, caracterizado pela não multiplicação das bactérias diazotróficas ou por um gradiente de crescimento (Figura 5), entre as estirpes de *Burkholderia silvatlantica* UENF 101 e UENF 103 e os isolados testados, com exceção de AC02.

Tabela 4: Resultado do ensaio de compatibilidade entre bactérias diazotróficas e os isolados de actinobactérias, baseado no método de multiplicação das bactérias em redor das colônias actinobacterianas

Actinobactérias	Estirpes diazotróficas					
	UENF 101	UENF 103	Pal 5	HRC 54	RAM 10	VM 10
AC01	I	I	C	C	C	C
AC02	I	C	I	C	C	C
AC04	I	I	C	I	C	C
AC05	I	I	I	I	I	I
AC06	I	I	C	C	C	C
AC09	I	I	C	C	C	C
AC15	I	I	I	I	C	I
AC19	I	I	I	I	I	I
AC31	I	I	C	C	C	C

C: compatíveis; I: incompatíveis

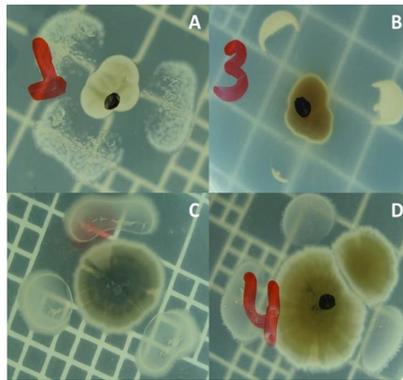


Figura 5: Teste de compatibilidade entre actinobactérias e bactérias diazotróficas, segundo metodologia de multiplicação de estirpes diazotróficas em redor das colônias actinobacterianas. Gradiente de crescimento de *B. silvatlantica* UENF 101 confrontada com o isolado AC31 (A) e de *H. seropedicae* HRC54 confrontada com o isolado AC04 (B). Compatibilidade de estirpe VM10, isolada de vermicomposto, confrontada com AC09 (C) e de *G. diazotrophicus* Pal5 confrontada com o isolado AC04 (D).

No ensaio de compatibilidade em que se empregou o método de incubação de estirpes diazotróficas em extrato líquido, contendo os metabólitos da actinobactérias observou-se que, em termos gerais, a viabilidade celular das bactérias diazotróficas, após incubação com período de 36 horas, variou na ordem de 0 a 40% de mortalidade (Tabela 5). Essa diagnóstica foi feita a partir da observação, em microscópio óptico de epifluorescência, da coloração verde que representa a viabilidade celular ou da coloração vermelha que indica inviabilidade devido à ocorrência de possíveis danos na parede celular das bactérias (Figura 6).

A incubação da estirpe *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 com os extratos metabólicos dos isolados de actinobactéria AC01, AC04, e AC31 resultou em números de células inviáveis, semelhantes aos encontrados no controle (Tabela 5), evidenciando a compatibilidade entre estes microrganismos a nível celular. A estirpe *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5, por sua vez, demonstrou ser mais sensível à ação dos extratos, diferindo em até 25,9% do controle, indicando moderado grau de incompatibilidade. No entanto, deve-se também

considerar que estes microrganismos apresentam ciclo de vida curto o qual dura em torno de 48 horas, o que também contribui para a morte de algumas células.

Tabela 5: Efeito de extratos metabólicos das actinobactérias na viabilidade celular de bactérias diazotróficas (percentual de mortalidade)

Tratamento	Concentrações dos extratos					
	Bruto		10%		1%	
	HRC54 (%)	PAL5 (%)	HRC54 (%)	PAL5 (%)	HRC54 (%)	PAL5 (%)
Controle	13 ± (0,02)	14,1 ± (0,04)	----	----	----	----
AC01	12 ± (0,03)	15,5 ± (0,04)	5,7 ± (0,01)	33,8 ± (0,01)	11,9 ± (0,03)	40,0 ± (0,07)
AC04	3,6 ± (0,03)	13,5 ± (0,03)	0,0 ± (0,0)	31,4 ± (0,05)	26,0 ± (0,04)	31,5 ± (0,04)
AC31	9,6 ± (0,02)	29,1 ± (0,04)	23,2 ± (0,02)	31,4 ± (0,04)	18,4 ± (0,02)	36,2 ± (0,06)

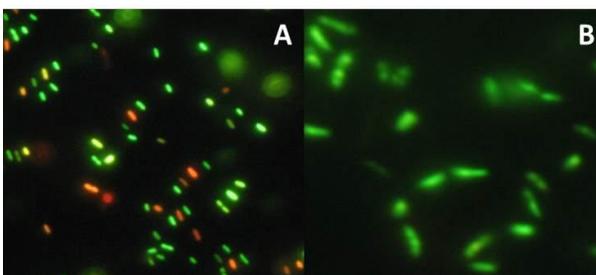


Figura 6: Viabilidade celular de *G. diazotrophicus* Pal5 (A) e de *H. seropedicae* HRC54 (B), após incubação por 36 horas em extrato metabólico bruto de AC01, evidenciada por microscopia de fluorescência utilizando o LIVE/DEAD® BacLigth™ Bacterial Viability Kit.

No ensaio de coinoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 e os isolados de actinobactérias em meio semissólido, a compatibilidade desta estirpe com os isolados foi novamente evidenciada, desta vez, pela formação da película aerotóxica característica da fixadora de nitrogênio na presença de todos os isolados avaliados (Figura 7). Além disso, algumas actinobactérias apresentaram considerável crescimento micelial na superfície das películas, evidenciando o favorecimento desses microrganismos com o N fixado pelas bactérias, o que

permite pressupor uma relação de sucessão ecológica entre algumas combinações.

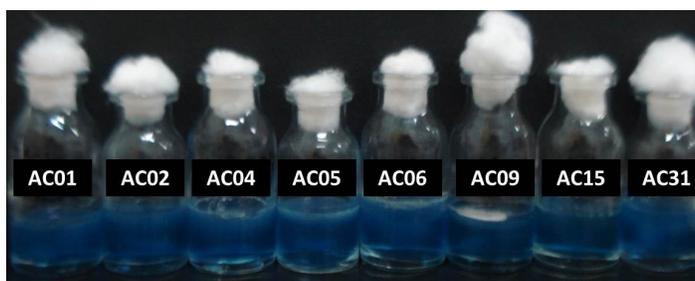


Figura 7: Compatibilidade entre *H. seropedicae* HRC54 confrontada com os isolados AC01, AC02, AC04, AC05, AC06, AC09, AC15 e AC31, evidenciada pelo seu crescimento e formação de película em meio JNFb semissólido na presença de actinobactérias.

O resultado do ensaio de compatibilidade entre os isolados de actinobactérias, utilizando o método de confrontação direta dos isolados está representado na Tabela 6. A maioria dos isolados apresentaram interações mutualísticas, evidenciadas pela ausência de halo de inibição (Figura 8).

Tabela 6: Resultado do ensaio de compatibilidade entre isolados de actinobactérias, baseado no método de antagonismo em confrontação direta

	AC01	AC02	AC04	AC05	AC06	AC09	AC15	AC19	AC31
AC01	C	I	C	I	C	C	I	I	C
AC02	I	C	C	C	C	C	C	C	C
AC04	C	C	C	I	C	C	I	C	C
AC05	I	C	I	C	C	C	C	C	C
AC06	C	C	C	C	C	C	I	I	C
AC09	C	C	C	C	C	C	I	I	C
AC15	I	C	I	C	I	I	C	C	C
AC19	I	C	C	C	I	I	C	C	C
AC31	C	C	C	C	C	C	C	C	C

C: compatíveis; I: incompatíveis

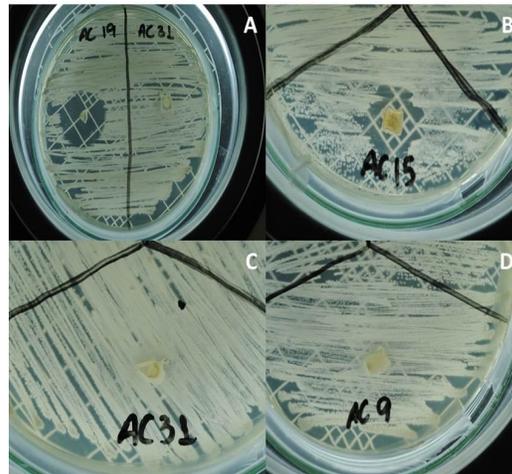


Figura 8: Teste de compatibilidade entre actinobactérias utilizando método de confrontação direta. Halo de inibição de AC09 quando confrontados com AC19 (A) ou AC15 (B). Compatibilidade entre AC31 e AC09 confrontados com AC02 (C e D).

Em termos gerais, a bactéria diazotrófica VM10, isolada de vermicomposto de bagaço de cana, e as estirpes *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5, *Herbaspirillum seropedicae* RAM10 e *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 foram as que apresentaram maior número de relações mutualísticas com as actinobactérias testadas (Tabela 7). As actinobactérias, em sua maioria, apresentaram compatibilidade entre si (Tabela 6). Uma particularidade foi observada nos ensaios com o isolado AC31 que se mostrou compatível não só com todos os demais isolados de actinobactérias como, também, com as quatro estirpes diazotróficas mencionadas acima.

Todas as metodologias empregadas mostraram-se eficientes para identificar relações antagônicas e mutualísticas entre os isolados de actinobactérias e as estirpes diazotróficas. Em resumo, foram considerados incompatíveis os microrganismos que apresentaram antagonismo em pelo menos um dos métodos empregados.

Tabela 7: Resultado geral dos ensaios de compatibilidade entre actinobactérias e bactérias diazotróficas baseadas nas diferentes metodologias empregadas

Actinobactérias	Estirpes diazotróficas					
	UENF 101	UENF 103	Pal 5	HRC 54	RAM 10	VM 10
AC01	I	I	C	C	C	C
AC02	I	C	I	C	C	C
AC04	I	I	C	I	I	C
AC05	I	I	I	I	I	I
AC06	I	I	C	C	C	C
AC09	I	I	C	C	C	C
AC15	I	I	I	I	I	I
AC19	I	I	I	I	I	I
AC31	I	I	C	C	C	C

C: compatíveis; I: incompatíveis

A compatibilidade entre microrganismos dentro do bioinoculante misto é um dos critérios fundamentais para o sucesso de sua aplicação. Carvalho et al. (2005), num estudo a fim de avaliar o desempenho simbiótico de variantes isolados de estirpes de rizóbio *Bradyrhizobium Japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii* em plantas de soja, a partir da adição de inóculos mistos, observaram que o determinante para maior eficiência em tratamentos coinoculados foi o tipo de interação (sinérgica ou antagônica) predominante no tratamento.

Acredita-se que a elevada produção de antibióticos (cerca de 85% daqueles conhecidos) por actinobactérias seja um dos fatores bióticos capazes de interferir no padrão de resposta de microrganismos de bioinoculantes (Drozdowicz, 1997; Gottlieb, 1973). Pereira et al. (1999), por exemplo, observaram que actinobactérias isolados do cerrado brasileiro foram capazes de interferir na nodulação de soja por estirpes de *Bradyrhizobium* spp., causando variações na capacidade de fixar nitrogênio. Diante disso, poucos são os trabalhos que sugerem a uso de actinobactérias em conjunto com outros microrganismos.

No entanto, as relações sinérgicas entre actinobactérias e bactérias diazotróficas (Tabela 5), bem como suas diversas interações mutualísticas (Figuras 4, 5, 6 e 7; Tabela 7), verificadas no presente trabalho, conferem uma nova perspectiva no que tange a sua utilização em bioinoculantes mistos. Esse

novo panorama envolve, além das características relacionadas à PCV das actinobactérias, a sua atuação no controle de microrganismos contaminantes do bioinoculante.

4.3 Caracterização fisiológica dos isolados de actinobactérias

Enzimas microbianas têm sido empregadas em diversos processos biotecnológicos, a exemplo da síntese de compostos industriais, hidrólise de polímeros, biorremediação de solos, dentre outros (Rodrigues, 2006).

Segundo Goodfellow et al. (1988), as actinobactérias constituem um bom alvo para a produção de enzimas devido a sua heterogeneidade química, diversidade ecológica e capacidade para a produção de metabólitos secundários. Essa capacidade atrai o interesse de pesquisadores para o desenvolvimento de insumos biológicos não apenas para a agricultura, mas também, para as indústrias farmacêutica, alimentícia, têxtil e de papel.

A celulose, o amido, xilano e lipídeo são compostos presentes na matéria orgânica que podem, de acordo com Moreira e Siqueira, (2006), ser decompostos por actinobactérias, gerando como subproduto moléculas menores, passíveis de melhor assimilação por outros microrganismos e vegetais. A avaliação dos isolados de actinobactérias, no presente estudo, revelou atividade enzimática pela maioria dos isolados (Figura 9).

Todos os isolados demonstraram atividade enzimática para catalase. Apenas o isolado AC01 não foi produtor de amilase e os isolados AC02, AC19 e AC31 não foram produtores de lipase. Não foi observada produção de xilanase e celulase pelos isolados (Tabela 8), embora diferentes resultados para celulase tenham sido obtidos por Aguiar (2012) que observou atividade celulolítica pelos isolados AC01, AC05 e AC31. As condições de armazenamento e constantes repicagens de microrganismos são fatores que contribuem para possíveis mutações que resultam em alterações morfológicas e fisiológicas como mudanças de cor da cultura, perda da capacidade de esporulação e síntese de algumas substâncias (Teramoto et al., 2011).

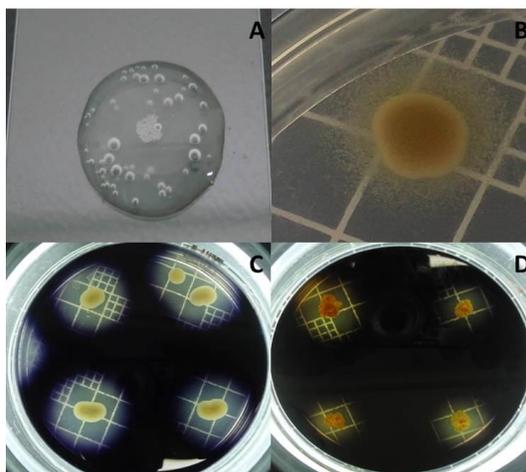


Figura 9: Produção de enzimas extracelulares pelos isolados de actinobactérias. Catalase (3A), lipase (3B) e amilase (3C e 3D).

Tabela 8: Características fenotípicas dos isolados de actinobactérias relacionadas à promoção de crescimento vegetal

Isolado	Enzimas extracelulares				
	Xilanase	Lipase	Amilase	Celulase	Catalase
AC01	-	+	-	-	+
AC02	-	-	+	-	+
AC04	-	+	+	-	+
AC05	-	+	+	-	+
AC06	-	+	+	-	+
AC09	-	+	+	-	+
AC15	-	+	+	-	+
AC19	-	-	+	-	+
AC31	-	-	+	-	+

A nitrogenase presente nos microrganismos diazotróficos é sensível, tanto ao oxigênio quanto às suas espécies reativas. No entanto, elevadas taxas metabólicas oxidativas necessárias ao processo de FBN podem favorecer o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (Alquéres et al., 2010). A produção de catalase por estas bactérias, por sua vez, é um importante

mecanismo de proteção contra a ação citotóxica do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), uma das espécies reativas de oxigênio (Ardissone et al., 2004).

Alquéres et al. (2010) observaram reduções nos níveis de espécies reativas em células de *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5, uma fixadora endofítica de N_2 , as quais foram atribuídas à sobrerregulação dos níveis de transcrição de seis genes que codificam a produção de compostos desintoxicantes de espécies reativas de oxigênio. Diante disso, a produção de catalase pelos isolados de actinobactérias interessa, não apenas para a proteção celular contra o estresse oxidativo nestes procaríotos como, também, para a proteção celular de outros microrganismos componentes no bioinoculante misto.

Segundo Moreira e Siqueira (2002), o amido é um importante composto orgânico de reserva nos vegetais cuja degradação é limitada a poucos microrganismos. De acordo com esses autores, a produção de amilases, ácidos orgânicos, CO_2 , e dextrinas durante a decomposição, são características que incluem as actinobactérias no grupo de bons degradadores de amido.

Os lipídeos, por sua vez, são biomoléculas de ésteres de glicerol e ácidos graxos (Vasconcelos, 2008). Estudos têm revelado que a utilização dessas biomoléculas, assim como óleos vegetais, por microrganismos cultivados em meio enriquecido com estes compostos, promove o aumento de metabólitos secundários (Choi et al., 1996; Pan et al., 1959). Esta utilização é possível graças à produção de lipases, enzimas que catalisam a primeira reação de quebra do lipídeo exógeno (Large et al., 1999). Tendo em vista que a PCV por actinobactérias é induzida, principalmente, por metabólitos secundários, é possível inferir que a produção de lipase pela maioria dos isolados neste estudo, possivelmente, favoreça características endógenas de PCV presentes nesses isolados. No entanto, são necessários ensaios experimentais mais específicos para afirmar essa hipótese.

Lealem e Gashe (1994) sugerem um índice enzimático (IE) $\geq 2,0$ para considerar um microrganismo como bom produtor de enzimas extracelulares em meio sólido. O IE para produção de xilanase, lipase, amilase e celulase pelas actinobactérias testadas é representado na Tabela 9.

Variações significativas quanto à produção de lipase e amilase pelos isolados foram observadas, sendo que AC01, AC04 e AC15 são considerados

bons produtores de lipase e AC02, AC05, AC19 e AC31 bons produtores de amilase.

Tabela 9: Índice enzimático de atividades xilanolítica, lipolítica, amilítica e celulolítica dos isolados de actinobactérias

Enzimas extracelulares				
Isolado	Xilanase	Lipase	Amilase	Celulase
AC01	0.00 a	2.20 b	0.00 e	0.00 a
AC02	0.00 a	0.00 e	2.80 a	0.00 a
AC04	0.00 a	2.10 b	1.12 d	0.00 a
AC05	0.00 a	1.52 d	2.12 b	0.00 a
AC06	0.00 a	1.85 c	1.10 d	0.00 a
AC09	0.00 a	1.67 d	1.22 d	0.00 a
AC15	0.00 a	2.72 a	1.80 c	0.00 a
AC19	0.00 a	0.00 e	2.87 a	0.00 a
AC31	0.00 a	0.00 e	2.10 b	0.00 a
CV (%)	0,0	10,56	6,94	0,0

Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

4.4 Alteração da estrutura supramolecular de ácidos húmicos pelas actinobactérias

As substâncias húmicas (SH) constituem a fração mais estabilizada da matéria orgânica do solo (MOS), comportando um elevado teor de carbono orgânico (Vargas e Hungria, 1997). São operacionalmente classificadas em ácidos húmicos (AH), fração solúvel em condições alcalinas ou neutras e que precipita quando o pH da solução é reduzido para 1; ácidos fúlvicos (AF), fração que permanece solúvel em todas as condições de pH ou quando o pH da solução extratora alcalina é ajustado para 1 e humina, fração insolúvel em água e em quaisquer valores de pH (Piccolo, 2002).

O estudo destas substâncias é altamente relevante, sobretudo em solos tropicais altamente intemperizados como ocorre no Brasil, em que as SH

presentes em 60% a 90% da MOS são os principais responsáveis pelo aumento da CTC e poder tampão do solo, regulação da atividade biológica, ciclagem e suprimento de nutrientes às plantas (Bayer e Mielniczuk, 2008).

O efeito de SH no metabolismo de espécies vegetais tem sido descrito (Canellas et al., 2012; Nannipieri et al., 1993). No entanto, a ação fisiológica de frações húmicas de alto peso molecular como AH é incompatível com seu tamanho e, conseqüentemente, com sua entrada na célula através das membranas biológicas (Dobbss, 2011). No entanto, com base no modelo de associações supraestruturais de unidades de substâncias húmicas, unidas por ligações fracas ou hidrofóbicas da estrutura supramolecular destas substâncias (Piccolo, 2002), os ácidos orgânicos exsudados pelas raízes dos vegetais ou por microrganismos poderiam romper as forças de ligações fracas do arranjo e mobilizar micro-agregados estruturais das SH capazes de acessar receptores na superfície ou no interior das células das raízes (Dobbss, 2011).

Actinobactérias têm sido descritas como capazes de degradar AH, por meio da atividade de enzimas, ácidos orgânicos e outros metabólitos produzidos por estes microrganismos (Badis et al., 2009; Kontchou e Blondeau, 1992; Yanagi et al., 2002). Ao serem analisados em conjunto com as propriedades bioativas das SH, estes resultados servem como base para o desenvolvimento de pesquisas que contemplem a utilização de actinobactérias com essa capacidade em solo, substratos ou inoculantes contendo SH, visando o enriquecimento biológico destes microambientes. Além disso, a hipótese de que alterações na supraestrutura de SH podem levar à diminuição da resistência dessas substâncias à decomposição por outros microrganismos benéficos à PCV deve ser investigada.

As análises dos AH extraídos do meio de cultura após 28 dias de incubação com os isolados de actinobactérias (AC01, AC04 e AC5) revelaram possíveis alterações em sua supraestrutura. Os espectros IVTF/DRIFT dos AH (Figura 10) foram obtidos com a mesma massa, normalizados em função da absorvância e da intensidade da maior absorção. Foi possível observar redução relativa nas áreas das bandas de absorção em 3699, 2922, 2852, 1510, 1456, 1228 e 1124 cm^{-1} atribuídas, respectivamente, a vibrações N-H, CH_3 , CH_2 , C-H aromáticos, C-H alifáticos, O-H em fenóis e C-O em polissacarídeos nos AH tratados com actinobactérias. A diminuição também foi verificada nas bandas de

absorção em 920, 542 e 470 cm^{-1} típicas de deformação C-H em anéis aromáticos, sugerindo alterações nas espécies aromáticas, uma vez que os AH foram isolados de vermicomposto de esterco de curral com presença não significativa de cinzas e ausência de interação com a fração mineral do solo.

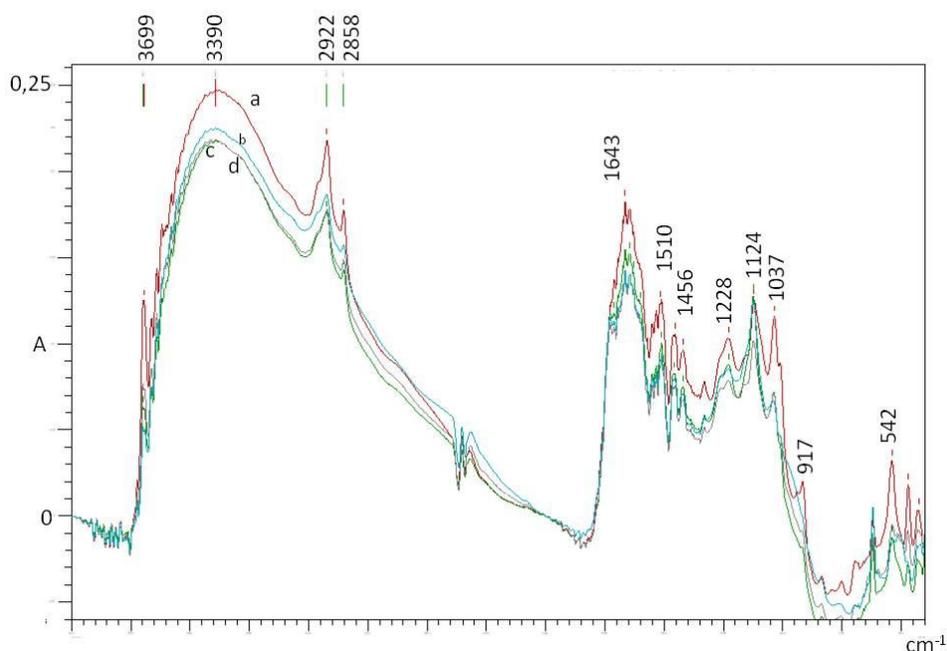


Figura 10: Espectros de IVTF/DRIFT AH no meio de cultivo antes (a - vermelho) e após incubação com actinobactérias (b “AC04”, c “AC01” e d “AC05”).

Os cromatogramas de exclusão por tamanho destes AH foram separados em duas regiões em função do tempo de retenção (T_r) na coluna. A primeira região denominada de G1 foi constituída por moléculas aparentemente maiores com T_r entre 5 a 8 minutos e a região G2 por moléculas com menor distribuição relativa de massa com T_r entre 9 e 11 minutos (Figura 11A). Em ambas as regiões observaram-se aparentes reduções na distribuição da massa relativa nas amostras inoculadas com actinobactérias em relação ao controle (AH em meio não inoculado com actinobactérias). Pressupõe-se a diminuição da distribuição dos agregados húmicos independente da região do cromatograma de exclusão. A diminuição da distribuição de massa molecular aparente foi na ordem de 11 a 22% em G1 e 14 a 20% em G2 (Figura 11B). Estudos utilizando técnicas mais adequadas devem ser conduzidos para confirmar tais observações.

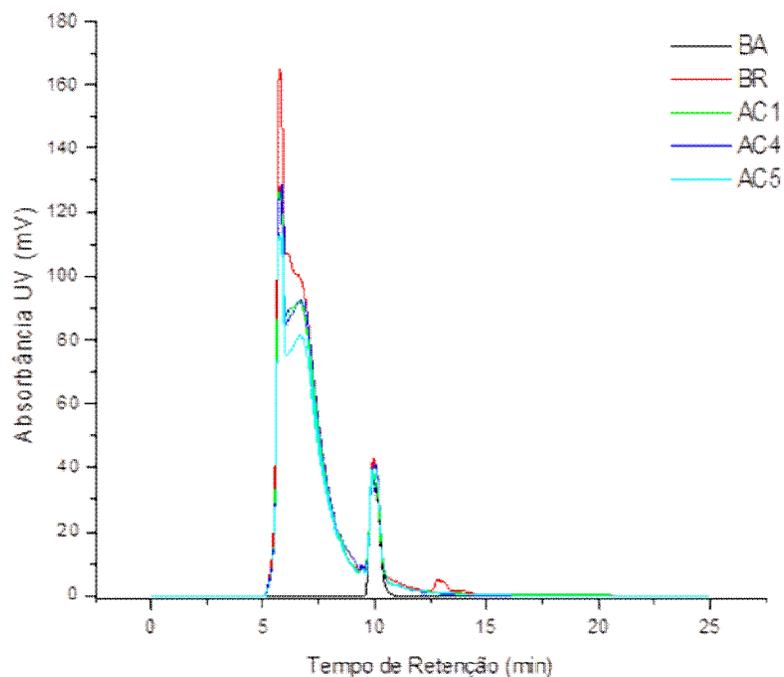


Figura 11A: Cromatograma de exclusão por tamanho dos AHs (**G1**: moléculas maiores; **G2**: moléculas menores).

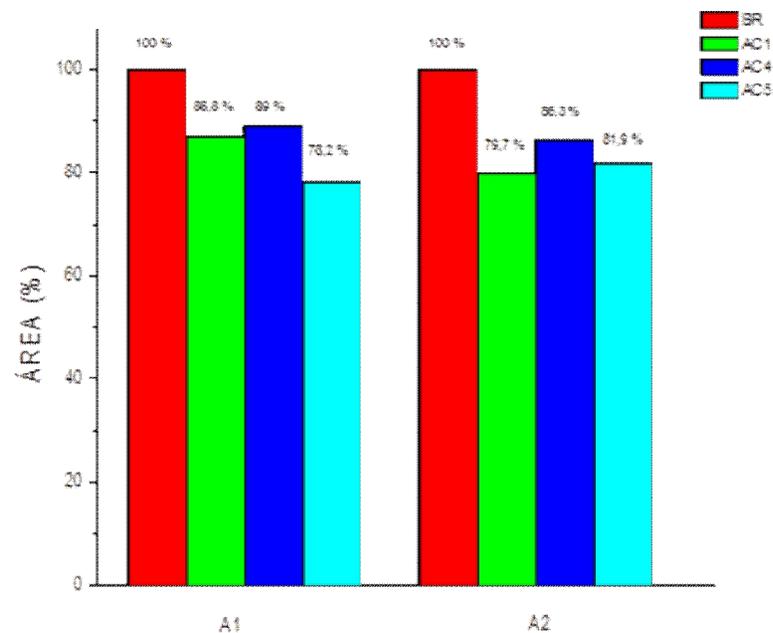


Figura 11B: Análise quantitativa das duas regiões do cromatograma por exclusão de tamanho (**G1**: Tr 5 a 8 min; **G2**: Tr 9 a 11 min).

BA: Branco absoluto (meio sem adição de AH); **BR:** Branco relativo (meio contendo AH original); **AC1:** AH quimicamente transformado por AC01; **AC4:** AH quimicamente alterado por AC04 e **AC5:** AH quimicamente alterado por AC05.

Estes resultados corroboram com aqueles encontrados por Dari et al. (1995) que testaram actinobactérias do gênero *Streptomyces* quanto à capacidade de degradação de AH. Esses autores, além de verificar a decomposição desses ácidos, observaram a ocorrência de intensa atividade de enzimas da classe das peroxidases, envolvida no catabolismo inicial da lignina. Considerando ainda a natureza supramolecular dos ácidos húmicos e sua diversidade de classes de macromoléculas associadas (Piccolo, 2002), a redução da massa aparente pode ser função de outras exoenzimas produzidas pelas actinobactérias, fato que merece estudos mais aprofundados.

A capacidade de estreptomicetos utilizar AH como fonte de carbono e nitrogênio também foi demonstrada por Badis et al. (2009) que observaram diferentes percentagens de degradação destas substâncias húmicas, provenientes de distintos materiais de origem.

A capacidade de grupos restritos de microrganismos na degradação da matéria orgânica recalcitrante (Kontchou e Blondeau, 1992) está envolvida no processo de formação do húmus sendo, portanto, fundamental para a melhor compreensão do ciclo biogeoquímico do carbono. Tendo em vista que os isolados de actinobactéria utilizados no presente trabalho são provenientes de diferentes vermicompostos, a evidência de sua capacidade de alterar a estrutura supramolecular de AH neste estudo indica o papel relevante desses procariotos no processo de vermicompostagem.

O efeito de substâncias húmicas no estímulo do crescimento vegetal tem sido descrito por diversos autores (Canellas et al., 2012; Nardi et al., 2002; Silva et al., 2011; Trevisan et al., 2010). Materiais húmicos quimicamente modificados promoveram o incremento significativo do número e no alongamento de raízes laterais de *Arabidopsis*, milho e tomate (Dobbss et al., 2010). A bioatividade auxínica de frações de AH isolados de vermicomposto foi evidenciada por Canellas et al. (2011) que também observaram a indução da emissão de raízes laterais em tomate.

De acordo com Nardi et al. (2002), o efeito de diferentes frações de substâncias húmicas depende, dentre outros fatores, do peso molecular da fração. Os autores ainda afirmam que as frações de baixo peso molecular são as principais candidatas para determinar os possíveis efeitos das substâncias húmicas no crescimento de plantas. Assim, a habilidade de alterar a estrutura

supramolecular de ácidos húmicos em frações de diferentes tamanhos (Figura 10), apresentada pelas actinobactérias no presente estudo, constitui-se um interessante pré-requisito para propor sua utilização em bioinoculantes contendo substâncias húmicas. Estes resultados também consolidam uma base para o desenvolvimento de novos estudos sobre a bioatividade das frações obtidas no crescimento vegetal.

4.5 Ocorrência de sucessão ecológica em combinações compatíveis de actinobactérias-bactérias diazotróficas na presença de ácidos húmicos

Em termos gerais, pode-se definir sucessão ecológica como uma sequencia temporal de aparecimento e/ou desaparecimento de espécies que, possivelmente, depende de recursos, condições ou mesmo de outros organismos que variam no tempo (Bahia, 2007).

A premissa conceitual do presente trabalho é a seleção e a compatibilização de actinobactérias e bactérias diazotróficas endofíticas, para avançar na proposição de formulações mista de bioinoculantes, considerando ainda, substâncias húmicas como veículos e/ou aditivos no desenho de inoculantes experimentais. Diante disso, o conhecimento das relações ecológicas entre esses microrganismos é fundamental para sua melhor manipulação e utilização nessas formulações. Com esse objetivo foram feitos ensaios de simulação de sucessão ecológica, descritos no tópico 3.7, utilizando carbono proveniente de AH ou amido como recurso determinante para o crescimento da população de bactérias diazotróficas.

De modo geral, os ensaios não revelaram ocorrência de sucessão ecológica nas combinações dos isolados de actinobactérias e as estirpes diazotróficas *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 e *Herbaspirillum seropedicae* HRC54. *G. diazotrophicus* Pal5 não foi capaz de se multiplicar no halo amilolítico dos isolados AC02, AC05, AC15 e AC31 (Figura 11), o que permite concluir que a degradação do polímero amido pela atividade enzimática das actinobactérias não fornece esqueletos de carbono para sustentar o crescimento de colônias de *G. diazotrophicus* Pal5. Já para *H. seropedicae* HRC54, observou-se crescimento de colônias ao redor do halo de degradação. Em um primeiro momento, é possível inferir que oligossacarídeos liberados no meio sustentariam a bactéria. No

entanto, análises *in silico* do genoma da estirpe *H. seropedicae* SmR1 evidenciaram a presença do gene Hsero_2325 que codifica a α -amilase (Pedrosa et al., 2011), sugerindo que a estirpe *H. seropedicae* HRC54 também possua rotas catabólicas para o amido.

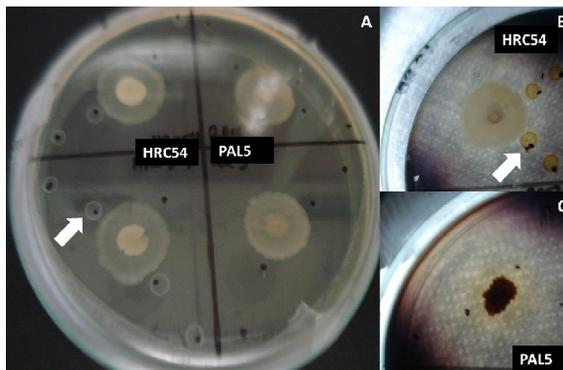


Figura 11: Cultivo de bactérias diazotróficas em halo amilolítico de actinobactérias. Visão geral do perfil de crescimento de *H. seropedicae* HRC54 e *G. diazotrophicus* Pal5 em meio Amido-agar hidrolisado pelo isolado AC02 (8A). Evidências do crescimento de *H. seropedicae* HRC54 em halo produzido pelo isolado AC31 (8B) e do não crescimento de *G. diazotrophicus* Pal5 (8C) em halo produzido pelo isolado AC15 em meio Agar-amido corado com lugol.

Observou-se que o cultivo da bactéria diazotrófica *H. seropedicae* HRC54 em filtrado de meio de cultura líquido, contendo AH como única fonte de carbono, que fora previamente incubados por 21 dias com os isolados AC01 e AC04 manteve a densidade populacional desta bactéria, em níveis semelhantes ao do controle no período inicial de 24 horas (Figura 12). Curiosamente, o cultivo dessa estirpe diazotrófica em meio de cultura previamente incubado com o isolado AC05 promoveu o aumento populacional dessa bactéria no período de 24 horas, em níveis superiores ao controle (1 g L^{-1} de ácido málico como fonte de carbono). Vale destacar que AC05 foi o isolado que apresentou maior capacidade de modificar a distribuição da massa molecular aparente dos AH. É possível que tais alterações estruturais tenham condicionado a utilização de grupamentos orgânicos antes indisponíveis para *H. seropedicae* HRC54.

Noventa e seis horas após incubação de *H. seropedicae* HRC54 nas referidas condições, com exceção dos filtrados de AH provenientes da incubação com o isolado de actinobactéria AC04, verificou-se o aumento exponencial na população de *H. seropedicae* HRC54 em torno de 7000 vezes no controle positivo, 45 vezes em AC01 e 0,85 vezes em AC05 (Figura 12).

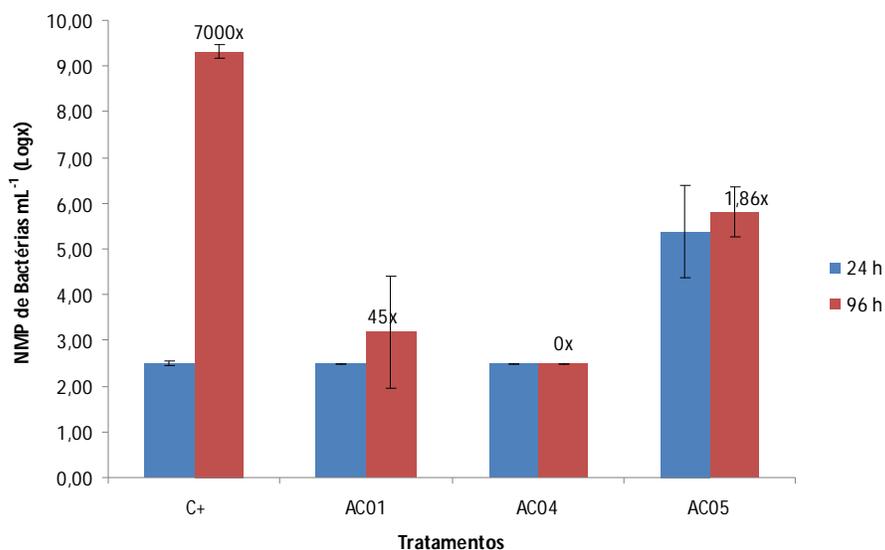


Figura 12: Número mais provável de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 cultivada em filtrados de meio de cultura líquido, saís de JNFb e AH como única fonte de carbono, previamente incubados por 21 dias com os isolados AC01, AC04 ou AC05. C+, controle contendo 1 g L⁻¹ de ácido málico como fonte de carbono.

No que diz respeito às alterações estruturais dos AH, provenientes de vermicomposto de esterco bovino e incubados por 21 dias com os isolados de actinobactérias AC01 e AC04, é possível que tais modificações não foram capazes de sustentar o crescimento de populações de *H. seropedicae* HRC54 em condições *in vitro*. Pode-se ainda inferir que a multiplicação destas actinobactérias no meio contendo AH, durante o período de incubação tenha gerado um grande acúmulo de metabólitos secundários, inclusive antibióticos, que podem ter estagnado o crescimento de *H. seropedicae* HRC54 quando esta foi inoculada no filtrado deste meio.

O efeito da inoculação da estirpe diazotrófica *H. seropedicae* BR11175 na presença de AH e sobre a comunidade bacteriana nativa da rizosfera e do interior de raízes de milho foi estudado por Ndaw et al. (2011). Os autores observaram que a inoculação na presença dos AH aumentou significativamente o número de bactérias diazotróficas no sistema rizosfera/raízes de milho. É possível que a ausência do fator hospedeiro tenha sido determinante para a estabilidade da população de *H. seropedicae* HRC54, mesmo na presença de AH, o que pode justificar a discrepância entre os resultados do presente trabalho para os AH quimicamente transformados por AC01 e AC04 e aqueles encontrados por Ndaw et al. (2011).

A hipótese de sucessão ecológica em combinações compatíveis dos isolados de actinobactérias e a estirpe *H. seropedicae* HRC54 é incrementada pelos resultados obtidos no ensaio de coinoculação dessa fixadora de N_2 e das actinobactérias AC04, AC06 e AC09 em meio de cultivo semissólido JNFb. Neste ensaio, observou-se que esses isolados, incapazes de fixar N_2 e, conseqüentemente, de se multiplicar em meio semissólido isento desse nutriente, foram capazes de se estabelecer no referido meio acima da película aerotóxica de *H. seropedicae* HRC54 (Figura 13). Esse dado sugere que os isolados de actinobactérias AC04, AC06 e AC09 se beneficiam da FBN por *H. seropedicae* HRC54, utilizando o N fixado.

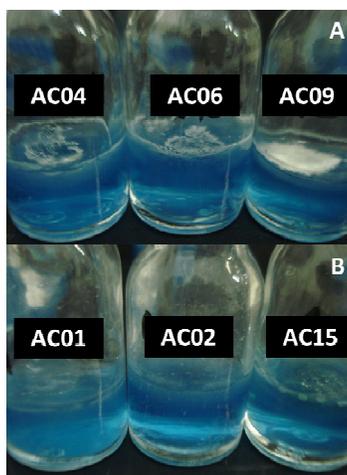


Figura 13: Crescimento micelial dos isolados AC04, AC06 e AC09 sobre superfície da película aerotóxica de *H. seropedicae* HRC54 (A). Ausência de crescimento micelial do isolados AC01, AC02, AC15.

A inoculação de *H. seropedicae* HRC54 em meio semissólido JNFb suplementado com 25 µL de filtrados de meio de cultura líquido, saís de JNFb e AH previamente incubado por 21 dias com os isolados AC01, AC04 ou AC05, como única fonte de carbono, aparentemente, não subsidiou o crescimento da bactéria diazotrófica, condição essa verificada pela não formação da película aerotóxica característica da atividade de fixação do N₂ pela referida estirpe (Figura 14). Ainda na Figura 14, é possível observar que em meio semissólido JNFb suplementado com 25 µL de filtrados de AH previamente incubado por 21 dias com os isolados AC01 e AC04 como única fonte de carbono, *H. seropedicae* HRC54, apresentou um crescimento basal, seguido de estagnação. Esse crescimento pode ser atribuído a resíduos de carbono provenientes do meio de cultura em que esta bactéria foi inicialmente multiplicada (DYG'S), ainda que a lavagem das células tenha sido realizada, como descrito na metodologia. A confirmação dos dados requer, no entanto, repetições mais apuradas deste ensaio.

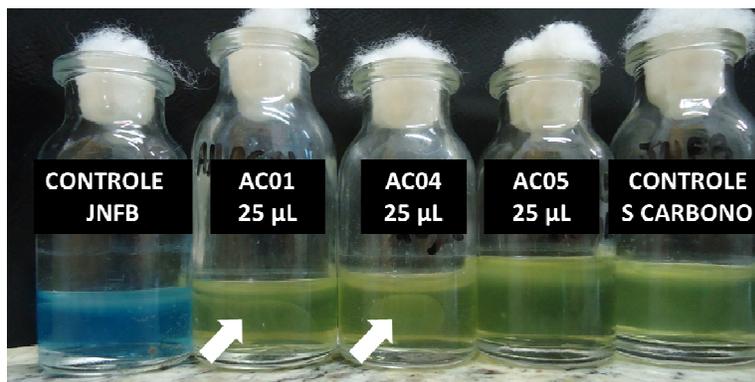


Figura 14: Crescimento de *H. seropedicae* HRC54 em meio semissólido suplementado com 25 µL de filtrados de meio de cultura líquido, saís de JNFb e AH previamente incubado por 21 dias com os isolados AC01, AC04 ou AC05 como única fonte de carbono. A esquerda, controle positivo (JNFb contendo 1 g L⁻¹ de ácido málico como fonte de carbono) e a direita, controle negativo (JNFb sem quaisquer fonte de carbono).

4.6 Efeito de extratos metabólicos das actinobactérias na germinação de sementes de milho (*Zea mays*)

A percentagem de sementes de milho var. UENF 506-11 germinadas nos tratamentos controle variou em torno de 21 e 24%. Esses valores, consideravelmente baixos, podem ser justificados por possíveis estresses provocados pelo frio durante o período de armazenamento, o que pode levar a perda do vigor. Em termos gerais, a percentagem de germinação de sementes tratadas com extratos metabólicos da actinobactérias variou entre 10 e 38%. O efeito positivo mais acentuado sobre a germinação foi aquele proporcionado pelo isolado AC05, o qual diferiu estatisticamente em 15% do controle com água destilada e 16,67% do controle com meio de cultivo AGS (Tabela 10). Sementes tratadas com o extrato metabólico do isolado AC31 apresentaram percentagem de germinação inferior a ambos os controles, sugerindo efeito inibidor da germinação.

Tabela 10: Percentual de germinação de sementes de milho tratadas com extratos metabólicos de isolados de actinobactérias

Isolados	Percentagem de germinação (%)
Controle (água destilada)	23,33 bcd
Controle (meio líquido AGS)	21,66 bcd
AC01	25,00 abc
AC02	30,00 ab
AC04	13,33 cd
AC05	38,33 a
AC06	23,33 bcd
AC09	20,00 bcd
AC15	21,66 bcd
AC19	21,66 bcd
AC31	10,00 d
CV	22,9%

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de t (LSD) a 5% de probabilidade.

A produção de substâncias com atividade fitormonal, como giberelinas, por BPCV tem sido descrita na literatura (Bottini et al., 2004). Estes estudos são importantes para superar a dormência temporária de sementes, reduzindo retardos na semeadura e possibilitando não só a homogeneização da produção e colheita de espécies agrícolas. Por outro lado, a ocorrência de efeito fitotóxico na germinação de sementes por BPCV também tem sido citada na literatura (Venkatachakam et al., 2010; Zhi-Ki et al., 2005).

Os resultados obtidos a partir do presente ensaio experimental, além de servir como base para o desenvolvimento de pesquisas com vias ao uso de actinobactérias para superação de dormência de sementes, reforçam a necessidade de avaliação de compatibilidade entre o microrganismo com potencial biotecnológico agrícola, a microflora benéfica do solo e as espécies vegetais que compõem o agroecossistema.

4.7 Efeito da coinoculação de actinobactérias e diazotróficos no crescimento de plantas de milho (*Zea mays*)

Actinobactérias são bactérias comumente isoladas de solo que apresentam a capacidade de colonizar a rizosfera ou mesmo o ambiente endofítico de espécies vegetais (Qin et al., 2012). Este grupo microbiano inclui indivíduos produtores de diversas enzimas extracelulares, capazes de atuar na decomposição da matéria orgânica, aumentando a disponibilidade de nutrientes aos vegetais (Petrosyan et al., 2003), podendo ainda produzir substâncias fitoreguladoras do crescimento, atuando diretamente no crescimento de plantas (Igarashi et al., 2004).

Bactérias diazotróficas endofíticas são microrganismos capazes de colonizar tecidos internos das plantas e que também apresentam importante contribuição para o estímulo do crescimento vegetal, principalmente pela fixação biológica do nitrogênio (FBN) (Baldani et al., 2002).

Neste ensaio, o potencial de magnificação do crescimento de plantas de milho pelo uso conjunto de isolados actinobactérias com características fenotípicas relacionadas ao crescimento vegetal e de bactérias diazotróficas endofíticas descritas como promotoras do crescimento, foi avaliado.

A avaliação dos parâmetros biométricos das plantas de milho inoculadas com actinobactérias ou bactérias diazotróficas endofíticas (Tabela 11) não evidenciou estímulos significativos no número de folhas, área foliar, altura ou massa seca da parte aérea pelos tratamentos. Sousa (2006), avaliando o efeito de isolados de actinobactérias na promoção de crescimento em tomateiro, observou que a melhor colonização do substrato e expressão do efeito promotor foram obtidas quando o substrato foi incubado com a suspensão dos esporos dos isolados durante 40 dias. É possível que o método de aplicação das actinobactérias empregado neste ensaio tenha interferido num possível potencial indutor de crescimento vegetal dos isolados.

Tabela 11: Efeito de actinobactérias, bactérias diazotróficas e da sua coinoculação no crescimento de plantas de milho (*Zea mays*)

Tratamento	Nº de folhas	Área foliar (cm ²)	Altura (cm)	MSPA (g)	MSRZ (g)	Intensidade de verde
Controle	5 a	109,32 a	54,50 a	0,36 a	0,38 b	24,82 b
1	5 a	106,13 a	50,12 a	0,44 a	0,52 ab	31,25 a
2	5 a	115,39 a	47,37 a	0,47 a	0,57 a	26,87 b
3	5 a	126,05 a	48,83 a	0,40 a	0,43 ab	30,33 a
CV (%)	6,15	8,46	8,44	25,05	20,22	5,85

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de t (LSD) a 5% de probabilidade. Tratamento 1: *Mix* das actinobactérias AC01, AC04 e AC31; Tratamento 2: *Mix* das bactérias diazotróficas *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 e *Herbaspirillum seropedicae* HRC54; Tratamento 3: *Mix* com microrganismos utilizados nos tratamentos 1 e 2. MSPA: massa seca da parte aérea. MSRZ: massa seca da raiz.

Observou-se que a inoculação com o *mix* de diazotróficos (*Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 e *Herbaspirillum seropedicae* HRC54) promoveu um incremento significativo na ordem de 50% na massa seca das raízes das plantas. A intensidade de verde também foi significativamente estimulada pela inoculação do *mix* dos isolados de actinobactérias AC01, AC04 e AC31 ou da sua coinoculação com o *mix* das estirpes diazotróficas.

O nitrogênio é um elemento essencial às plantas, principalmente nos primeiros estádios de crescimento. É possível que a fixação biológica do nitrogênio pelas estirpes diazotróficas utilizadas tenha incrementado o teor desse elemento nas plantas cujas sementes foram inoculadas, estimulando o crescimento da raiz. Este processo, corroborado por outros fatores, pode ainda ter favorecido o incremento do teor de nitrogênio na parte aérea das plantas, aumentando a intensidade de verde e, conseqüentemente, o teor de clorofila visto que o nitrogênio é parte estrutural desta molécula (Oliveira et al., 1996).

Estes resultados demonstram que a inoculação das actinobactérias AC01, AC04 e AC31, juntamente com as estirpes diazotróficas *G. diazotrophicus* Pal5 e *H. seropedicae* HRC54 apresentam potencial para incrementar significativamente a massa seca de raízes e o teor de clorofila em plantas de milho var. UENF 506-11. Assim, esses microrganismos podem ser sugeridos como componentes em bioinoculantes mistos e servem como base para outros estudos voltados para o desenho de inoculantes experimentais.

4.8 Efeito da coinoculação de actinobactérias e *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 no crescimento de plântulas de tomate (*Solanum lycopersicum*)

Em termos gerais, a inoculação com a bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 promoveu incrementos significativos na intensidade de verde das folhas de plântulas de tomate cv. Santa Clara (Tabela 14), quando comparadas com o controle não inoculado. No entanto, essa inoculação não foi capaz de interferir estatisticamente nos demais parâmetros biométricos avaliados, embora a bactéria tenha sido reisolada das raízes das plântulas (Tabela 12).

Ensaio experimentais (dados não publicados) têm demonstrado que *H. seropedicae* HRC54, embora seja capaz de colonizar endofiticamente raízes de plântulas de tomate cv. Santa Clara, essa colonização não promove incrementos na biomassa das plantas.

A capacidade de colonização do substrato pelos isolados, após o período de 45 dias de incubação, foi observada (Tabela 12), demonstrando a utilização dos nutrientes presentes nesse substrato e possibilitando o crescimento da população microbiana com esse método de aplicação. Também foi verificado que

o crescimento dos isolados de actinobactéria promoveu alterações discretas nos teores nutricionais do substrato Vivatto[®], mais especificamente em P, K, Fe, Zn e Mn em que se observou a elevação no teor desses nutrientes (Tabela 13). O efeito benéfico de estreptomicetos no crescimento de mudas de tomateiro após 43 dias de incubação do substrato orgânico Plantmax[®] com os isolados foi observado por Sousa et al. (2009).

Tabela 12: Densidade microbiana em ensaio de PCV de plântulas de tomate (*Solanum lycopersicum*) cv. Santa Clara

Densidade populacional de actinobactérias no substrato Vivatto[®], após 45 de incubação	
Tratamento	Nº de u.f.c. dag ⁻¹ de substrato (Log ₁₀)
Controle	0,00
AC01	9,82
AC04	9,75
AC31	9,52
NMP de <i>H. seropedicae</i> HRC54 em raízes de tomate cv. Santa Clara	
Tratamento	NMP g ⁻¹ de raiz (Log ₁₀)
Controle N.I.	0,00
Controle I.	8,17
AC01+HRC54	8,01
AC04+HRC54	7,98
AC31+HRC54	8,10

NI: não inoculado com *H. seropedicae* HRC54; I: inoculado com *H. seropedicae* HRC54. NMP: número mais provável de bactérias diazotróficas.

Tabela 13: Caracterização química do substrato Vivatto[®], após 45 dias de incubação com isolados de actinobactérias

Isolados	pH	Ca	Mg	C	MO	Fe	Cu	Zn	Mn	S	B	P	K
		cmol _c /dm ³		%	g/dm ³	-----mg/dm ³ -----							
Controle	5,5	10,0	9,2	5,05	87,1	148,9	0,5	4,7	51,1	794,8	3,20	432	726
AC01	5,6	9,4	9,4	5,28	91,0	206,0	0,5	5,9	56,5	877,5	3,43	486	792
AC04	5,6	10,4	9,5	5,20	89,7	164,7	0,5	6,0	58,3	779,0	3,59	513	814
AC31	5,5	9,6	9,0	5,90	101,7	159,1	0,5	6,6	61,4	854,5	3,09	489	802

Extrator Carolina do Norte.

Aumentos significativos na intensidade de verde, altura, área foliar, número de raízes laterais, massa fresca da raiz e massa fresca e seca da parte aérea foram observados em plântulas cultivadas em substrato orgânico incubado por 45 dias com o isolado AC01, em plantas não inoculadas com *H. seropedicae* (Tabela 14). Características fenotípicas do efeito desse isolado podem ser observadas na Figura 15.

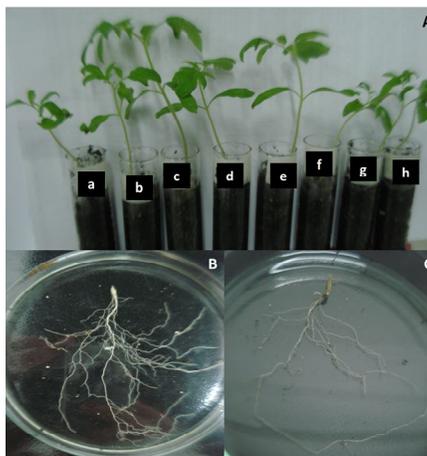


Figura 15: Visão geral das plântulas de tomate produzidas em substrato incubado com actinobactérias, inoculadas (I.) ou não inoculadas (N.I.) com *H. seropedicae* HRC54 (15A). **a**: controle (N.I.); **b**: controle (I.); **c**: incubação com AC01 (N.I.); **d**: incubação com AC01 (I.); **e**: incubação com AC04 (N.I.); **f**: incubação com AC04 (I.); **g**: incubação com AC31 (N.I.); **h**: incubação com AC31 (I.). Emissão de raízes laterais em plântulas tratadas com AC01 (15B) e no controle (C).

Estes resultados colaboram com aqueles encontrados por Soares et al. (2010), que observaram aumento significativo de até 71% na altura, 73% no diâmetro do caule, 266% na produção de massa seca da parte aérea e 300% na produção de massa seca das raízes de mudas de tomateiro, cultivadas em solo infestado e incubado com isolados de actinobactérias.

Plântulas de tomate cultivadas em substrato orgânico incubado com os isolados de actinobactérias AC04 e AC31 não apresentaram incrementos significativos nas características fenotípicas de crescimento, a despeito da capacidade que estes isolados apresentaram de produzir enzimas extracelulares relacionadas ao crescimento vegetal. No entanto, observa-se que a coinoculação destes isolados com o isolado de actinobactéria AC01 promoveu o aumento significativo da massa seca de raízes e teor de clorofila em plantas de milho var. UENF 506-11. À primeira instância, pode-se atribuir o efeito benéfico dessa coinoculação ao isolado AC01 que foi eficiente na promoção de crescimento de plântulas de tomate quando empregado de forma isolada. Contudo, numa segunda reflexão, pode-se inferir que a interação entre os isolados AC04, AC31 e a cultura do tomateiro não favorece um possível potencial promotor de crescimento vegetal por esses isolados, sendo assim necessário o estudo de sua interação com outras espécies vegetais.

Tabela 14: Efeito da coinoculação de actinobactérias e *H. seropedicae* HRC54 em plântulas de tomate

Tratamento	I.V.		Altura		A.F.		Nº R.L.		MFPA		MFR		MSPA		MSR	
	---		(cm)		(cm ²)		---		(mg)		(mg)		(mg)		(mg)	
	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I
Controle	20,4 Bc	26,4 Aa	9,6 Ab	10,7 Aa	3,7 Ac	5,9 Ab	13 Ac	27 Aa	177 Ac	232 Aa	50,9 Ab	76,4 Aa	8,2 Ab	11,9 Aa	2,1 Aa	2,5 Aa
AC01	25,5 Aa	24,1 Bb	12,0 Aa	11,1 Aa	11,7 Aa	9,2 Aa	31 Aa	29 Aa	332 Aa	289 Aa	98,6 Aa	85,3 Aa	20,1 Aa	15,4 Aa	2,2 Aa	1,5 Ab
AC04	23,1 Ab	22,9 Bb	10,4 Ab	9,8 Ab	7,4 Ab	4,5 Ab	21 Ab	14 Ab	246 Ab	172 Ab	57,3 Ab	40,0 Ab	12,6 Ab	9,2 Ab	2,5 Aa	2,2 Aa
AC31	21,1 Bc	25,0 Aa	9,2 Ab	9,2 Ab	3,9 Ac	4,4 Ab	16 Ac	15 Ab	160 Ac	160 Ab	43,3 Ab	35,0 Ab	8,1 Ab	7,1 Ab	2,2 Aa	1,1 Ab
CV (%)	5,85		8,70		20,23		18,96		20,46		24,8		23,36		26,86	

NI = Não inoculado com *Hesbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54; I = Inoculado com *Hesbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54. Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam na linha o efeito da inoculação com a bactéria diazotrófica para o mesmo isolado de actinobactéria. Letras minúsculas comparam na coluna o efeito dos isolados de actinobactéria entre si.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

O sistema convencional de produção agrícola no Brasil é caracterizado por elevada produtividade, porém, custeada pela acidificação do solo, eutrofização de rios e intensificação do efeito estufa, devido ao uso indiscriminado e maciço de fertilizantes químicos e defensivos. Esse panorama estimula o interesse público por tecnologias alternativas de produção. Nesse contexto bactérias e actinobactérias promotoras do crescimento vegetal, por exemplo, constituem-se ferramentas importantes de aplicação biotecnológica para melhoria da produtividade sustentável dos sistemas agrícolas. Estudos pautados no desenvolvimento de pesquisas e tecnologias para formulação de bioinoculantes têm sido praticados pelo Núcleo de Desenvolvimento de Insumos Biológicos para a Agricultura (NUDIBA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). A título de exemplo, podemos destacar a patente baseada no uso conjunto de ácidos húmicos e bactérias benéficas para o crescimento de plantas. O presente trabalho teve por objetivos selecionar isolados de actinobactérias e bactérias diazotróficas endofíticas compatíveis e estudar o potencial desses microrganismos em promover o crescimento vegetal, visando à formulação de bioinoculantes mistos. As actinobactérias foram avaliadas quanto à produção *in vitro* de enzimas extracelulares relacionadas à promoção de crescimento vegetal e quanto à capacidade de modificar a estrutura supramolecular de ácidos húmicos. Bactérias diazotróficas endofíticas foram estudadas quanto ao potencial

de utilizar recursos de carbono provenientes de compostos catabolizados pelas actinobactérias. Por fim, actinobactérias e bactérias diazotróficas endofíticas compatíveis foram aplicadas em plantas modelo, em condições monoxênicas e casa de vegetação, sendo avaliados os efeitos no crescimento das plantas. Foi observada a produção de lipase, amilase e catalase por 66,6, 88,9 e 100% dos isolados de actinobactéria, respectivamente. Modificações na estrutura supramolecular de ácidos húmicos pelos isolados AC01, AC04 e AC05 foram observadas. *Hesbaspirillum seropedicae* HRC54 foi capaz de utilizar ácidos húmicos quimicamente modificados por AC05 como única fonte de carbono. O aumento no teor de clorofila foi verificado em plantas de milho inoculadas com *H. seropedicae* ou *G. diazotrophicus* e naquelas coinoculadas com essas bactérias diazotróficas e os isolados AC01, AC04 e AC31. Os resultados mostraram que combinações compatíveis de actinobactérias e bactérias diazotróficas são capazes de promover o crescimento vegetal, sugerindo sua utilização conjunta em novas formulações para o desenho de bioinoculantes agrícolas.

- ❖ As actinobactérias AC01, AC04 e AC31, isoladas de diferentes tipos de vermicompostos por meio de diluição seriada e plaqueamento em meio sólido contendo AH (20 mg L⁻¹), são compatíveis com as estirpes diazotróficas *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 a nível estrutural e celular.
- ❖ Dentre os nove isolados de actinobactérias 66,6, 88,9 e 100% foram capazes de produzir lipase, amilase e catalase, respectivamente.
- ❖ Os isolados de actinobactéria AC1, AC4 e AC5 foram capazes de utilizar AH como fonte de carbono e nutrientes durante o crescimento microbiano, potencialmente diminuindo em até 22% a massa molecular aparente dessas substâncias. Este consumo não foi limitado a moléculas específicas, havendo biodegradação de compostos aromáticos, sulfonados, polissacarídeos e carboxílicos.
- ❖ *H. seropedicae* apresentou capacidade de utilizar recursos de carbono provenientes de AH, quimicamente modificados por AC05.
- ❖ O extrato metabólico do isolado AC05 apresentou potencial bioestimulante para a germinação de sementes de milho var. UENF 506-11.

- ❖ O teor de clorofila e a massa seca de raízes são beneficiados pela inoculação de *H. seropedicae* HRC54 e *G. diazotrophicus* PAL5 ou das actinobactérias ou pela coinoculação destas com as estirpes diazotróficas, em sementes de milho var. UENF 506-11.
- ❖ O isolado AC01 é capaz de promover significativamente o crescimento vegetal em plântulas de tomate cv. Santa Clara, sugerindo sua utilização em bioinoculantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. (2005) *Plant pathology*. 5. ed. Burlington: Elsevier Academic, 922p.
- AGUIAR, K.P. (2012) *Bioprospecção de bactérias promotoras do crescimento vegetal associadas a vermicompostos*. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 86p.
- ALDESUQUY, H.S.; MANSOUR, F.A.; ABO-HAMED, S.A. (1998) Effect of the culture filtrates of *Streptomyces* on growth and productivity of wheat plants. *Folia Microbiologica*, 43: 465-470.
- ANANDHAM, R.; CHOI, K.H.; GANDHI, P.I.; YIM, W.J.; PARK, S.J.; KIM, K.A.; MADHAIYAN, M. & SA, T.M. (2007) Evaluation of shelf life and rock phosphate solubilization of *Burkholderia* sp. in nutrient-amended clay, rice bran and rock phosphate-based granular formulation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 23:1121-1129.
- ARAUJO, J.M. (1998) Estratégias para isolamento seletivo de actinobacterias. In: MELO, I. S; AZEVEDO, J. L. (eds.) *Ecologia microbiana*. Jaguariuna: EMBRAPA-CNPMA, p.351-367.
- BADIS, A., FERRADJI, F. Z., BOUCHERIT, A., FODIL, D. & BOUTOUMI, H. (2009) Characterization and biodegradation of soil humic acids and preliminary identification of decolorizing actinomycetes at Mitidja plain soils (Algeria). *African Journal of Microbiology*, 3: 997-1007.

- BAHIA, R.G. (2007) *Sucessão ecológica em guano de morcegos insetívoros em cavernas*. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Belo Horizonte – MG, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, 117p.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, L. D. (2005) History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 77: 549-579.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. (1986) Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov.: a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 36: 86-93.
- BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R.; DÖBEREINER, J. (1997) Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 29: 911-922.
- BALDANI, J.I.; REIS, V.M.; BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. (2002) A brief story of nitrogen fixation in sugarcane reasons for success in Brazil. *Functional Plant Biology*, 29:417-423.
- BALDOTTO, L.E.B., BALDOTTO, M.A., CANELLAS, L.P., BRESSAN- SMITH, R.; OLIVARES, F.L. (2010) Growth promotion of pineapple 'vitória' by humic acids and *Burkholderia* spp. during acclimatization. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 34: 1593-1600.
- BALOTA, R. L.; LOPES, E. S.; HUNGRIA, M.; DÖBEREINER, J. (1999) Ocorrência de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares na cultura da mandioca. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 34: 1265-1276.
- BASTIÁN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. (1998) Production of indole-3-acetic acid and gibberellin A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regulation*, 24: 7–11.
- BAYER, C; MIELNICZUK, J. (2008) Dinâmica e função da matéria orgânica. In: SANTOS, G. de A.; SILVA, L. S. da; CANELLAS, L. P.; CAMARGO, F. A. de O. (eds.). *Fundamentos de matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais*. Porto Alegre: Metrópole, p.7-18.
- BOTTINI R.; CASSÁN F.; PICCOLI P. (2004) *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65: 497-503.

- BRITO, M.A.M. (2010) *Estreptomicetos promotores de crescimento de planta de girassol Helionthus annuus.L E Pinhão Manso latropha curcos.L*. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Cruz das Almas – BA, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UENF, 86p.
- BROOKS, D. S.; GONZALEZ, C. F.; APPEL, D. N.; FILER, T. H. (1994) Evaluation of endophytic bacteria as potential biological control agents for oak wilt. *Biological Control*, 4: 373-381.
- BUCHER, C. A.; REIS, V. M. (2008) *Biofertilizantes contendo bactérias diazotróficas*. EMBRAPA Agrobiologia, 17p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 247).
- BUSATO, J.G.; LIMA, L.S.; AGUIAR, N.O.; CANELLAS, L.P.; OLIVARES, F.L. (2012) Changes in labile phosphorus forms during maturation of vermicompost enriched with phosphorus-solubilizing and diazotrophic bacteria. *Bioresource Technology*, 110: 390-395.
- CANELLAS, L.C.; SANTOS, G.A. (eds.) (2005) *Humosphere: Tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas*. Campos dos Goytacazes, 309p.
- CANELLAS, L.P.; DANTAS, D.J.; AGUIAR, N.O.; PERES, L.E.P.; ZSÖGÖN, A.; OLIVARES, F.L.; DOBBSS, L.B.; FAÇANHA, A.R.; NEBBIOSO, A.; PICCOLO, A. (2011) Probing the hormonal activity of fractionated molecular humic components in tomato auxin mutants. *Annals of Applied Biology*.
- CANELLAS, L.P.; BALMORI, D.M.; MÉDICI, L.O.; AGUIAR, N.O.; CAMPOSTRINI, E.; ROSA, R.C.C.; FAÇANHA, A.R.; OLIVARES, F.L. (2012) A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). *Plant and Soil*.
- CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P., (ed.) (1992). *Microbiologia dos Solos*. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 360p.
- CARVALHO, F.G.; SELBACH, P.A.; BIZARRO, M.J. (2005) Eficiência e competitividade de variantes espontâneos isolados de estirpes de *Bradyrhizobium* spp recomendadas para a cultura da soja (*Glycine Max*). *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 29:883-891.
- CASTAÑEDA ASTURIAS, R. (1989) *Utilização de aditivos em inoculantes à base de turfa não estéril de Bradyrhizobium japonicum estirpe semia 587*.

- Dissertação (Mestrado em Solos) - Porto Alegre – RS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, 125p.
- CATTELAN, A.J. (1999) *Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal*. Londrina: Embrapa-Soja, 36p.
- CERETTA, C.A. (1995) *Fracionamento de N orgânico, substâncias húmicas e caracterização de ácidos húmicos de solo em sistemas de cultura sob plantio direto*. Tese (Doutorado em Ciências do solo) – Porto Alegre – RS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, 150p.
- CHEN, W.; WANG, E.; WANG, S.; LI, Y. (1995) Characteristics of *Rhizobium tiansahnense* sp. nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, People Republic of China. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45: 153-159.
- CHOI, D.B.; TAMURA, S.; PARK, Y.S.; OKABE, M.; SERIU, Y.; TAKEDA, S. (1996) Efficient Tylosin Production from *Streptomyces fradiae* Using Rapessed Oil. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82: 183-186.
- CHUEIRE, L.M.O.; BANGEL, E.V.; MOSTASSO, F.L.; CAMPO, R.J.; PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M. (2003) Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no sequenciamento do gene 16S rRNA. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 27: 833 – 840.
- COMPANT, S.; CLÉMENT, S.; SESSITSCH, A. (2010) Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42: 669 - 678.
- CONCEIÇÃO, P.M.; VIEIRA, H.D.; CANELLAS, L.P.; MARQUES JÚNIOR, R.B.; OLIVARES, F.L. (2008) Recobrimento de sementes de milho com ácidos húmicos e bactérias diazotróficas endofíticas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43: 545-548.
- COOK, R.J.; BAKER, K.F. (1983) *The nature and practice of biological control of plant pathogens*. Saint Paul; The American Phytopathological Society Press, 539p.

- COON, H.J.; JENNISON, M.W.; WEEK, O.B. (1957) Routine tests for the identification of bacteria. *In: Society of American Bacteriologists (eds.). Manual of Microbiology Methods*. New York: McGraw-Hall, p. 239-262.
- CORKIDI L, ALLEN EB, MERHAUT D, ALLEN MF, DOWNER J, BOHN J, EVANS M. (2004) Assessing the infectivity of commercial mycorrhizal inoculants in plant nursery conditions. *Journal of Environmental Horticulture*, 22: 149–154.
- CUESTA, G.; GARCÍA-DE-LA-FUENTE, R.; ABAD, M.; FORNES, F. (2010) Isolation and identification of actinomycetes from a compost-amended soil with potential as biocontrol agents. *Journal of Environmental Management*, 1 – 5.
- DALLA SANTA, O.R.; HERNÁNDEZ, R.F.; ALVAREZ, G.L.M.; RONZELLI JUNIOR, P. & SOCCOL, C.R. (2004) Azospirillum sp. inoculation in wheat, barley and oats seeds greenhouse experiments. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47:843-850.
- DAMASCENO, J.C.A. (2011) *Actinobactérias na promoção de crescimento e controle de Meloidogyne javanica em mudas de tomateiro*. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Cruz das Almas – BA, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB, 95p.
- DARI, K.; M, BECHET; BLONDEAU, R. (1995) Isolation of soil *Streptomyces* strains capable of degrading humic acids and analysis of their peroxidase activity. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology*, 16:115–122.
- DELGADILLO, R. J.; CALLEROS, G.V.; FRANCO, S.T.; PORTUGAL, V.O. (2001) Bacterias promotoras del crecimiento de plantas: agro-biotecnología. *Avance y Perspectiva*, 20: 395-399.
- DOBBSS L.B., CANELLAS L.P., OLIVARES F.L., AGUIAR N.O., PERES L.E.P., AZEVEDO M., SPACCINI R., PICCOLO A., FAÇANHA A.R. (2010) Bioactivity of chemically transformed humic matter from vermicompost on plant root growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 3681–3688.
- DOBBSS, L.B. (2011) *Características químicas e promoção de crescimento radicular de substâncias húmicas*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal)

- Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 112p.
- DÖBEREINER, J. (1992) History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. *Symbiosis*, 13: 1-13.
- DÖBEREINER, J. (1997) A importância da fixação biológica de nitrogênio para a agricultura sustentável. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento - Encarte especial*, 1: 2-3.
- DÖBEREINER, J., RUSCHEL, A.P. (1958) Uma nova espécie de Beijerinckia. *Revista de Biologia*, 1: 261- 272.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. (1995) *Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas*. Brasília: Embrapa-SPI; Itaguaí: Embrapa-CNPAB, 60p.
- DROZDOWICZ, A. (1997) Bactérias do solo. In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. (ed.) *Biologia dos solos do cerrado*. Planaltina: Embrapa Cerrados, 524p.
- EL-TARABILY, K.A.; SOAUD, A.A.; SALEH, M.E.; MATSUMOTO, S. (2006) Isolation and characterisation of sulfur-oxidising bacteria, including strains of Rhizobium, from calcareous sandy soils and their effects on nutrient uptake and growth of maize (*Zea mays* L.). *Australian Journal of Agricultural Research*, 57: 101–111.
- EMBRAPA. (1997) *Manual de métodos de análise de solo*. 2. ed. Rio de Janeiro, RJ, 212p.
- EMBRAPA. Empresas vão começar a produzir o inoculante para cana: <http://www.cnpab.embrapa.br/destaques/empresa-inoculo> em 11 de março de 2013.
- FAÇANHA, A.R.; FAÇANHA, A.L.O.; OLIVARES, F.L.; GURIDI, F.; SANTOS, G.A.; VELLOSO, A.C.X.; RUMJANEK, V.M.; BRASIL, F.; ACHRIPSEMA, J.; BRAZ-FILHO, R.; OLIVEIRA, M.A. & CANELLAS, L.P. (2002) Bioatividade de ácidos húmicos: Efeito sobre o desenvolvimento radicular e sobre a bomba de prótons da membrana plasmática. *Pesquisa Brasileira Agropecuária*, 37:1301-1310.
- FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. CD-ROOM dos *Anais da Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria*, São Carlos, 2000.

- FODIL, D.; JAOUADI, B.; BADIS, A. NADIA, Z.J.; FERRADJI, F.Z.; BEJAR, S.; BOUTOUMI, H. (2012) A thermostable humic acid peroxidase from *Streptomyces* sp strain AH4: purification and biochemical characterization. *Bioresource technology*, 111: 383 – 390.
- FOSTER, R. C. (1986) The ultrastructure of the rhizoplane and rhizosphere. *Annual Review of Phytopathology*. 21: 211-234.
- FRAVEL D. R. (1998) Role of antibiotics in the biocontrol of plant diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 26: 75-91.
- FREIRE, J. R. J. (1968) Trabalhos em rizobiologia no Rio Grande do Sul. *Anais da Reunião Latino Americana sobre Inoculante para Leguminosas*, S.n., Porto Alegre. Porto Alegre, 19-24.
- Fundo de População das Nações Unidas - Relatório Sobre a Situação da População Mundial 2011: <http://www.unfpa.org.br/swop2011/links/PT-SWOP11-WEB.pdf> em 20 de novembro de 2012.
- GERMAN, M.A.; BURDMAN, S.; OKON, Y.; KIGEL, J. (2000) Effects of *Azospirillum brasiliense* on root morphology of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under different water regimes. *Biology and Fertility of Soils*, 32: 259 – 264.
- GLICK, R. B.; KARATUROU, C. D. M.; NEWELL, P. C. A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting pseudomonas. *Canadian Journal of Microbiology*. 41: 533-536.
- GOMES, R.C.; SEMÊDO, L.T.; SOARES, R.M.; ALVIANO, C.S.; LINHARES, L.F.; COELHO, R.R. (2000) Chitinolytic activity of actinomycetes from a cerrado soil and their potential in biocontrol. *Applied Microbiology*. 30: 146-150.
- GOODFELLOW, M.; CROSS, T. (1984) Classification. In: GOODFELLOW, M.; MORDARSKI, M.; WILLIAMS, S.T. (eds.) *The Biology of the Actinomycetes*. London: Academic Press, 74-91.
- GOODFELLOW, M.; WILLIAM, S.T.; MORDARSKI, M. (1988) *Actinomycetes in biotechnology*. London, 501p.
- GOTTLIEB, D. (1973) General consideration and implications of the actinomycetales. In: SYKES, G.; SKINNER, F.A. (eds.) *Actinomycetales: Characteristics and practical importance*. London: Academic Press, p.1-10.
- GRIMES, H. D.; MOUNT, M. S. (1984) Influence of *Pseudomonas putida* on nodulation of *Phaseolus vulgaris*. *Soil Biology and Biochemistry*. 16: 27-30.

- HARPER, J.E. (1994) Nitrogen metabolism. *In*: BOOTE, K.J.; BENNETT, J.M.; SINCLAIR, T.R.; PALSEN, G.M. *Physiology and determination of crop yield*. Madison : ASA/CSSA/SSSA, p.285-302.
- HUNGRIA, M. (2011) *Inoculação com Azospirillum brasilense: inovação em rendimento a baixo custo*. Londrina: Embrapa-Soja, 20p.
- HUNGRIA, M.; FRNCHINI, J.C.; CAMPO, R.J.; GRAHAM, P. (2005) The importance of nitrogen fixation to soybean cropping in South America. *In*: WERNER, D.; NEWTON, W., (eds.) *Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment*. Dordrecht: Springer, p. 25-42.
- IBGE – País evolui mais nos indicadores econômicos e sociais do que nos ambientais:http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1156&id_pagina=1 em 25/02/2012.
- IBGE (2010). Indicadores de desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
- IGARASHI, Y. (2004) Screening of Novel Bioactive Compounds from Plant-Associated Actinomycetes. *Actinomycetologica*, 18: 63-66.
- JAMES EK, GYANESHWAR P, MATHAN N, BARRAQUIO WL, REDDY PM, IANNETTA PPM, OLIVARES FL, LADHA J.K. (2002) Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 15:894–906.
- KLOEPPER, J. W.; QUAD-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; HALLMANN, J. (1997). Recent studies on the microbial ecology of bacteria endophytes in plants. CD-ROOM dos *Anais do XXVI Congresso Brasileiro de Ciencia do solo*, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- KONTCHOU, C.Y.; BLONDEAU, R. (1992) Biodegradation of soil humic acids by *Streptomyces viridosporus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 38: 203–208.
- KUSS, A.V. (2006) *Fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado*. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Santa Maria - RS, Universidade Federal de santa Maria – UFRB, 109p.
- LARGE, K.P.; MIRJALILI, K.; OSBORNE, M.; PEACOCK, L.M.; ZORMPAIDIS, V.; WALSH, M.; CAVANAGH, M.E.; LEADLAY, P.F.; ISON, A.P. (1999) Lipase activity in *Streptomyces*. *Enzyme and Microbial Technology*, 25: 569-575.

- LEALEM, F.; GASHE, B. A. (1994) Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eraglostis tef*). *Journal of Applied Bacteriology*, 77: 348-352.
- LEWIS, K.J. (1988) *Biological control mechanism of the mycoparasite Pythium oligandrum* Dreschler. Tese (Doutorado) – Sheffield – University of Sheffield.
- LI, J.; ZHAO, G.Z.; QIN, S.; ZHU, W.Y.; XU, L.H.; LI, W.J. (2009) *Streptomyces sedi* sp. nov., isolated from surface-sterilized roots of *Sedum* sp. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59:1492–1496.
- LIMA, J.L. (2002) *Seleção de actinomicetos para o controle biológico de Ralstonia solanacearum e promoção de crescimento de mudas de tomateiro*. Dissertação (Mestre em Ciências Agrárias) – Cruz das Almas – BA, Universidade Federal da Bahia - UFBA, 63p.
- LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. (2009) Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63: 541 - 556.
- LUZ, W. C. (1996) Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e bioproteção. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 4: 1-49.
- LYNCH, J. M. (1982) Interaction between bacteria and plants in the root environment. In: RHODESROBERT, M. E.; SKINNER, F. A. (eds.) *Bacteria and plants*. London: Academic, p. 1-23.
- MANLAY, R.J., FELLER, C.; SWIFT, M.J. (2007) Historical evolution of soil organic matter concepts and their relationships with the fertility and sustainability of cropping system. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 119: 217–233.
- MARIANO, R.L.R.; MICHEREFF, S.J.; SILVEIRA, E.B.; ASSIS, S.M.P.; GOMES, A.M.A. (2000) Isolamento de bactérias para testes de antagonismo. In: MARIANO, R.L.R. (eds.). *Manual de práticas em fitobacteriologia*. Recife: O autor, p. 115 – 119.
- MARQUES JUNIOR, R.; CANELLAS, L.P.; SILVA, L.G.; OLIVARES, F.L. (2008) Promoção de enraizamento de microtoletes de cana-de-açúcar pelo uso conjunto de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 32: 1121-1128.

- MAUKONEN, J.; MATTILA-SANDHOLM T., WIRTANEN, G. (2000) Metabolic indicators for assessing bacterial viability in hygiene sampling using cells in suspension and swabbed biofilm. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*, 33: 225-233.
- McNEW, G.L. (1960) The nature, origin, and evolution of parasitism. In: HORSFALL, J.G.; DIMOND, A.E. *Plant Pathology: An advanced Treatise*. New York: Academic Press, p. 19-69.
- MEGURO, A.; OHMURA, Y.; HASEGAWA, S.; SHIMIZU, M; NISHIMURA, T; KUNOH, H. (2006) An endophytic actinomycete, *Streptomyces* sp. MBR-52, that accelerates emergence and elongation of plant adventitious roots. *Actinomycetologica* 20: 1–9.
- MERCANTE, F.M.; GOI, S.R.; FRANCO, A.A. (2002) Importância dos compostos fenólicos na interação entre espécies leguminosas e rizóbio. *Revista Universidade Rural, Série Ciências da Vida*, 22: 65-81.
- MIFLIN, B.J., LEA, P.J. (1976) The pathway of nitrogen assimilation in plants. *Phytochemistry*, 15: 873-885.
- MONTEIRO, R.A., SCHMIDT, M.A., BAURA, V.A., BALSANELLI, E., WASSEM, R., YATES, M.G., RANDI, M.A.F., PEDROSA, F.O., SOUZA, E.M. (2008) Early colonization pattern of maize (*Zea mays* L. *Poales, Poaceae*) roots by *Herbaspirillum seropedicae* (*Burkholderiales, Oxalobacteraceae*). *Genetics and Molecular Biology*, 31(4): 932-937.
- MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. (eds.) (2002) *Microbiologia e bioquímica do solo*. Lavras: Ufla, 626p.
- MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. (eds.) (2006) *Microbiologia e bioquímica do solo*. Lavras: Ufla, 729p.
- MOREIRA, F.M.S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R.S.A.; CARVALHO, F. (2010) Bactérias diazotróficas associativas: diversidade ecologia e potencial de aplicações. *Comunicata Scientiae*, 1: 74 - 99.
- NANNIPIERI, P.; GREGO, S.; DELL'AGNOLA, G.; NARDI, S. (1993) Proprietà biochimiche e fisiologiche della sostanza organica. In: NANNIPIERI, P. (ed.) *Ciclo della sostanza organica nel suolo: aspetti agronomici, chimici, ecologici, ecologici y selvicoltureali*. Bologna: Patron, p. 67-78.

- NARDI S., PIZZEGHELLO D., MUSCOLO A., VIANELLO A. (2002) Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 34: 1527–1536.
- NARDI, S.; ARNOLD, G.; DELL' AGNOLA, G. (1989) Effect of actinomycete metabolites of ion absorption by rice seedlings. *The Science of the Total Environment*, 81/82: 675 – 678.
- NDAW, S.M.; RACHID, C.T.C.; BENTO, M.A.O.; PEIXOTO, R.S.; ROSADO, A.S.; CANELLAS, L.P.; OLIVARES, F.L. (2011) A aplicação combinada de bactérias diazotróficas e ácidos húmicos modifica a comunidade bacteriana rizosférica e a associada às raízes de milho. CD-ROOM do *Anais do IX Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas*, Aracajú, SE, Brasil.
- NEJAD, P.; JOHNSON, P.A. (2000) Endophytic bacteria induce growth promotion and wilt disease suppression in oilseed rape and tomato. *Biological Control*, 18: 208-215.
- OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J. I. (2002) The effect of inoculating endophytic N₂ - fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant and Soil*, 242: 205-215.
- OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J.I. (2003) *Processos e mecanismos envolvidos na influência de microorganismos sobre o crescimento vegetal*. Seropédia: Embrapa Agrobiologia, 40 p.
- PADILHA, G. (1998) Biologia molecular de *Streptomyces* e aplicações industriais. *In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (eds.) Ecologia Microbiana*, Jaguariúna: EMBRAPA – CNPMA, p.327-343.
- PAN, S.C.; BONANNO, S.; WAGMAN, G.H. (1959) Efficient utilization of fatty oils as an energy source in penicillin fermentations. *Applied Microbiology*, 7: 176-180.
- PEDROSA, F.O.; MONTEIRO, R.A.; WASSEM, R.; CRUZ, L.M.; AYUB, R.A.; et al. (2011) Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. *PLoS Genet* 7.
- PEREIRA, J. C. (2000) *Interações entre as Populações de Actinomicetos e outros Organismos na Rizosfera*. EMBRAPA Agrobiologia, 15p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 118).

- PEREIRA, J.C.; NEVES, M.C.P.; DROZDOWICZ, A. (1999) Influência da antibiose exercida por actinomicetos às estirpes de *Bradyrhizobium* spp., na nodulação da soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 34: 99-108.
- PERIN, L. (2003) *Ecologia e Diversidade de Gluconacetobacter Diazotrophicus Associada à Cana-de-açúcar (Saccharum spp.)*. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Seropédica – RJ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ, 63p.
- PETROSYAN, P.; GÁRCIA-VARELA, M.; LUZ-MADRIGAL, A.; HUITRÓN, C.; FLORES, M.E. (2003) *Streptomyces mexicanus* sp., a xylanolytic microorganism isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 269-273.
- PICCOLO, A. (2002) The supramolecular structure of humic substances: A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Advances in Agronomy*, 75: 57-134.
- POMETTO, A. L., III, AND D. L. CRAWFORD. (1986). Effects of pH on lignin and cellulose degradation by *Streptomyces viridosporus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 52:246-250.
- PRIDHAM, T.G.; HESSELTINE, C.W.; BENEDICT, R.G. (1958). A Guide for the Classification of Streptomycetes According to Selected Groups. *Applied Microbiology*. 6: 52-79.
- QIN, S.; YUAN, B.; ZHANG, Y.; BIAN, G.; TAMURA, T.; SUN, B.; LI, W.; JIANG, J. (2012) *Nocardioides panzhuhuaensis* sp. nov., a novel endophytic actinomycete isolated from medicinal plant *Jatropha curcas* L.. *Antonie van Leeuwenhoek*, 102: 353 – 360.
- RODRIGUES, K. *Identificação, produção de antimicrobianos e complexos enzimáticos de isolados de actinomicetos*. Dissertação (Mestre em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente) – Porto Alegre – RS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, 129p.
- RONG, X.; HUANG, Y. (2010) Taxonomic evaluation of the *Streptomyces griseus* clade using multilocus sequence analysis and DNA-DNA hybridization, with proposal to combine 29 species and three subspecies as 11 genomic species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60: 696 – 703.

- SADEGHI, A., KARIMI, E., DAHAZI, P.A., JAVID, M.G., DALVAND, Y., ASKARI, H. (2012), Plant growth promoting activity of an auxin and siderophore producing isolate of *Streptomyces* under saline soil condition. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 28: 1503–1509.
- SALA, V.M.R.; FREITAS, S.S.; DONZELI, V.P.; FREITAS, J.G.; GALLO, P.B.; SILVEIRA, A.P.D. (2005) Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 29:345-352.
- SALAMONI, S.P. (2005) *Produção e caracterização de celulases secretadas por Streptomyces sp. isolado de processo de compostagem*. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente) – Porto Alegre – RS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, 102p.
- SANTOS, V.C.P. (2010) *Atividade antibacteriana de Burholderia sp. endofíticas e da rizosfera de cana-de-açúcar*. Tese (Doutorado em Agronomia) – Piracicaba – SP, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ-USP, 94p.
- SARATHAMBAL, C.; THANGARAJU, M.; PAULRAJ, C; GOMATHY, M. (2010) Assessing the Zinc solubilization ability of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in maize rhizosphere using labelled ⁶⁵Zn compounds. *Indian Journal of Microbiology*, 50: 1003 – 109.
- SCOLARI, D. D. G. (2007). *Produção Agrícola Mundial: o potencial do Brasil*. Disponível em www.alice.cnptia.embrapa.br/.../doc/.../Producaoagricolamundial.pdf – acesso em 12 de março de 2012.
- SIERRA, S.A. (1957) Simple method for detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Laeuwenhoek*, 23: 15 – 22.
- SILVA, A.C.; CANELLAS, L.P.; OLIVARES, F.L.; DOBBSS, L.B.; AGUIAR, N.O.; FRADE, D.A.R.; REZENDE, C.E.; PERES, L.E.P. (2011) Promoção de crescimento radicular de plântulas de tomateiro por substâncias húmicas isoladas de turfeira. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 35: 1609-1617.
- SILVA, I.R.; MENDONÇA, E.S. (2007) Matéria orgânica do solo. In: NOVAES, R.F.; ALVAREZ, V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B.; NEVES, J.C.L. (eds.) *Fertilidade do solo*. Viçosa: SBCS, p. 275-374.

- SILVA, M.F. (2009) *Uso de inoculante polimérico contendo bactérias diazotróficas na cultura da cana-de-açúcar*. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Seropédica – RJ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, 91p.
- SILVEIRA, E. B. (2001) Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontrole de doenças. *In: MICHEREFF, S.; BARROS, R. (eds.) Proteção de plantas na agricultura sustentável*, Recife: UFRPE, p. 71-100.
- SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G. (1999) *Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas*. Lavras: Ufla, 818p.
- SOARES, A.C.F.; SOUSA, C.S.; GARRIDO, M.S.; LIMA, F.S. (2010) Isolados de estreptomicetos no crescimento e nutrição de mudas de tomateiro. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 40: 447-453.
- SOARES, A.C.F.; SOUSA, C.S.; GARRIDO, M.S. (2009) Streptomycetes antagonismo against *Cladosporium fulvum* Cooke na *Fusarium oxysporium* f.sp. lycopersici. *Ciência Rural*, 39: 1897 – 1900.
- SOUSA, C.S. (2006) *Estreptomicetos promotores de crescimento e agentes de biocontrole da meloidoginose no tomateiro*. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Cruz das Almas – BA, Universidade Federal da Bahia – UFBA, 102p.
- SOUSA, C.S.; SOARES, A. C. F.; GARRIDO, M. S.; LIMA, F.S. (2009) Estreptomicetos no controle de *Scutellonema bradys* em tuberas de inhame. *Revista Ciência Agrônômica*, 40: 486-491.
- SOUZA, V.C.; SILVA, R.A.; CARDOSO, G.D.; BARRETO, A.F. (2006). Estudos sobre fungos micorrízicos. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 10: 612-618.
- TAKAHASHI, K.; HAYASHI, K.; KINOSHITA, T. (2012) Auxin activates the plasma membrane H⁺ATPase by phosphorylation during hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 159(2): 632 – 641.
- TERAMOTO, A.; MARTINS, M.C.; CUNHA, M.G. (2011) Avaliação de métodos para preservação de isolados de *Corynespora cassicola* (Berk & M.A. Curtis) C.T. Wei. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 41: 296 – 298.

- TREVISAN, S.; FRANCIOSO, O.; QUAGGIOTTI, S.; NARDI, S. (2010) Humic substances biological activity at the plant-soil interface: from environmental aspects to molecular factors. *Plant Signaling Behavior*, 5: 635-643.
- TRIGO, C.; BALL, A.S. (1994) Is the solubilized product from the degradation of lignocellulose by actinomycetes a precursor of humic substances?. *Microbiology – UK*, 140: 3145–3152.
- TSAVKELOVA, E. A.; CHERDYNTSEVA, T.A.; KLIMOVA, S.Y.; SHESTAKOV, A.I.; BOTINA, S.G. & NETRUSOV, A.I. (2007) Orchid-associated bacteria produce indole-3- acetic acid, promote seed germination, increase their microbial yield in response to exogenous auxin. *Archives of Microbiology*, 188: 655-664.
- TUITE, J. (1969) *Plant Pathologic Methods: Fungi and Bacterias*. Minneapolis: Burgess, 239p.
- UJIKAWA, K. (2003) Antibióticos antifúngicos produzidos por actinomicetos do Brasil e sua determinação preliminar nos meios experimentais. *Brazilian Journal of Pharmacy Sciences*, 39: 149-158.
- van LOON, L.C.; BAKKER, P.A.H.M.; (2005) Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria. In: SIDDIQUI, Z.A. (ed.) *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, Dordrecht: Springer, p. 39 - 66.
- VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. (ed) (1997) *Biologia dos solos dos Cerrados*. Planaltina: Embrapa Cerrados, 524p.
- VASCONCELOS, E.S. (2008) *Caracterização bioquímica e morfológica de mutantes de Streptomyces claurigerus ATCC 27064 através de aplicação de radiação UV e tratamento químico*. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – São Carlos – SP, Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, 89p.
- VENKATACHALAM, P.; RONALD, J.; SAMBATH, K. (2010). Effect of soil Streptomuces on seed germination. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 1: 145 – 155.
- VESSEY, J.K. (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255: 571 – 586.

- WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. (2000) Bactérias diazotróficas em mudas de bananeira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35: 2277-2285.
- WEBER, O.B.; BALDANI, V.L.D.; TEIXEIRA, K.R.S.; KIRCHHOF, G.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. (1999) Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. *Plant and Soil*, 210: 103-113.
- WELBAUM, G.; STURZ, A.V.; DONG, Z.; NOWAK, J. (2004) Fertilizing soil microorganisms to improve productivity of agroecosystems. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 23: 175 - 193.
- WELLER, D. M. (1998) Biological control of soilborne plant pathogens in rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 26: 379-407.
- WHIPPS, J. M. (1985) Effect of CO₂ concentration on growth, carbon distribution and loss of carbon from the roots of maize. *Journal of Experimental Botany*, 36: 644-651.
- XU, P.; LI, W.J.; WU, W.L.; WANG, D.; XU, L.H.; JIANG, C.L. (2004) *Streptomyces hebeiensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54:727–731.
- YANAGI, Y.; TAMAKI, H.; OTSUKA, H.; FUJITAKE, N. (2002) Comparison of decolorization by microorganisms of humic acids with different ¹³C NMR properties. *Soil Biology and Biochemistry*, 34: 729–731.
- ZAGO, V. C. P.; FONSECA, M. C. C.; DE-POLLI, H.; RUMJANEK, N. G. (2000b) Estudo das populações de *Pseudomonas fluorescentes* spp. em rizosfera de couve sob diferentes adubações. CD-ROOM dos *Anais do Fertbio 2000*, Santa Maria, RS, Brasil.
- ZAGO, V.C.P.; DE-POLLI, H.; RUMJANEK, N.G. (2000a) *Pseudomonas* spp. *Fluorescentes – Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontroladoras de fitopatógenos em sistemas de produção agrícola*. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 32 p.
- Zhi-Qi Q, Li-Xiang C, Hong-Ming T, Shi-Ning Z (2005). Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* sp. S5 with herbicidal activity from tomato roots. *Journal of Agriculture and Biotechnology*, 13: 538-543.

APÊNDICE

7.1 Meios de cultura**Agar Água**

Agar.....6 g

Completar o volume para 1000 mL com água destilada

Não precisa ajustar o pH

Amido Agar (HIMEDIA®)

Digestão péptica de tecido animal.....5 g

NaCl.....	5 g
Extrato de carne bovina.....	1,5 g
Extrato de levedura.....	1,5 g
Amido solúvel.....	2 g
Agar.....	15 g
Ácido glutâmico.....	1,5 g
pH final 7,4	
Completar o volume para 1000 mL com água destilada	

AGS

L-Arginina.....	1 g
Glicerol.....	12,5 mL
K ₂ HPO ₄	1 g
NaCl.....	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,5 g
Solução de micronutrientes para meio de cultura.....	1 mL
Ajustar o pH para 7,2	
Completar o volume para 1000 mL com água destilada	
Adicionar agar (20 g L ⁻¹ para sólido)	

NB

Caldo nutritivo.....	8 g
Completar o volume para 1000 mL com água destilada	
Adicionar agar (15 g L ⁻¹ para sólido)	
Não precisa ajustar o pH	

DYG'S

Glicose.....	2 g
Ácido málico.....	2 g
Peptona bacteriológica.....	1,5 g
Extrato de levedura.....	2 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,5 g
Ácido glutâmico.....	1,5 g

Ajustar o pH para 6,0 com KOH

Completar o volume para 1000 mL com água destilada

JNFb

Ácido málico.....		5 g
K ₂ HPO ₄	solução 10%.....	6 mL
KH ₂ PO ₄	solução 10%.....	18 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	solução 10%.....	2 mL
NaCl.....	solução 10%.....	1 mL
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	solução 1%.....	2 mL
FeEDTA.....	solução 1,64%.....	4 mL
Azul de bromotimol	solução de 0,5% em 0,2N de KOH.....	2 mL
Solução de micronutrientes para meio de cultura.....		2 mL
Vitamina para meio de cultura.....		1 mL
KOH.....		4,5 g

Ajustar o pH para 5,8

Completar o volume para 1000 mL com água destilada

Adicionar agar (1,7 g L⁻¹ para semissólido e 17 g L⁻¹ para sólido)

Obs.:

Para meio sólido, adicionar 20 mg de extrato de levedura

Para meio líquido, adicionar 1 g L⁻¹ de cloreto de amônio

JNFb + AH

Ácido húmico.....		0,1 g
K ₂ HPO ₄	solução 10%.....	6 mL
KH ₂ PO ₄	solução 10%.....	18 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	solução 10%.....	2 mL
NaCl.....	solução 10%.....	1 mL
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	solução 1%.....	2 mL
FeEDTA.....	solução 1,64%.....	4 mL

Solução de micronutrientes para meio de cultura.....2 mL

Vitamina para meio de cultura.....1 mL

Ajustar o pH para 6,8

Completar o volume para 1000 mL com água destilada

Obs.:

Dissolver previamente o ácido húmico em 1 mL de base forte

JNFb + AH quimicamente modificado por actinobactérias (semissólido)

K_2HPO_4 solução 10%.....6 mL

KH_2PO_4 solução 10%.....18 mL

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ solução 10%.....2 mL

NaCl..... solução 10%.....1 mL

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ solução 1%.....2 mL

FeEDTA..... solução 1,64%.....4 mL

Solução de micronutrientes para meio de cultura.....2 mL

Vitamina para meio de cultura.....1 mL

Ajustar o pH para 6,8

Completar o volume para 1000 mL com água destilada

Adicionar agar $1,7 \text{ g L}^{-1}$

Obs.:

Distribuir em vidros de penicilina

Acrescentar 25 μL de filtrado de meio líquido “JNFb + AH” incubado por 21 dias com actinobactéria antes de solidificar

LGI-P

Açúcar cristal.....100 g

K_2HPO_4 solução 10%.....2 mL

KH_2PO_4 solução 10%.....6 mL

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ solução 10%.....2 mL

$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ solução 0,1%.....2 mL

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ solução 1%.....2 mL

$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ solução 1%.....1 mL

Azul de bromotimol solução de 0,5% em 0,2N de KOH.....5 mL
 Vitamina para meio de cultura.....1 mL
 Ajustar o pH para 5,5 com solução de 10% ácido acético
 Completar o volume para 1000 mL com água destilada
 Adicionar agar (1,6 g L⁻¹ para semissólido e 25 g L⁻¹ para sólido)

Obs.:

Para meio sólido, adicionar 50 mg de extrato de levedura

Para meio líquido, adicionar 1 g L⁻¹ de cloreto de amônio

Mínimo de sais

Xilana ou celulose.....1 g
 NaNO₃.....0,5 mL
 K₂HPO₄.....1 g
 MgSO₄.7H₂O.....0,5 g
 FeSO₄.7H₂O.....0,01 g
 Extrato de levedura.....1 g

Não precisa ajustar o pH

Completar o volume para 1000 mL com água destilada

Adicionar agar (15 g L⁻¹ para sólido)

Sierra

Peptona.....10 g
 NaCl.....5 mL
 Tween 80.....10 mL

Não precisa ajustar o pH

Completar o volume para 1000 mL com água destilada

Adicionar agar (15 g L⁻¹ para sólido)

Obs.:

Dissolver 10 mL de Tween 80 em 40 mL de água destilada em recipiente à parte. Após autoclavagem, misturar a solução com Tween 80 ao meio autoclavado, ambos ainda quentes.