

PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DO  
CRESCIMENTO VEGETAL ASSOCIADAS A VERMICOMPOSTOS

**KAMILLA PEREIRA AGUIAR**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTAZES-RJ  
MARÇO -2012

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do **CCTA / UENF** 037/2012

Aguiar, Kamilla Pereira

Prospecção de bactérias promotoras do crescimento vegetal associadas à vermicompostos / Kamilla Pereira Aguiar. – 2012.  
100 f. : il.

Orientador: Fábio Lopes Olivares

Dissertação (Mestrado - Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2012.

Bibliografia: f. 63 – 86.

1. Fixação biológica de nitrogênio 2. Solubilização de fósforo e zinco 3. Auxina 4. Enriquecimento biológico de substrato 5. Degradação de celulose I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD – 631.4

PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DO  
CRESCIMENTO VEGETAL ASSOCIADAS A VERMICOMPOSTOS

**KAMILLA PEREIRA AGUIAR**

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. Fábio Lopes Olivares

CAMPOS DOS GOYTAZES-RJ  
MARÇO -2012

PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL  
ASSOCIADAS A VERMICOMPOSTOS

**KAMILLA PEREIRA AGUIAR**

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 23 de março de 2012

Comissão Examinadora:

---

Prof. Luciano Pasqualoto Canellas (Ph.D., Ciência do Solo) – UENF

---

Prof. Fábio Bueno dos Reis Junior (Ph.D., Ciência do Solo) - EMBRAPA  
CERRADOS

---

Prof. Alena Torres Netto (D.Sc., Produção Vegetal) - UENF

---

Fábio Lopes Olivares (Ph.D., Microbiologia do Solo) - UENF  
Orientador

Aos meus pais Mateus Aguiar e Rita Maria Pereira Aguiar,  
pelo exemplo de vida, pelo incentivo e amor incondicional;

Aos meus irmãos Saulo José e Cassiana;

Aos meus sobrinhos Heitor e Laura

Dedico

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus;

Aos grandes amores de minha vida, meus pais, Mateus e Rita que sempre acreditaram em mim, que me deram a oportunidade de estar realizando mais um sonho, que me protegeram e ensinaram;

Aos meus irmãos Cassiana e Saulo, especiais para sempre!

Aos meus queridos sobrinhos Heitor e Laura;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, pela oportunidade de conviver e aprender com profissionais brilhantes;

Ao Professor Fábio Lopes Olivares, pela oportunidade, atenção e empenho na realização desse trabalho, pela contribuição com seus conhecimentos, pela amizade, paciência e convivência bem-humorada;

Ao professor Luciano Pasqualoto Canellas pelos vermicompostos cedidos, pelos conhecimentos ensinados, pelo apoio e amizade;

Aos companheiros de trabalho do NUDIBA e LBCT;

Aos técnicos de laboratório, em especial Adrianinha e Rívia, pela ajuda fundamental para realização desse trabalho;

Às minhas queridas amigas Natália Aguiar, Dariellys Balmori, Inga Gonçalves, Janaína Hottz e Carolina Robaina pela ajuda, pela amizade, pelos momentos de alegria e de descontração fundamentais em minha vida;

A CAPES- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e ao INCT para Fixação Biológica de Nitrogênio, pela concessão da bolsa de mestrado;

Um agradecimento especial a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	x
1. INTRODUÇÃO .....	1
OBJETIVO GERAL .....	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1. Bactérias promotoras do crescimento vegetal .....	4
2.1.1. Fixação Biológica de Nitrogênio (N).....	6
2.1.2. Solubilização de fosfato .....	7
2.1.3. Produção de Fitormônios.....	9
2.2. Compostagem/Vermicompostagem.....	12
2.2.1. Comunidade microbiológica de compostos e vermicompostos .....	14
2.2.2. Bioatividade das substâncias húmicas e vermicompostos .....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	19
3.1. Vermicompostos utilizados .....	19
3.2. Quantificação de bactérias fixadoras de nitrogênio nos diferentes vermicompostos.....	20
3.3. Isolamento das bactérias diazotróficas e não diazotróficas .....	21



3.4. Isolamento de micro-organismos que utilizam ácido húmico como fonte de carbono.....	22
3.5. Caracterização morfológica e cultural dos isolados .....	22
3.6 Capacidade de fixar nitrogênio .....	23
3.7. Capacidade de solubilização de fosfato.....	24
3.8. Capacidade de solubilização de zinco .....	24
3.9. Quantificação em meio de cultura da produção de compostos indólicos....	24
3.10. Degradação de celulose .....	25
3.11. Avaliação da capacidade de promoção de crescimento em milho inoculado em sistemas axênicos.....	25
3.11.1. Análise de crescimento .....	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	27
4.1 Isolamento e contagem das bactérias .....	27
4.2 Características morfológicas dos isolados bacterianos .....	32
4.3 Classificação dos micro-organismos isolados quanto às características fenotípicas da colônia segundo Perin (2003).....	38
4.4 Características fenotípicas relacionadas à promoção de crescimento dos micro-organismos isolados .....	42
4.5 Avaliação de crescimento em plântulas de milho em sistemas axênico .....	52
5. RESUMO E CONCLUSÕES .....	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

## RESUMO

AGUIAR, Kamilla, P. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Março de 2012. PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL ASSOCIADAS A VERMICOMPOSTOS. Orientador: Prof. Fabio Lopes Olivares.

O processo de vermicompostagem envolve uma série de transformações da matéria orgânica catalizadas por comunidades microbianas complexas e pela ação de minhocas que resultam na formação de um produto com grande potencial de uso na agricultura. Os vermicompostos constituem uma fonte diversa de micro-organismos cujo potencial biofertilizante e bioestimulante para plantas tem sido pouco explorado. O Núcleo de Desenvolvimento de Insumos Biológicos para a Agricultura (NUDIBA) da UENF produz vários tipos de vermicompostos a partir de diferentes resíduos. Foi estabelecido um programa preliminar de prospecção microbiana com intuito de obter bactéria candidatas a compor formulações envolvendo inoculantes, substratos agrícolas biologicamente enriquecidos e fertilizantes organo-minerais. O presente trabalho tem como objetivos quantificar, isolar e caracterizar o potencial de promoção de crescimento de diferentes micro-organismos obtidos a partir de diluições seriadas dos vermicompostos produzidos com esterco bovino (VC1), esterco e bagaço

de cana (VC2), esterco e torta de girassol (VC3), esterco bovino, torta de girassol e bagaço de cana (VC4) e esterco e torta de filtro (VC5), além de fragmentos de intestino de minhoca. Para avaliação do potencial de inóculo das bactérias diazotróficas presentes nas diferentes fontes de matéria orgânica estabilizada foi proposta uma nova metodologia baseada na quantificação das populações bacterianas induzidas ou não pela aplicação de fontes de carbono ou exsudados da rizosfera. Os isolados bacterianos com potencial diazotrófico foram obtidos a partir do meio semi-sólido JNFB isento de N e as bactérias não fixadoras de N foram obtidas a partir de placas contendo meio sólido Dygs. Ademais, a partir de um meio sólido modificado, contendo ácidos húmicos ( $20 \text{ mg C L}^{-1}$ ) como fonte única de carbono, foram realizadas tentativas de obtenção de micro-organismos capazes de utilizar ácidos húmicos como fonte de energia para futuros trabalhos de enriquecimento biológico de substratos agrícolas. Foram caracterizados 89 isolados em relação ao tipo de colônia, morfologia celular ao microscópio óptico, coloração de gram e traços fenotípicos relacionados à promoção do crescimento (solubilização de P e Zn, fixação de N, produção de compostos indólicos, degradação de celulose). Esses micro-organismos foram divididos em três grupos (I, II e III) de acordo com a fonte dos isolados e o meio de isolamento. Os resultados evidenciaram que dos 39 isolados pertencentes ao grupo I, 16% foram capazes de solubilizar P, 9% capazes de solubilizar Zn, 16% apresentaram atividade positiva para fixação biológica de N, 15% degradaram celulose e 100% produziram AIA a partir do triptofano. Dos 19 isolados pertencentes ao grupo II 100% apresentaram atividade positiva para fixação de N, 20% para solubilização de P e 8% para solubilização de Zn, 2% degradaram celulose e 100% foram capazes de produzir AIA. Dos 31 isolados pertencentes ao grupo III, 23% foram capazes de solubilizar P, 7% solubilizaram Zn, 16% degradaram celulose, 100% das bactérias foram capazes de produzir AIA e curiosamente 100% das bactérias apresentaram atividade positiva para fixação biológica de N atmosférico. Além disso, os isolados foram testados quanto ao potencial de promoção de crescimento vegetal em condições monoxênicas utilizando milho como planta modelo. Para esses testes foram analisados os seguintes parâmetros: Matéria fresca e seca da raiz,

matéria fresca e seca da parte aérea e relação raiz/parte aérea. Os resultados mostraram que os isolados pertencentes ao grupo I apresentaram apenas um parâmetro (MFR) estatisticamente significativo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Para o grupo II os parâmetros estatisticamente significativos foram CR, MFR e MSR. Já no grupo III todos os parâmetros analisados foram estatisticamente significativos. O estudo dos micro-organismos nestes vermicompostos contribui para melhor entendimento sobre a diversidade microbiana e pode garantir o sucesso em etapas subsequentes do programa de desenvolvimento de insumos biológicos para agricultura desenvolvidos no NUDIBA.

**Palavras-chave:** FBN, solubilização de fosfatos, solubilização de zinco, produção de auxinas, enriquecimento biológico de substratos, degradação de celulose.

## ABSTRACT

AGUIAR, Kamilla, P. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. March, 2012 Bioprospecting PROMOTING THE GROWTH OF BACTERIA ASSOCIATED WITH VEGETABLE vermicomposting. Advisor: Prof<sup>o</sup>. Fabio Lopes Olivares.

The vermicomposting process involves a serial sequence of organic matter transformations catalyzed by complex microbial communities and through the action of worms that result in the formation of a product with great potential for use in agriculture. The vermicompost represents a source of diverse microorganisms whose biofertilizer potential for plants has been little explored. From different waste materials, various types of vermicompost have been produced at the Center for Development of Biological Resources for Agriculture (NUDIBA/UENF), which served as source material for preliminary prospective program to obtain selected microorganisms to compose bacterial inoculant formulations, agricultural substrates biologically enriched and organo-mineral fertilizers. The present work aims to quantify, isolate, identify and characterize the potential for plant growth promoting different bacterial isolates obtained from serial dilutions of the vermicompost from: cattle manure (E), filter cake (TF), manure with sugar cane bagasse (SCB), filter cake with sunflower cake

(TG) and filter cake plus sunflower cake (TGBC). To assess the inoculum potential of diazotrophic bacteria from different sources of stabilized organic matter it was proposed a new methodology based on the quantification of bacterial populations induced by the application of carbon sources or exudates from plant rhizosphere. The bacterial isolates with diazotrophic ability were obtained from JNFb semi-solid N-free medium and the non-diazotrophic bacteria obtained from plates containing solid Nutrient Broth medium. Moreover, from a modified solid medium containing humic acid (20 mg C L<sup>-1</sup>) as the sole carbon source, attempts are made to obtain microorganisms capable to use humic acids as an energy source, which could be used for future work involving biological enrichment of agricultural substrates. At the present work, 89 isolates were obtained according to colony characteristics, cell morphology under optical microscopy, Gram stain, and phenotypic traits related to growth promotion properties (solubilization of P and Zn, production of indole compounds, degradation of cellulose). The results obtained showed that 56% and 19% were capable to solubilize P and Zn, respectively. The ability to produce AIA was positive to 100% of the isolates and 24% were able to access cellulose as a carbon source. The microorganisms obtained were divided in three groups (I, II and III) according to the source and medium used for isolation. Thirty nine isolates belonging to group I were obtained, 16% and 9% were capable, respectively to solubilized P and Zn, 16% were able to fix nitrogen, 15% were cellulose degrading positive. From 19 isolates coming from the group II, all of them were diazotrophic bacteria, 20 and 8% can solubilized respectively P and Zn and 2% use cellulose as carbon source. Group III comprises 31 isolates able to use humic acid, which 23 and 7% were capable to solubilized P and Zn and 16% were cellulose degrading. Curiously, all bacteria obtained from this group were able to fix nitrogen. Moreover, all the isolates were tested for plant growth potential under monoxenic conditions using maize as a model plant. The biometric parameters analyzed were fresh and dry matter of shoots and roots and the results had shown positive effect for root fresh matter (group I) related to uninoculated plants. The root length, fresh and dry root matter were stimulated for some isolates belonging to the group II and all biometric

parameters were positively affected by isolated from the group III. The statistical significance of all treatments was evaluated by Scott-Knott test with 5% of probability. The study of the microbial life in these vermicomposts provides a better understanding about its culturable microbial diversity and could guarantee success of subsequent steps in the direction of the development of a new generation of biological products applied to sustainable agriculture.

Keywords: vermicomposting, BNF, Phosphate solubilization, Zinc solubilization, auxin production, biological enrichment of substrates, plant growth promotion.

## 1. INTRODUÇÃO

O uso de micro-organismos que beneficiam o desenvolvimento de determinada cultura seja pela promoção de crescimento seja pelo controle biológico é conhecido há muito tempo. Romeiro (2007) cita que há séculos agricultores já utilizavam técnicas de inoculação de micro-organismos em sementes, mesmo sendo ainda de forma intuitiva usando esterco na hora do plantio. O autor destaca também os trabalhos realizados no oriente, ainda na década de 60, por Chineses que utilizavam sementes tratadas com bactérias.

As bactérias que habitam o sistema solo-planta são classificadas de acordo com a proximidade e intimidade com a raiz: bactérias de vida livre ou aquelas que vivem no solo ao redor das raízes e utilizam como fonte de C metabólitos liberados pelas raízes; bactérias epífitas ou as que colonizam o rizoplane (superfície da raiz); e bactérias endofíticas que residem no interior do tecido radicular.

Bactérias promotoras de crescimento vegetal – “*plant growth promoting bacteria*” (PGPB) estimulam o crescimento da planta através de efeitos biofertilizantes e bioestimulantes, aumentam a resistência a doenças, melhoram a habilidade da planta de resistir aos estresses (Sturz & Nowak, 2000). Diversos trabalhos têm demonstrado a utilização dos micro-organismos na forma de



inoculantes biológicos como uma tecnologia estratégica para a redução de dependência de insumos baseados em fontes energéticas não renováveis, poluentes e economicamente insustentáveis (Guimarães et al., 2007).

De acordo com Baldotto et al. (2010), o efeito bioestimulante de algumas bactérias resultou em maior crescimento e acúmulo de nutrientes no abacaxizeiro *Vitória* durante a aclimatização de plantas oriundas de micropropagação. (Perin et al (2003)) plântulas de milho inoculadas separadamente com bactérias *H. seropedicae* e *A. brasilense* apresentaram aumento da massa radicular e da parte aérea quando comparada à testemunha não inoculada aos 6 dias após a inoculação. O tratamento com inóculo misto também promoveu o crescimento das plântulas, principalmente na parte aérea.

Por outra parte, tem sido demonstrado também o efeito benéfico dos materiais vermicompostados e substâncias húmicas (SH) de diferentes fontes nas propriedades físicas, químicas e biológicas dos solos e, ainda, diretamente sobre o crescimento e desenvolvimento das culturas.

A vermicompostagem proporciona uma produção acelerada da matéria orgânica humificada, devido à ação de enzimas produzidas no tubo digestivo das minhocas e a atividade de micro-organismos neles existentes (Martinez, 1991). Dentro do trato digestivo, o material orgânico sofre transformações, havendo decomposição da matéria orgânica e liberação de nutrientes que podem ser posteriormente assimilados pelos vegetais (Balota, et al. 1998).

As SH solúveis (ácidos fúlvicos e ácidos húmicos) podem influenciar a acumulação de nutrientes e o crescimento vegetal (Vaughan & Malcolm, 1985). Em solução podem proporcionar o aumento da absorção de nutrientes devido à ativação da  $H^+$ -ATPase de membrana plasmática (Canellas & Santos, 2005). As  $H^+$ -ATPase são enzimas transmembranares capazes de hidrolizar ATP, gerando energia e gradiente eletroquímico que está diretamente envolvido em dois mecanismos fundamentais para o desenvolvimento e crescimento vegetal: (a) energização de sistemas secundários de translocação de íons fundamentais para a absorção de macro e micronutrientes, e (b) aumento da plasticidade da parede celular para possibilitar o processo de crescimento e divisão da célula vegetal (Hager et al., 1971).

Os ácidos húmicos promovem o crescimento vegetal aumentando o enraizamento e o número de sítios mitóticos. A maior emergência de raízes

laterais pode aumentar o número de pontos de colonização para as bactérias (Conceição et al., 2008). Isso significa que podem promover a população de bactérias benéficas, introduzidas na planta e, conseqüentemente, incrementar os efeitos positivos sobre a planta hospedeira (Marques Júnior, 2008).

A identificação das bactérias presentes nos processos da compostagem/vermicompostagem possibilita o conhecimento das espécies e suas atividades (Symanski, 2005) gerando a possibilidade de manipulação biológica durante a estabilização dos resíduos orgânicos.

O Núcleo de Desenvolvimento de Insumos Biológicos para a Agricultura (NUDIBA) trabalha na perspectiva de estudar diferentes vermicompostos com o objetivo de otimizar a produtividade agrícola. A identificação dos microorganismos presentes em vermicompostos constitui um fator fundamental para o entendimento das transformações da matéria orgânica. Além disso, os vermicompostos podem ser usados como fontes de diferentes bactérias promotoras do crescimento vegetal que podem ser usadas como inóculo em diferentes culturas.

#### **OBJETIVO GERAL:**

Realizar a prospecção de bactérias promotoras de crescimento associadas a diferentes vermicompostos para uso em biotecnologia de inoculantes e enriquecimento biológico de substratos agrícolas.

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Estabelecer uma metodologia para determinação do potencial de inóculo de bactérias fixadoras de nitrogênio em diferentes vermicompostos;
- Isolar e caracterizar culturalmente bactérias associadas a cinco vermicompostos;
- Isolar e caracterizar culturalmente bactérias que utilizam ácidos húmicos como fonte de carbono;
- Avaliar os isolados quanto à capacidade de fixar nitrogênio, solubilizar fósforo e zinco, secretar compostos indólicos e degradar celulose;
- Avaliar o efeito da inoculação dos isolados bacterianos sobre as plantas de milho em condições monoxênicas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Bactérias promotoras do crescimento vegetal

Bactérias promotoras de crescimento são conhecidas na literatura como “plant growth-promoting bacteria” (PGPB) ou “bactérias promotoras do crescimento de plantas” (BPCP), podem colonizar diferentes órgãos das plantas e exercem efeitos benéficos sobre as mesmas, podendo promover aumentos na taxa de germinação de sementes, no crescimento e desenvolvimento de órgãos vegetativos, na produção de flores e no rendimento das culturas em casa de vegetação e no campo (Amorim & Melo, 2002; Dey et al., 2004).

Na China, as BPCP são conhecidas e comercializadas como bactérias que aumentam a produtividade (Kloepper et al., 1997) e na década de oitenta do século passado já eram aplicadas em larga escala, em 48 diferentes culturas, atingindo 3,35 milhões de hectares (Wenhua & Hetong, 1997).

Trabalhos realizados com BPCP no Brasil tais como os de Stein (1988) e de Freitas (1989) testaram *Pseudomonas* do grupo fluorescente para aumentar o crescimento de plântulas de tomateiro e cafeeiro em condições de casa de vegetação e observaram efeito positivo nessas culturas.

As BPCP têm sido apontadas como essenciais ao ecossistema de plantas em relação ao suprimento de elementos de crescimento como nitrogênio, fósforo

e ferro (Chanway, 1997). Elas também podem atuar no aumento do comprimento das raízes e no número dos pelos radiculares através da produção de hormônios vegetais ou reguladores do crescimento vegetal como o ácido indol-acético (AIA), giberelinas e citocininas (Cattelan, 1999), no controle biológico (Pleban et al., 1995; Jimenez et al., 2001), na indução de resistência sistêmica a patógenos e na absorção de nutrientes pela solução do solo (Hallmann et al., 1997).

As BPCP são residentes epifíticas ou endofíticas. Seus efeitos benéficos podem ser observados em plantas propagadas “*in vitro*” e “*in vivo*” principalmente pelo aumento de área foliar, altura da planta, diâmetro do caule, número de folhas, redução do tempo de aclimatização, maior sobrevivência de mudas, controle de doenças e aumento de produtividade (Baldotto et al., 2010). Entre as principais BPCP endofíticas empregadas na agricultura estão espécies dos gêneros *Pseudomonas* (Mariano et al., 2004).

Experimentos em condições controladas e em condições de campo mostraram aumento da emergência de plântulas em até 100% ocasionadas por *P. fluorescens* e *P. putida*. Essas bactérias têm aumentado a emergência de plântulas, principalmente em condições de baixa temperatura do solo. Uma linhagem de *P. aeruginosa* e uma de *P. fluorescens* induziram aumento na germinação de sementes que haviam sido submetidas por 10 dias a condições de baixa temperatura (Kloepper et al., 1986). Esses mesmos autores verificaram que plantas originadas de sementes bacterizadas com *Pseudomonas*, submetidas a um período de frio, tiveram um conteúdo de matéria seca superior ao controle. A promoção da emergência de plântulas foi atribuída à produção de antibióticos por estas bactérias (Hofte et al., 1991). Dileep et al. (1998) inocularam sementes de arroz, amendoim e quiabo com espécies de *Pseudomonas* spp. do grupo fluorescente isoladas do rizoplano de arroz e pimentão. A germinação das sementes aumentou com a inoculação das espécies, sendo maior no amendoim. O comprimento dos ramos e raízes, crescimento das plântulas e produção das culturas também aumentaram com a inoculação (Dileep et al., 1998). Em plantas de alface hidropônico, Utkhede et al. (2000) verificaram que o produto formulado à base de *Bacillus subtilis*, além de aumentar a massa da matéria fresca da parte aérea das plantas e raízes, também reduziu o índice de doenças nas plantas.

A complexa comunidade de BPCV abriga diversos serviços ambientais relevantes como a fixação biológica de N atmosférico, solubilização de nutrientes, produção de fitormônios, transformação da matéria orgânica, entre outros.

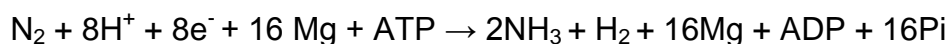
A busca de novas espécies e a utilização de bactérias com aplicabilidade biotecnológica tem cada vez mais respaldo nas pesquisas que visam desenvolver meios para exploração desses potenciais. A produção agrícola pode ter um aumento significativo com a inoculação de bactérias BPCV (Cadete et al., 2009).

### 2.1.1. Fixação Biológica de Nitrogênio (N)

O N é normalmente considerado o nutriente mais limitante para o desenvolvimento vegetal em seu ambiente natural (Franco & Döbereiner, 1994). Na maioria dos solos tropicais, a produção das culturas é severamente limitada pela deficiência de N, o que as torna dependentes da aplicação de adubos nitrogenados sintéticos ou de fontes nitrogenadas orgânicas naturais, tais como, os adubos verdes.

Desta forma, a fixação biológica do nitrogênio (FBN) é uma alternativa para um manejo sustentável dos solos (Hungria et al., 2000; Gliessman, 2001).

A FBN é o processo pelo qual o N<sub>2</sub> atmosférico inerte é transformado em NH<sub>3</sub> biologicamente útil para os organismos. Este processo é realizado na natureza apenas por um seleto grupo de procaríotos. Bactérias capazes de fixar o N do ar o fazem graças a complexos enzimáticos denominados nitrogenase (Baldani et al., 2002). Em condições ideais, este complexo é capaz de realizar esta conversão segundo a reação estequiometricamente balanceada (Simpson & Burris, 1984):



A seleção de bactérias diazotróficas pode ser feita com a detecção da atividade da enzima nitrogenase em culturas bacterianas (Park et al., 2005), pelo método de redução de acetileno ou por bioensaios como o desenvolvido por Döbereiner (1995a) que consiste em cultivar as bactérias em um meio semi-sólido isento de N e observar a formação de uma biopelícula aerotóxica característica, seguida de repicagens sucessivas no mesmo meio.

Algumas das espécies estudadas que fixam N são: *Rhodospirillum rubrum* (fotossintética), *Clostridium sp.* (anaeróbica), *Azotobacter spp.* e *Derxia spp.* (ambas aeróbicas), *Azospirillum spp.*, *Herbaspirillum spp.*, *Gluconacetobacter*

*diazotrophicus*, *Azorhizobium caulinodans*, *Azoarcus spp.* e *Burkholderia spp.* (microaeróbicas), além de alguns representantes das cianobactérias e actinomicetos (*Frankia sp.*) (Stacey et al., 1992). Existem outros diazotrofos descritos na literatura: *Beijerinckia* (Döbereiner, 1961), *Klebsiella* (Ladha et al., 1983), *Pseudomonas* (Barraquio et al., 1983), *Campylobacter* (McClung & Patriquin, 1980), *Enterobacter* (Haahtela et al., 1981) e *Paenibacillus* (Ash et al., 1993).

Houve um avanço muito significativo das pesquisas sob diversos aspectos da interação planta e bactérias diazotróficas associadas a plantas da família das *Poaceas* (gramíneas). Foram encontradas três bactérias fixadoras de N, as quais se multiplicavam seletivamente nas raízes de milho, sorgo, trigo ou cana-de-açúcar e que conseguem infectar as raízes: *Bacillus azotofixans* (Seldin et al., 1984) e *Acetobacter diazotrophicus* (Cavalcante & Döbereiner, 1988). Esta última parece especificamente adaptada à associação com cana-de-açúcar, já que cresce melhor com altas concentrações de açúcar no meio (10%). Acredita-se que as mesmas contribuem com até 60% do N acumulado nas plantas (Urquiaga et al., 1992; Boddey et al., 2000; Taulé et al., 2011).

Assim, nos últimos anos, a pesquisa científica, vem trabalhando em busca de alternativas para a adubação nitrogenada, através de genótipos com maior potencial para FBN (Urquiaga et al., 1997), práticas usadas no manejo da cultura que poderiam amplificar a FBN (Resende., 2000; Xavier., 2002; Polidoro., 2001), e pela seleção de estirpes de bactérias eficientes para FBN (Baldani et al., 1997; Boddey et al., 2001; Oliveira et al., 2002; Reis Jr. et al., 2000).

### **2.1.2. Solubilização de fosfato**

Junto com o N, o fósforo (P) é um dos nutrientes mais necessários para a nutrição das plantas, exercendo funções metabólicas estruturais, funcionais e de transferência de energia (Nahas., 1991). A disponibilidade deste nutriente no solo é bastante limitada, havendo a necessidade da aplicação de fertilizantes solúveis para adequado crescimento das plantas (Vassileva et al., 1999).

Entretanto, os fertilizantes solúveis, além do alto custo e da grande quantidade requerida, possibilitam que boa parte do P solúvel introduzido reaja com componentes do solo, formando compostos de P pouco disponíveis (Vassilev et al., 1996).

Uma alternativa ao processamento químico tradicional é o emprego de micro-organismos solubilizadores de fosfato, já que podem aumentar a quantidade de P prontamente disponível para a planta. Estes micro-organismos excretam ácidos orgânicos de baixo peso molecular, que por mecanismos de quelação e reações de troca, aumentam acentuadamente a concentração de P em solução (Gerke, 1992).

A produção de ácidos orgânicos pelos micro-organismos tem sido considerada um dos principais mecanismos para disponibilizar P. A quantidade e a natureza do ácido produzido influenciam de forma significativa a solubilização de fosfatos inorgânicos (Cunningham & Kuyack, 1992).

Os micro-organismos solubilizadores de fosfato inorgânico constituem cerca de 5 a 10% da microbiota total dos solos. A diversidade e a população desses micro-organismos é consideravelmente superior na rizosfera (Nahas et al., 1994, Nautiyal, 1999). Estirpes dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Rhizobium* estão entre as bactérias mais eficientes na solubilização de P (Rodriguez & Fraga, 1999), enquanto nas populações fúngicas destacam-se os filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (Vassilev et al., 1996)

Datta et al. (1982) constataram que a bactéria *Bacillus firmus*, em decorrência de sua habilidade solubilizadora e de produzir o fitormônio ácido indol acético produziu maior efeito significativo na produção de arroz com o uso de fosfato de rocha do que com o superfosfato simples.

Wahid & Mehana (2000) verificaram aumento da produção de trigo (28,9 a 32,8%) e feijão (14,7 e 29,4%), quando os fungos *Aspergillus niger*, *A. fumigatus* e *Penicillium pinophilum* foram inoculados no solo, utilizando-se fosfato de rocha e superfosfato como fonte de P.

A solubilização de fosfato em meio sólido pode ser avaliada pela formação de um halo transparente ao redor da colônia (Figura 1), em contraste com o meio opaco (Kang et al., 2002) ou pela solubilização de fosfato em meio líquido adicionado de fontes insolúveis desse elemento (Souchie et al., 2005).

Chabot et al. (1996) testaram micro-organismos solubilizadores de fosfato, como *Pseudomonas spp.* e *Rhizobium leguminosarum*, para verificar seu potencial como BPCP em alface e milho. A solubilização de fosfato por essas bactérias pareceu ser um mecanismo importante para a promoção de crescimento

da planta em um solo moderadamente fértil e em outro muito fértil, por causa do aumento da disponibilidade do nutriente.



Figura 1: Solubilização de fosfato por bactérias isoladas de rizosfera de feijoeiro, observando-se halos transparentes ao redor das colônias com atividade. (Adaptado de Mendonça et al., 2003)

### 2.1.3. Produção de Fitormônios

Os hormônios vegetais ou fitormônios são reguladores naturais de crescimento das plantas. Eles são distinguidos por possuírem importantes funções na diferenciação do xilema e do floema (Roberts, 1988).

Quase todos os processos fisiológicos são regulados por duas ou mais classes de hormônios. Dentro dessas classes encontram-se as auxinas, citocininas e giberelinas, além dos compostos orgânicos: etileno e ácido abscísico.

As auxinas que em grego significa “crescer”, estimulam o crescimento da célula, promovendo mudanças na arquitetura e nas propriedades químicas da parede celular (Fukuda, 1996), assim como aumentam a síntese proteica, a respiração e a circulação da água de uma célula (Davies, 1995). O principal efeito das auxinas é a capacidade de atuar na expansão e no alongamento celular, ajudando também na divisão celular em cultura de tecidos, principalmente no enraizamento (Krikorian, 1991), além de serem os únicos reguladores de crescimento que aumentam a formação de primórdios radiculares (Taiz & Zeiger, 2004). Acredita-se que seu efeito benéfico para o crescimento e morfologia da raiz seja pelo maior acesso à água e aos nutrientes do solo (Vessey, 2003).



A produção microbiana de ácido indol acético (AIA), principal auxina encontrada nas plantas é em muitos casos, dependente do aminoácido triptofano e realizada sob diversas vias biossintéticas (Patten e Glick et al., 1996). A razão pela qual muitas bactérias são capazes de produzir auxinas ainda é desconhecida. Alguns autores sugerem que estas bactérias possuem um metabolismo relacionado ao triptofano e que a biossíntese de AIA é uma detoxificação alternativa, enquanto outros propõem que auxinas possuem alguma função celular porque um claro relacionamento tem sido observado entre auxinas e os níveis de AMP cíclico, o qual regula uma série de processos metabólicos (Solano et al., 2008). Ainda assim, uma visão mutualística desta interação pode ser correta, pois o fornecimento de auxinas promove o crescimento de plantas e, desta forma, há mais exudatos e mais nutrientes para a bactéria (Solano et al., 2008).

No Brasil linhagens de *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum brasilense* e *Gluconacetobacter diazotrophicus* têm sido alvo de estudos porque são capazes de sintetizar AIA a partir do triptofano e fixar N<sub>2</sub> atmosférico promovendo o crescimento de plantas. Quatro isolados de *Gluconacetobacter diazotrophicus* dos tecidos da raiz da cenoura, rabanete, beterraba e café, produziram AIA na presença do triptofano (Madhaiyan et al., 2004).

As citocininas são assim chamadas porque estimulam a divisão celular (citocinese) e o desenvolvimento de gemas laterais. Esses fitormônios são produzidos nas raízes e transportados através do xilema para todas as partes da planta. Embriões e frutos também produzem citocininas (Demason, 2005).

Segundo Skoog & Miller (1957), estas duas classes hormonais controlam o desenvolvimento vegetal atuando diretamente na definição dos meristemas e no tipo de órgão a ser formado. A alta relação auxina: citocinina estimula a formação das raízes, enquanto a baixa relação induz a formação da parte aérea. Por isso, níveis de auxina e de citocinina são correlacionados inversamente in vivo (Eklof et al., 2000) e o tratamento com a auxina pode rapidamente inibir a biossíntese de citocinina (Nordstrom et al., 2004), promovendo o envelhecimento rápido da planta, já que a citocinina retarda esse envelhecimento.

Na década de 30, no Japão, uma doença em plantas de arroz causada por um fungo do gênero *Gibberella* foi descoberta. Quando plantas jovens eram atacadas por esse fungo, tornavam-se anormalmente altas devido à substância

liberada pelo fungo, que foi denominada giberelina. Estudos posteriores mostraram que substâncias semelhantes às produzidas pelo fungo *Gibberella* spp. estão presentes normalmente nas plantas, onde controlam várias funções (Malonek et al., 2005), entre elas a quebra da dormência de sementes e alongamento caulinar (Taiz & Zeiger, 2004).

A giberelina mais conhecida é o ácido giberélico. Segundo Castro et al., (2005), as giberelinas determinam importantes alterações fisiológicas nas plantas, isto é, interferem na floração, expressão sexual, senescência, abscisão, germinação e quebra de dormência.

Os importantes efeitos biológicos das giberelinas foram amplamente explorados no sentido de beneficiar agricultura. O ácido giberélico, produzido industrialmente pela fermentação de *G. fujikuroi* tem sido aplicado para estimular o crescimento da cana-de-açúcar, para auxiliar a germinação da cevada e produção do malte verde, e na produção de frutas e verduras (Macmillan & Pryce, 1973).

Etileno, um fitormônio na forma gasosa ( $C_2H_4$ ), é um potente regulador de crescimento, afetando vários processos do desenvolvimento das plantas, como crescimento, diferenciação e senescência (Smalle & Van Der Straeten, 1997). Esse fitormônio pode ainda estimular a germinação e superar a dormência em várias espécies (Abeles et al., 1992). O etileno é o principal inibidor do crescimento das raízes (Stenlid, 1982).

Algumas espécies de bactérias possuem a capacidade de reduzir ou bloquear a síntese desse composto através da ação da enzima ACC desaminase, que degrada a ACC (1-aminociclopropano-1-carboxilato), precursor imediato da síntese do etileno no ciclo de Yang (Capitani et al., 1999). Com esse mecanismo, essas bactérias promovem indiretamente o crescimento dessas plantas, pois sistemas radiculares mais desenvolvidos significam maior área para obter água e nutrientes.

Dentre as inúmeras funções atribuídas ao ácido abscísico (ABA) nos vegetais, sabe-se de sua importância particular como hormônio regulador do funcionamento dos estômatos, nas situações de estresse hídrico (During & Alleweldt, 1973; During, 1974, 1992; Broquedis & Bouard, 1989).

Sua acumulação nas células de guarda induz ao fechamento progressivo dos estômatos, reduzindo assim as perdas de água por transpiração e permitindo as plantas suportar as situações de déficit hídrico (Taiz, 1995).

Vários trabalhos têm demonstrado que o ABA atua também como emissor de sinais radiculares, transmitindo à parte aérea as primeiras evidências de falta d'água captadas pelas raízes das plantas (Tardieu et al., 1993; Gowing et al., 1993; Tardieu & Davies, 1993). Estes sinais radiculares, emitidos graças ao aumento da concentração do ABA nos vasos do xilema, permitem às plantas responder às mudanças das condições de extração da água do solo, e encontram-se estreitamente relacionados com a redução da abertura dos estômatos e da atividade fotossintética das folhas de plantas não irrigadas (During, 1992).

## **2.2. Compostagem/Vermicompostagem**

O termo compostagem está associado ao processo de tratamento dos resíduos orgânicos sejam eles de origem urbana, industrial, agrícola e florestal. A compostagem é definida como um processo aeróbio controlado, desenvolvido por uma população diversificada de micro-organismos, efetuada em duas fases distintas: a primeira quando ocorrem as reações bioquímicas mais intensas, predominantemente termofílicas; a segunda ou fase de maturação, quando ocorre o processo de humificação (Pereira Neto, 1987). O termo composto orgânico pode ser aplicado ao produto compostado, estabilizado e higienizado, que é benéfico para a produção vegetal (Zucconi & Bertoldi, 1987).

Os materiais utilizados para a compostagem podem ser divididos em duas classes, a dos materiais ricos em carbono (C) e a dos ricos em nitrogênio (N). Os materiais ricos em C fornecem a matéria orgânica e energia para a compostagem e os materiais nitrogenados aceleram o processo de compostagem, já que o N é necessário para o crescimento dos micro-organismos. Genericamente, quanto mais baixa é a relação C/N mais rapidamente termina a compostagem.

Outra característica fundamental para o processo de compostagem é a dimensão das partículas dos materiais. O processo de decomposição inicia-se junto à superfície das partículas, onde exista oxigênio difundido na película de água que as cobre, e onde o substrato seja acessível aos micro-organismos e às suas enzimas extracelulares. Como as partículas pequenas têm uma superfície

específica maior estas serão decompostas mais rapidamente desde que exista arejamento adequado.

Outro fator importante no processo de compostagem é a temperatura. Trautmann & Olynciw (2005) identificaram quatro importantes fases da temperatura durante o processo de compostagem: Fase mesofílica (predominam temperaturas moderadas, até cerca de 40 °C. Tem duração média de dois a cinco dias), fase termofílica (quando o material atinge sua temperatura máxima, > 40°C, e é degradado mais rapidamente, pode ter a duração de poucos dias a vários meses, de acordo com as características do material compostado), fase de resfriamento (marcada pela queda da temperatura para valores de temperatura ambiente) e fase da maturação (período de estabilização que produz um composto maturado, altamente estabilizado e humificado, livre de toxicidade).

O pH do composto pode ser indicativo do estado de compostagem dos resíduos orgânicos. À medida que os fungos e as bactérias digerem a matéria orgânica libertam-se ácidos que se acumulam e acidificam o meio. Este abaixamento do pH favorece o crescimento de fungos e a decomposição da celulose e da lignina. Posteriormente estes ácidos são decompostos até serem completamente oxidados.

Jimenez e Garcia (1989), indicaram que durante as primeiras horas de compostagem, o pH decresce até valores de aproximadamente 5.0 e posteriormente, aumenta gradualmente com a evolução do processo de compostagem e estabilização do composto, alcançando finalmente valores entre 7 e 8. Assim, valores baixos de pH são indicativos de falta de maturação devido à curta duração do processo ou à ocorrência de processos anaeróbios no interior da pilha de compostagem.

Segundo Do Nascimento et al. (2005), as principais vantagens dos processos de compostagem são: A matéria orgânica composta se liga às partículas (areia, limo e argila), ajudando na retenção e drenagem do solo melhorando sua aeração; aumenta a capacidade de infiltração de água, reduzindo a erosão; dificulta ou impede a germinação de sementes de plantas invasoras; aumenta o número de minhocas, insetos e micro-organismos desejáveis, reduzindo a incidência de doenças de plantas; mantêm a temperatura e os níveis de acidez do solo; favorece a reprodução de micro-organismos benéficos às culturas agrícolas.

A vermicompostagem é um processo que consiste basicamente em submeter diferentes resíduos orgânicos de origem animal e/ou vegetal, aos processos fermentativos e humificantes adicionando-se ao material, minhocas visando um produto curado após aproximadamente 45-60 dias (Compagnoni & Putzolu, 1985). Na fase inicial da vermicompostagem estão envolvidos, exclusivamente, fungos e bactérias e, em uma segunda fase, as minhocas atuam em conjunto, acelerando a decomposição e produzindo um composto de melhor qualidade (Harris et al., 1990).

A importância das minhocas na decomposição desses resíduos tem sido demonstrada por vários grupos de pesquisadores. Elas ingerem rapidamente a matéria orgânica, transformando-a em um composto rico em N, P, Ca, Mg, S, elementos essenciais para o desenvolvimento das plantas (Martinez, 1991). A espécie mais utilizada no processo de vermicompostagem é a *Eisenia foetida*, isso por ser muito disseminada e ter uma larga faixa de tolerância à temperatura.

Com base em vários estudos científicos a vermicompostagem, em comparação aos materiais produzidos sem minhoca, acelera a estabilização da matéria orgânica, e produz um composto com menor relação C/N, maior capacidade de troca catiônica e maior quantidade de substâncias húmicas (Albanell et al., 1988) e fitormônios (Tomati et al., 1995). Contudo, tanto o processo de compostagem quanto o de vermicompostagem alteram qualitativa e quantitativamente a composição das substâncias húmicas e dos materiais orgânicos (Aquino et al., 1992).

### **2.2.1. Comunidade microbiológica de compostos e vermicompostos**

A decomposição de material vegetal envolve pelo menos quatro grupos distintos de micro-organismos: celulolíticos, hemicelulolíticos, pectinolíticos e ligninolíticos. Geralmente a degradação de um substrato complexo, folhas, tecidos microbianos mortos ou exoesqueletos de insetos processa-se mais rapidamente na presença de uma comunidade microbiana do que na presença de uma única população.

As comunidades microbiológicas de um composto de lodo de esgoto e resíduos verdes em 10 diferentes tempos de compostagem (4, 18, 31, 40, 57, 67, 84, 114, 128 e 146 dias) foram estudas por Sidhu et al (2002) e Hassen et al. (2001) usando os métodos de cultura dependente e o perfil fisiológico com

microplaca Biolog (CLPP). A densidade bacteriana foi elevada do início até o final da compostagem (faixa de  $3,8 \times 10^8$  até  $3,75 \times 10^9$  UFC.g<sup>-1</sup>.ms), embora os actinomicetos aumentem no solo após a fase de bio-oxidação (após 40 dias). A população de fungos começa particularmente alta durante o último estágio de decomposição. Os esporos bacterianos foram altos aos 4 dias com valores de  $2,08 \times 10^7$  UFC.g<sup>-1</sup>.ms e sofreram variações até alcançar  $1,98 \times 10^6$  aos 146 dias. Segundo Albretch et al. (2010), o aumento do número de esporos no início da compostagem pode ser explicado pelo decréscimo da umidade. No entanto, a diminuição no final da compostagem poderia indicar que os esporos bacterianos tais como os do gênero *Bacillus* (que tem um grande potencial catabólico) tornam-se dominantes quando outros micro-organismos tenham consumido os nutrientes facilmente degradáveis.

Em um solo tratado com vinhaça em cultura de milho, não houve variação do número de fungos filamentosos, mas ocorreu decréscimo do número de leveduras (Tauk, 1988). Este resíduo, entretanto, aumentou o número de bactérias e actinomicetos na mesma área (Tauk 1988). Ishii & Takii, (2003) caracterizaram quatro processos de compostagem com lodo de esgoto e resíduos alimentares. Foram identificados através da técnica de DGGE os seguintes micro-organismos: *Sphingobacterium mizutae*, *Flavobacterium heparinum*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Acidovorax facilis*, *Bacillus thermocloacae*, *Mycobacterium thermoresistibile*, *Saccharomonospora viridis*, *Actinoalloteichus cyanogriseus*, *Beutenbergia cavernosa*, *Thermomicrobium roseum*, *Clostridium thermocellum*, *B. thermocloacae*, *Bacillus thermoamylovorans*, *Ornithinococcus hortensis* e *T. roseum*, *Lactobacillus bifermantans*, *Bacillus megaterium*, *Corynebacterium urealyticum*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus salivarius* e *B. megaterium*.

Estes autores observaram que as comunidades microbianas em cada processo de compostagem não variaram com a evolução da compostagem. Além disso, eles concluíram que as comunidades microbianas tendem a ser semelhantes nos processos de compostagem com a mesma matéria-prima, independente dos diferentes tipos de compostagem. Assim, bactérias fermentadoras foram encontradas na compostagem de resíduos de alimentos e populações bacterianas complexas, incluindo *Bacillus*, actinobactérias e bactérias Gram-negativas foram encontradas na compostagem de lodo de esgoto.

A microbiologia da compostagem é muito complexa e a tentativa de isolamento de todas as espécies presentes no material é uma tarefa muito difícil (Hanssen et al., 2001). Segundo Symanski (2005), foi possível estabelecer um perfil da comunidade microbiana (Tabela 1) presente em uma leira de compostagem de resíduos sólidos urbanos, através das técnicas de identificação da microbiologia clássica, na qual provas bioquímicas são utilizadas para caracterização fisiológica dos micro-organismos. Neste trabalho, o gênero *Enterobacter* foi dominante, resultado diferente do obtido por Blanc et al. (1999), Dees & Ghiorse (2001) e Hassen et al. (2001), que verificaram o domínio do gênero *Bacillus* na comunidade microbiana presente em leiras de compostagem. Segundo estes autores, a prevalência do gênero *Bacillus* ocorre pela sua capacidade de produção de endósporos bacterianos, os quais são altamente resistentes a temperaturas elevadas e a outras condições desfavoráveis que possam estar presentes no ambiente de compostagem.

Tabela 1. Principais gêneros de bactérias isoladas no composto de resíduos sólidos urbanos (adaptado de Symanski, 2005)

Gêneros	Nº de isolados
<i>Aeromonas</i> spp.	43
<i>Bacillus</i> spp.	67
<i>Burkholderia</i> spp.	13
<i>Citrobacter</i> spp.	13
<i>Corynebacterium</i> spp.	32
<i>Enterobacter</i> spp.	75
<i>Escherichia</i> spp.	71
<i>Flavimonas</i> spp.	09
<i>Klebsiella</i> spp.	29
<i>Listeria</i> spp.	21
<i>Micrococcus</i> spp.	23
<i>Pasteurella</i> spp.	06
<i>Pseudomonas</i> spp.	48
<i>Providencia</i> spp.	10
<i>Serratia</i> spp.	22
<i>Staphylococcus</i> spp.	11
<i>Xanthomonas</i> spp.	07

### 2.2.2. Bioatividade das substâncias húmicas e vermicompostos

A matéria orgânica presente nos solos é constituída pela mistura de produtos de vários processos de decomposição. São resultantes da degradação

química e biológica de resíduos vegetais e da atividade microbiana. Essa matéria orgânica pode ser classificada em substâncias húmicas (SH) e substância não húmica. A diferença entre substâncias não húmicas e húmicas está baseada na natureza definida das substâncias não húmicas como, por exemplo: carboidratos, proteínas e ácidos orgânicos, enquanto, as substâncias húmicas são de estrutura química indefinida formando uma mistura de compostos (Stevenson, 1994).

Na literatura existem várias propostas estruturais para as SH (Flaig, 1960; Kononova, 1966; Schnitzer & Khan, 1985; Stevenson, 1994), entretanto, de acordo com Stevenson (1985) nenhuma parece ser inteiramente satisfatória. Provavelmente, isto ocorre não apenas por causa da complexidade e heterogeneidade estrutural das SH, mas principalmente devido à falta de uma identidade estrutural genérica a qual é fortemente influenciada pelo grau e mecanismo de decomposição.

As substâncias húmicas compreendem uma mistura de espécies com variações em suas propriedades moleculares. Por esta razão, tem sido feito o fracionamento das SH de acordo com suas propriedades para obter frações distintas com características similares. Geralmente esse material é fracionado em função de sua solubilidade em tres principais frações: ácidos húmicos (fração solúvel a pH alcalino e insolúvel em pH fortemente ácido), ácidos fúlvicos (solúvel em todo intervalo de pH) e huminas (fração residual e insolúvel em meio aquoso em qualquer valor pH).

De acordo com Baldotto et al. (2009), a aplicação de ácido húmico (AH) isolado de vermicomposto e de torta de filtro, durante a aclimatação do abacaxizeiro, resultou em incrementos significativos no crescimento e desenvolvimento das plantas em relação ao controle. Acredita-se que grande parte dos efeitos bioestimulantes dos AH se deve a uma atividade similar à de hormônios vegetais da classe das auxinas, ou seja, podem promover o crescimento vegetal em concentrações relativamente pequenas. Nesse mesmo trabalho foi observado aumento nos conteúdos nutricionais N, P, K, Ca e Mg, aumento nos teores de pigmentos fotossintéticos e um acréscimo significativo na razão entre clorofila *a* e clorofila *b*. Esses fatos indicam que a aplicação de AH no abacaxizeiro durante o processo de aclimatação, favorece o estabelecimento das plantas *ex vitro* e, possivelmente, o posterior estabelecimento no campo.



A aplicação foliar de solução de AH em diversas culturas, tais como arroz (Tejada & Gonzalez, 2004), trigo (Delfine et al., 2005), videira (Ferrara & Bruneti, 2008) também promoveu o crescimento dessas culturas.

Chen & Aviad (1990), demonstraram a influência dos AH no comprimento de brotos e raízes no cultivo de melão em solução nutritiva, indicando a presença de efeito interativo entre os AH e nutrientes da solução. O nível ótimo da concentração dessas substâncias foi de 37 mg L<sup>-1</sup>. Sladky (1985) demonstrou que os ácidos húmicos influenciaram no aumento e na velocidade das taxas de germinação e de crescimento precoce de mudas de tomate, cultivadas em solução nutritiva.

No processo de maturação da vermicomposto ocorre a humificação dos intermediários mais estáveis e a redução dos organismos patogênicos remanescentes, melhorando de forma significativa a qualidade do produto final (Aquino, et al. 2005) . Isso significa que o vermicomposto é uma fonte naturalmente enriquecida com SH e outros minerais, que são indispensáveis às plantas e confere uma elevada atividade biológica (Dell'Agnola & Nardi, 1987; Nardi et al., 1996; Masciandaro et al., 1999; Muscolo & Nardi, 1997; Muscolo et al., 1999; Façanha et al., 2002; Canellas et al., 2002; Quaggiotti et al., 2004; Canellas et al., 2006; Rodda et al., 2006a,b; Zandonadi et al., 2007).

Além de produzir um material mais estável de alta qualidade, o vermicomposto constitui um adubo orgânico rico em micro-organismos benéficos, ou seja, bactérias fixadoras de N atmosférico, bactérias e fungos solubilizadores de P, Zn e Fe, actinomicetos que degradam AH e influenciam diretamente na disponibilidade desses nutrientes para plantas (Kiehl, 1998).

Os vermicompostos são, portanto, fontes renováveis de substâncias húmicas de elevada atividade biológica e presume-se também, fonte de diversidade microbiana. Pretende-se, nesse trabalho, realizar a prospecção de micro-organismos promotores de crescimento vegetal visando especificamente à fixação biológica de nitrogênio (FBN), solubilização de P e Zn, degradação de celulose e produção de compostos indólicos. Testes de indução de crescimento radicular em plantulas de milho também foram realizados.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Vermicompostos utilizados

O trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Celular Tecidual (LBCT) do Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB) e no Núcleo de Desenvolvimento de Insumos Biológicos para a Agricultura (NUDIBA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes-RJ.

Foram utilizados cinco vermicompostos maturados produzidos com esterco bovino e resíduos agroindustriais: esterco bovino (VC1), bagaço de cana (VC2), torta de girassol (VC3) e torta de girassol + bagaço de cana (VC4) e torta de filtro (VC5) (Tabela 2). Os materiais foram misturados na proporção 1:1 com base na matéria seca. Os resíduos foram colocados em cilindros de concreto com capacidade para 150 L e a umidade foi mantida entre 60-70% com adição de água semanalmente, seguida de mistura do composto. Depois de aproximadamente um mês, foram introduzidas as minhocas (*Eisenia foetida*) na proporção de 5 kg por m<sup>3</sup> de resíduo. Ao final do processo de vermicompostagem (4 meses), as minhocas foram retiradas e o composto foi armazenado em recipientes para subsequente amostragem. Além da prospecção, amostras foram coletadas, misturadas, secas para verificar a composição elementar de acordo

com a metodologia da Embrapa (1999). Algumas propriedades dos vermicompostos podem ser observadas na Tabela 2.

Tabela 2. Composição elementar dos vermicompostos

VC	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (g.kg <sup>-1</sup> )	C.T.C (g.kg <sup>-1</sup> )	pH(H <sub>2</sub> O)	C.E (us)	C total (g.kg <sup>-1</sup> )	N total (g.kg <sup>-1</sup> )	C/N
E	6,97 ± 1,4	37,15 ± 5,99	6,60 ± 0,18	1,03 ± 0,06	22,99 ± 3,3	1,9 ± 0,4	13,8 ± 0,4
BC	6,69 ± 0,9	54,62 ± 9,29	6,26 ± 0,23	1,25 ± 0,06	16,6 ± 1,4	1,4 ± 0,1	13,9 ± 0,1
TG	19,00 ± 2,1	68,99 ± 15,47	5,73 ± 0,49	1,48 ± 0,39	35,6 ± 13,7	2,9 ± 1,2	14,6 ± 1,2
BCTG	8,64 ± 0,8	17,96 ± 17,25	6,39 ± 0,14	1,39 ± 0,35	39,7 ± 9,6	2,9 ± 0,6	15,7 ± 0,6
TF	20,2	89,66	7,58	1,15	31,9	2,3	16,1

### 3.2. Quantificação de bactérias fixadoras de nitrogênio nos diferentes vermicompostos

Com o objetivo de testar uma nova abordagem para a determinação da população de diazotróficos nos diferentes vermicompostos foi realizada a proposição a seguir: (a) quantificação da população na ausência de estímulo (potencial populacional basal de diazotróficos); (b) Adição de um coquetel de fontes de carbono (potencial populacional induzido) e (c) na presença de um coquetel de plântulas (potencial populacional rizosférico de diazotróficos).

Para determinação da população de diazotróficos nos vermicompostos na ausência de estímulo (Potencial populacional basal de diazotróficos), 10 g das diferentes amostras de vermicomposto foram diluídas em 90 ml de solução salina (0,85% NaCl em tween 0,02%) e incubadas a 30 °C sob agitação de 150 rpm por um período de 60 minutos. Decorrido este período, diluições seriadas de 10<sup>-2</sup> a 10<sup>-7</sup> foram realizadas e alíquotas (100 µL) das respectivas diluições foram inoculadas em vidros de penicilina de volume de 16 ml contendo 5 mL de meio de cultura semi-sólido. O meio de cultura utilizado para estimativa da população foi o meio JNFB. A composição do meio JNFB semi-sólido em 1 L consiste de: 5g de ácido málico, 0,6g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,1g de NaCl, 0,02g de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 4 mL de FeEDTA (sol. 1,64 %), 2 mL de azul de bromotimol (sol. 0,5 % em 0,2N de KOH), 2 mL de solução de micronutrientes para meio de cultura, 1 mL de vitamina para meio de cultura. Ajustar o ph para 5.8 com KOH e adicionar 1,8g de ágar. Após a inoculação, os frascos foram colocados em estufa a 30<sup>0</sup> C por um período de 7 dias. Após este período, foi

realizada a avaliação quanto à presença de crescimento típico de bactérias fixadoras de N, caracterizado pela formação de uma película branca na superfície do meio. O número populacional foi obtido com o uso da tabela de McCrady com 3 repetições por diluição, tomando-se por base o número de repetições com formação de película em cada diluição (Döbereiner et al. 1995b).

Para determinação do potencial populacional substrato de C-induzido de diazotróficos no vermicomposto, igualmente 10 g das diferentes amostras de vermicomposto armazenadas em potes de plástico esterelizados e vedados foram incubadas com uma solução aquosa contendo três fontes de carbono na concentração de 0.1 % (glucose, manitol, glicerol), para captação da diversidade microbiana. Decorrido o período de 24 horas sob temperatura de incubação a 32 °C, alíquotas foram diluídas seriadamente e inoculadas em meio JNFB semi-sólido para estimativa de densidade populacional de diazotróficos de acordo como descrito para a determinação da população basal (Döbereiner et al., (1995b)). Para determinação do potencial populacional rizosférico de diazotróficos no vermicomposto, amostras de 100 g do vermicomposto foram semeadas com um coquetel contendo 10 sementes de milho (*Zea mays*, var. UENF 506/11); tomate (*Solanum lycopersicum*, var. IPA 6) e quiabo (*Abelmoschus esculentus*, var. Clemson Americano 80). Estas sementes foram tratadas termicamente e desinfestadas superficialmente para eliminação da biota superficial e endofítica. Sete dias após a germinação das sementes, 1 g de vermicomposto rizosférico foi obtido de todas as amostras e diluições seriadas associadas à estimativa da população foram obtidas como descrito acima.

### **3.3. Isolamento das bactérias diazotróficas e não diazotróficas**

Foi utilizado o método das diluições seriadas: em 10 g de cada vermicomposto foi aplicado 90 mL de solução salina (8,5 g.L<sup>-1</sup> de NaCl) e submetido à agitação durante 60 minutos. Em seguida, foram feitas diluições de 10<sup>-2</sup> a 10<sup>-7</sup>, tendo-se transferido sucessivamente 1 mL da suspensão, de cada diluição, para tubos com 9 mL de solução salina. De cada uma das diluições, alíquotas de 100µL foram inoculadas em vidros de penicilina com meio semi-sólido JNFB (Döbereiner et al., 1995b). Após 7 dias de incubação, a avaliação da fixação de N foi realizada por meio da visualização da película aerotóxica que se forma. Os micro-organismos que cresceram neste meio foram transferidos para

placas de Petri contendo o meio sólido dygs (Döbereiner, et al., 1995b). A composição do meio dygs sólido em 1 L consiste de: 2 g de glicose, 2 g de ácido málico, 1,5 g de peptona bacteriológico, 2 g de extrato de levedura, 0,5 g de  $K_2HPO_4$ , 0,5 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1,5 g de ácido glutâmico e 15 g de ágar, pH 6,0 (Baldani, 1996).

Foram feitas diluições seriadas com fragmentos de intestino de minhoca *Eisenia foetida*, de acordo com a metodologia descrita acima.

Todos os isolados bacterianos obtidos e purificados foram repicados pelo menos dez vezes em novo meio JNFB semi-sólido como premissa para caracterização de bactéria diazotrófica (Döbereiner et al., 1995b).

Para não diazotróficos, alíquotas de 0,1 mL das diluições seriadas foram plaqueadas em meio sólido dygs (Baldani, 1996).

### **3.4. Isolamento de micro-organismos que utilizam ácido húmico como fonte de carbono**

Foi preparado um meio de cultura com ácido húmico (AH, 25 mg L<sup>-1</sup>), isolados de vermicomposto produzido a partir de esterco bovino, 5 mL de  $K_2HPO_4$  (sol. 10%), 2 mL de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (sol. 10 %), 1mL de NaCl (sol. 10 %), 2mL de  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (sol. 1 %), 4mL de FeEDTA (sol. 1,64%), 2mL de solução de micronutrientes para meio de cultura, 1 mL de solução de vitaminas para meio de cultura, 100 mg de extrato de levedura, pH 6,5, 15 g L<sup>-1</sup> de ágar. Neste meio foram inoculadas as diluições 10<sup>-3</sup> e 10<sup>-4</sup> de cada um dos vermicompostos. Após 7 dias de incubação os micro-organismos que cresceram nesse meio foram rigorosamente isolados em meio dygs sólido.

### **3.5. Caracterização morfológica e cultural dos isolados**

Os isolados foram caracterizados quanto à morfologia da célula e da colônia. As colônias foram caracterizadas quanto à coloração e à morfologia (Figura 2), considerando tamanho (menor que 1 mm, puntiforme, maior que 1mm), forma (circular ou irregular), elevação (plana, lente, convexa, pulvinada, umbonada, umbilicada), bordo (ondulado, lobado, denteado, filamentoso, inteiro) e superfície (lisa, rugosa, papilada), (Perin, 2002).

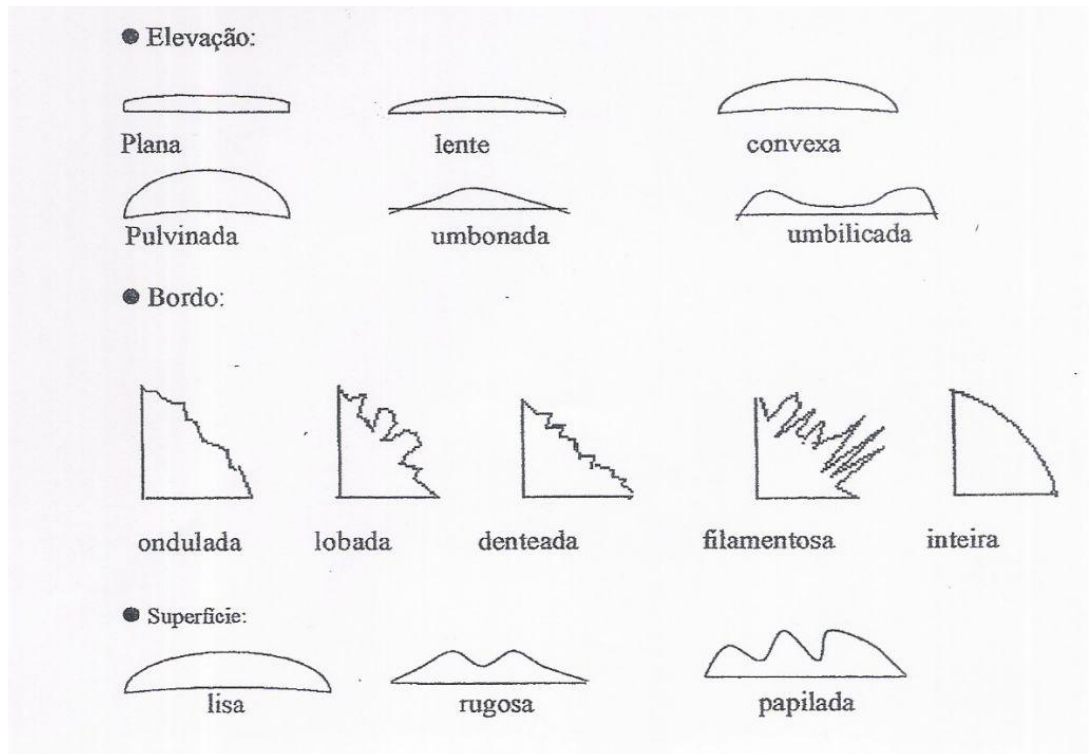


Figura 2: Caracterização morfológica das colônias bacterianas, de acordo com a elevação, bordo e superfície (Adaptado de Perin, 2002).

Para avaliar a coloração de Gram, esfregaços bacterianos em lâminas de microscopia foram obtidos e então cobertos por um minuto com solução de cristal violeta; a seguir foi adicionada solução de iodina (lugol) por um minuto, seguido de lavagem com água corrente e descoloração em álcool etílico 95 %. A seguir, foi adicionada solução de fucsina básica sobre o esfregaço por um período de 30 segundos, e então lavado com água corrente. A lâmina preparada foi observada em objetiva de 100X sob óleo de imersão em microscópio óptico Axioplan-Zeiss acoplado a uma câmara fotográfica digital Canon Paner Shot A 640 e a aquisição das imagens foi feita por meio do programa Zoom Browser EX. As bactérias Gram-positivas são identificadas pela coloração azulada e as Gram-negativas pela coloração avermelhada.

### 3.6 Capacidade de fixar nitrogênio

A confirmação da capacidade diazotrófica foi pautada na metodologia de formação de uma película aerotóxica no meio JNFB semi-sólido (isento de N). Os isolados capazes de crescer nesse meio, com a formação da película característica, foram então repicados dez vezes em novo meio JNFB (Döbereiner

et al., 1995b), evidenciando grande possibilidade de serem fixadores de N. Porém, essa característica deve ser confirmada por análises como a redução do acetileno e por estudos moleculares.

Após as sucessivas repicagens no meio semi-sólido sem N, as culturas foram riscadas em meio Dygs para confirmação da pureza dos isolados.

### **3.7. Capacidade de solubilização de fosfato**

As bactérias foram crescidas em meio líquido Dygs por 24 h, a 30 °C e 100 rpm. Alíquotas de 2 µL das soluções bacterianas foram colocadas em placas de Petri com meio de cultura sólido (Verma et al., 2001) contendo 10 g L<sup>-1</sup> de glicose, 5 g L<sup>-1</sup> de cloreto de amônio (NH<sub>4</sub>Cl), 1 g L<sup>-1</sup> de cloreto de sódio (NaCl), 1 g L<sup>-1</sup> de sulfato de magnésio hepta-hidratado (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O), 1,0 g L<sup>-1</sup> de fosfato de Ca (Ca<sub>5</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>OH), 15 g L<sup>-1</sup> de ágar, 1 L de água destilada a pH 7,0 e incubadas a 28 °C por sete dias. A avaliação da solubilização de fosfato foi realizada por meio da medição do diâmetro do halo translúcido que se forma em torno das colônias bacterianas solubilizadoras.

### **3.8. Capacidade de Solubilização de Zinco**

As bactérias foram crescidas em meio líquido Dygs por 24 h, a 30 °C e 100 rpm. Alíquotas de 2 µL das suspensões bacterianas foram colocadas em placas de Petri com meio de cultura sólido (Saravanan et al., 2003) contendo 10 g L<sup>-1</sup> de glicose, 1 g L<sup>-1</sup> de sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 0,2 g L<sup>-1</sup> de cloreto de potássio (KCl), 0,1 g L<sup>-1</sup> de fosfato de dipotássio (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 0,2 g L<sup>-1</sup> de sulfato de magnésio hepta-hidratado (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O), 1,0 g L<sup>-1</sup> de óxido de Zn (ZnO), 15 g L<sup>-1</sup> de ágar, 1 L de água destilada a pH 7,0 e incubadas a 28 °C por sete dias. A avaliação da solubilização de Zn foi realizada por meio da medição do diâmetro do halo translúcido que se forma em torno das colônias solubilizadoras de Zn.

### **3.9. Quantificação em meio de cultura da produção de compostos indólicos**

As bactérias foram crescidas previamente em meio líquido Dygs (Döbereiner et al., 1995b) por 24 h, a 30 °C e 100 rpm. Alíquotas de 25 µL foram transferidas para tubos de ensaio contendo 5 mL dos meios dygs, com e sem adição de triptofano (100 mg L<sup>-1</sup>) e incubadas no escuro por 72 h, a 30 °C e 150 rpm. Para avaliação da síntese de indol (Sarwar & Kremer, 1995), 150 µL da cultura bacteriana foram transferidos para microplacas de poliestireno, sendo

adicionados 100 µL do reagente de Salkowsky (1 mL de tricloreto de ferrohexa-hidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) – 0,5 mol L<sup>-1</sup>, em 50 mL de ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) – (35 % em água), seguido de incubação no escuro por 30 min. Após esse período, foram realizadas leituras em espectrofotômetro a 492 nm. A concentração de indol foi dosada com curva de calibração, relacionando absorvância e concentração de ácido indol acético (AIA) nos diferentes meios de cultivo. Foram realizadas três repetições para cada estirpe bacteriana que foi cultivada independentemente. Como controle, foi utilizada a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 (Radwan et al., 2005).

### **3.10. Degradação de celulose**

Foram aplicadas 50 µL de uma cultura líquida da bactéria alvo ( $10^8$  células mL<sup>-1</sup>) em meio de cultura sólido com a composição mineral do meio JNFB, com 100mg de extrato de levedura, e contendo como fonte de C exclusiva metilcelulose 0,5%. As placas foram incubadas a 30 °C por 4 dias. Após esse período, foram adicionados 10 mL de solução corante vermelho congo (2,5 g.L<sup>-1</sup>) em tampão Tris HCL 0,1 M, pH 8. Após 30 minutos a solução foi descartada e as culturas foram lavadas com 5 mL de solução de NaCl 0,5 M neste mesmo tampão. A observação de uma zona amarelo-alaranjada ao redor das colônias indica a produção de celulases.

### **3.11. Avaliação da capacidade de promoção de crescimento em milho inoculado em sistemas axênicos**

Sementes de milho *Zea mays* var. UENF/506-11 foram desinfestadas superficialmente (imersão das sementes em etanol 95%, por 90 segundos sob agitação de 100rpm, fazendo 4 lavagens sucessivas de 3 minutos cada em água destilada estéril, imergindo posteriormente durante 10 minutos em hipoclorito 5%, fazendo 3 lavagens de 3 minutos cada com água destilada estéril) e pré-germinadas em placas de Petri contendo ágar-água. As bactérias cresceram em meio líquido dygs por 24h, 30 °C e 120 rpm por 2 dias. A inoculação foi realizada pela imersão das plântulas de milho em 1 ml de meio bacteriano por 30 minutos. O controle foi imerso em meio dygs autoclavado. As plântulas foram transferidas para tubos de ensaios de diâmetro 2 cm e altura 20 cm, contendo 10g de substrato vermiculita autoclavado por duas vezes. O experimento foi mantido em



sala de crescimento com temperatura de 26 °C, sem luz. Todos os dias as plantas receberam 5 ml de água destilada autoclavada.

### **3.11.1. Análise de crescimento**

Aos 10 dias as plantas foram coletadas para mensuração das seguintes variáveis: matéria fresca da raiz (MFR) e da parte aérea (MFPA); matéria seca da raiz (MSR) e da parte aérea (MSPA), obtidas pela secagem em estufa sob ventilação forçada de ar por 60 °C por 5 dias após a pesagem.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Isolamento e contagem das bactérias

No presente trabalho foi realizada uma prospecção preliminar de bactérias com potencial para promoção de crescimento de plantas em cinco vermicompostos maturados formados a partir de diferentes materiais orgânicos (ver material e métodos item 3.1) e de fragmentos de intestino de minhocas californianas utilizadas no processo de vermicompostagem. Curiosamente, embora existam inúmeros estudos envolvendo prospecção de bactérias benéficas presentes no solo, na rizosfera e associadas epifiticamente e endofiticamente a diferentes espécies de planta, poucos se devotam ao isolamento destes grupos funcionais em distintos materiais compostados e mais raros ainda são os estudos voltados para os vermicompostos.

Neste trabalho foram isolados, purificados e estocados um total de 89 micro-organismos oriundos de diferentes fontes (tabelas 5, 6 e 7). No primeiro grupo de isolamento (designado grupo I) foram obtidos 38 isolados bacterianos a partir de diluições e plaqueamento em meio sólido de composição complexa (meio Digys). Contribuíram para este universo de isolados, amostras de

vermicomposto de esterco bovino (VC1) e diferentes porções do intestino de minhoca (tabela 5).

No segundo grupo de isolamento (designado grupo II) foram obtidos 20 isolados bacterianos com capacidade de fixar nitrogênio atmosférico (tabela 6), a partir de diluições seriadas e semeio em meio JNFb semi-sólido isento de fontes de nitrogênio. Neste ensaio, procedeu-se a contagem e o subsequente isolamento de bactérias diazotróficas oriundas dos diferentes materiais vermicompostados: esterco (VC1), esterco com bagaço de cana (VC2), esterco bovino com torta de girassol (VC3), esterco bovino com torta de girassol e bagaço de cana (VC4) e esterco bovino com torta de filtro (VC5).

Oriundos das mesmas diluições de amostras utilizadas para obtenção de isolados do grupo II obtiveram-se adicionalmente 31 isolados microbianos (bactérias, actinomicetos e fungos) dos diferentes vermicompostos, isolados em um meio sólido idealizado no presente trabalho. Este meio contém ácidos húmicos como única fonte de C disponível para crescimento (item 3.4 da sessão material e métodos) e os isolados assim obtidos foram incluídos no grupo III. Portanto, dos 89 isolados obtidos, 42,7% foram consideradas inicialmente bactérias heterotróficas, 22,4% como bactérias diazotróficas e 34,9% como microorganismos capazes de utilizar ácidos húmicos como fonte exclusiva de carbono.

Nas amostragens que deram origem aos isolados do grupo II e III, uma nova abordagem metodológica para avaliação comparativa do potencial de inóculo de bactérias diazotróficas naturalmente presentes no vermicomposto foi testada. Assim, a estimativa do número de bactérias por grama de vermicomposto obedeceu a três parâmetros, os quais foram (a) quantificação da população sem indução; (b) quantificação da população após aplicação de uma solução contendo três fontes de carbono e (c) quantificação da população após germinação e estabelecimento de um coquetel de plântulas (detalhe no item 3.2 do material e métodos). A introdução desta metodologia na rotina de trabalho de nosso grupo se justifica pelas observações preliminares da existência de números populacionais variando de muito baixos a não detectáveis pelo método clássico de Número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas em amostras de vermicomposto. Esta observação conduz a uma baixa discriminação quanto à capacidade de diferentes compostos/vermicompostos abrigarem populações nativas de diazotrófos, característica esta relevante na distinção e seleção de

materiais para futuros estudos de veículos microbianos apropriados para proposição de novas formulações microbianas para aplicação na agricultura.

As estimativas da população de diazotróficos nos diferentes vermicompostos encontram-se na Tabela 3. Pode-se notar, confirmando observações prévias, que os diferentes vermicompostos exibiram números não detectáveis de diazotrófos por grama de material quando nenhum estímulo ao incremento da população nativa foi imposto (potencial basal). De forma surpreendente, no vermicomposto formado por esterco bovino e torta de filtro (VC5) foi possível recuperar  $2,0 \times 10^4$  células.  $g^{-1}$  de VC na condição de potencial basal. O crescimento de bactérias nesse tratamento pode ser devido às características peculiares desse vermicomposto condicionados pela torta de filtro como material de origem e outros aspectos desconhecidos do processo de maturação.

Trabalhos de Sidhu et al (2002) e Hassen et al (2001) avaliaram a composição microbiana em leiras de compostagem, e observaram valores médios do número de bactérias de  $2,7 \times 10^8$  UFC  $g^{-1}$  e  $1,0 \times 10^8$  UFC  $g^{-1}$ , respectivamente. Blanc et al (1999) realizaram estudos em ambientes de leiras de compostagem de resíduos vegetais e verificaram um número mais elevado na contagem de bactérias, entre  $10^9$  e  $10^{10}$  UFC  $g^{-1}$ . Segundo os autores, os altos valores obtidos estão relacionados com o predomínio de isolados do gênero *Bacillus* entre as bactérias identificadas, uma vez que este gênero possui a capacidade de produzir uma grande quantidade de endosporos bacterianos, os quais foram encontrados em número elevado no material examinado pelos autores. Vale ressaltar que a magnitude destes números obtidos em placa contendo meio sólido rico em nutrientes não pode ser comparada com os obtidos no presente estudo, já que nossas estimativas populacionais recaem sobre um grupo funcional específico, o grupo das bactérias fixadoras de nitrogênio capazes de crescer em meio JNFb semi-sólido pela expressão de uma película aerotóxica.

Os valores populacionais obtidos para amostras de vermicomposto incubadas com solução contendo três fontes de carbono (potencial diazotrófico carbono induzido-PC) evidenciam um esperado incremento populacional para o material VC5 (incremento de aproximadamente duas unidades logarítmicas) e o aparecimento de populações detectáveis nos VC1 e VC2 (Tabela 03). Tais resultados já eram esperados visto que a aplicação de carbono funciona como

fonte de energia para o desenvolvimento desses micro-organismos. Entretanto, a não detecção de bactérias diazotróficas em VC3 e VC4 não pode ser facilmente explicada, sendo a presença da torta de girassol como material de base para a compostagem, o elo comum para estes materiais. A comparação dos valores populacionais de bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> entre PB e PC ilustra o potencial desta metodologia para discriminar o potencial de inóculo de diferentes vermicompostos, destacando a importância dos resíduos da agroindústria da cultura da cana-de-açúcar (bagaço e torta de filtro) na composição do VC.

Todos os materiais testados (VC1 a VC5) foram positivos para detecção de populações de diazotrófos quando um coquetel de sementes foi introduzido nos vermicompostos (potencial indutor rizosférico), valores estes com ordem de grandeza entre duas e quatro unidades log<sub>10</sub>. Esta observação pode ser explicada pela diversidade e complexidade de compostos e biomacromoléculas exsudados pelas raízes das plantas, tais como aminoácidos, ácidos orgânicos, carboidratos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas e enzimas, que favorecem o crescimento e multiplicação dos micro-organismos (Siqueira & Franco, 1998). Além disso, segundo Macrae et al (2001) a densidade populacional é inversamente proporcional ao afastamento radicular, atingindo seu valor máximo na superfície radicular. Ressalta-se ainda a presença de domínios microaerofílicos que estimulam as populações diazotróficas. Com exceção de VC5, todos os materiais apresentaram estímulos nos valores populacionais variando entre 0,1 a 4 unidades log<sub>10</sub> na comparação de PC com PR (tabela 03).

Tabela 3. Densidade populacional de bactérias diazotróficas associadas a diferentes vermicompostos (isolados pertencentes ao Grupo II). Os valores representam a média de três repetições através de dois experimentos independentes (expressos em células bacterianas. g<sup>-1</sup> pelo método do NMP)

Vermicomposto	Potencial Basal (PB)	Potencial Carbono Induzido (PC)	Potencial Rizosférico (PR)
VC1	Nd	2,6 ± 0,04	4,8 ± 0,3
VC2	Nd	4,5 ± 0,2	4,6 ± 0,04
VC3	Nd	nd	4,5 ± 0,08
VC4	Nd	nd	2,6 ± 0,5
VC5	4,3 ± 0,02	6,4 ± 0,6	4,8 ± 0,2

Esterco bovino (VC1), bagaço de cana + esterco bovino (VC2), torta de girassol + esterco bovino (VC3), bagaço de cana + torta de girassol + esterco (VC4), torta de filtro (VC5); n.d.: não detectado, Número mais provável (NMP).

A mesma abordagem metodológica foi empregada para a quantificação das populações de micro-organismos que compõem os isolamentos que integram o Grupo III (Tabela 4). Neste caso, unidades formadoras de colônia (UFC.ml<sup>-1</sup>) capazes de utilizar ácidos húmicos (AH) como fonte exclusiva de carbono foram quantificadas para alguns tratamentos. As inferências e interpretações obtidas anteriormente não podem ser estendidas para este grupo de isolados, já que o potencial basal de utilizadores de AH nos diferentes VCs não foi avaliado.

Para o potencial induzido por carbono, apenas VC1, VC3 e VC4 foram avaliados, os quais expressaram valores na ordem de 6 a 7 unidades log<sub>10</sub> de UFC por g de VC.

Para o potencial rizosférico, em todos os materiais avaliados (VC2 a VC5) observaram-se valores entre 7 a 8 unidades log<sub>10</sub> de UFC por g de VC. Nas comparações possíveis (VC3 e VC4) ficaram demonstrados os incrementos populacionais entre 1,5 e 2,5 unidades log<sub>10</sub> de UFC por g de VC na comparação entre a indução por exsudados rizosféricos e carboidratos, evidenciando o estímulo a população de degradadores de ácidos húmicos na rizosfera e a estimulação deste grupo funcional pela torta de girassol na comparação com os resultados obtidos na tabela 03.

Tabela 4: Densidade populacional de micro-organismos capazes de degradar ácidos húmicos como única fonte de carbono associados a diferentes vermicompostos (isolados pertencentes ao Grupo III). Os valores representam a média de três repetições (expressos em UFC. g<sup>-1</sup> de VC).

Vermicomposto	Potencial Basal (PB)	Potencial Carbono Induzido (PC)	Potencial Rizosférico (PR)
VC1	n.a.	6,7 ± 0,3	n.a.
VC2	n.a.	n.a.	8,9 ± 0,2
VC3	n.a.	7,2 ± 0,4	8,7 ± 0,3
VC4	n.a.	6,4 ± 0,5	8,7 ± 0,2
VC5	n.a.	n.a.	7,9 ± 0,4

Esterco bovino (VC1), bagaço de cana + esterco bovino (VC2), torta de girassol + esterco bovino (VC3), bagaço de cana + torta de girassol + esterco (VC4), torta de filtro (VC5); n.a.: não avaliado; Unidade Formadora de Colônia (UFC).

Além dos isolados com habilidade para fixar nitrogênio (grupo II), diluições seriadas de 10<sup>-4</sup> a 10<sup>-7</sup> foram aplicadas em meio elaborado com a estrutura dos sais do JNFb, uma fonte complexa de N (0,01 % de extrato de levedura) e ácido

húmico (0,025%) para obtenção dos isolados capazes de utilizar AH como fonte de carbono (grupo III). A estratégia secular para isolamento de micro-organismos pela imposição de seletividade pode potencialmente proporcionar a seleção dos micro-organismos hábeis em degradar um substrato específico (Pelczar Junior et al., 1996). Entretanto, os isolados devem ser minuciosamente testados quanto à característica selecionada face ao uso de reagentes impuros e à presença de micro-organismos altamente eficientes no uso de baixas concentrações de compostos de carbono. Jesus et al (2011) testaram três dos isolados oriundos do grupo III (actinomicetos) quanto à capacidade de degradação de AH e concluíram que todos os isolados mostraram-se capazes de catabolizar AH, evidenciado por modificações em diversas funções químicas tais como compostos aromáticos, sulfonados, polissacarídeos e grupamentos carboxílicos monitorados por espectroscopia de IV-TF/DRIFT.

Uma vertente tecnológica futura para o uso destes isolados se baseia na construção de substratos enriquecidos biologicamente para incremento de processos como a fixação biológica de  $N_2$ , solubilização de rochas, incremento de substâncias bioestimulantes e compostos antimicrobianos. Todos esses processos são fortemente limitados pela disponibilidade de carbono prontamente assimilável (Alexander, 1999). Por outra parte, os AH são o produto da degradação da matéria orgânica, e estes compreendem a parte mais estável dessa matéria. Neste contexto, a introdução de micro-organismos capazes de acessar a porção recalcitrante do carbono do solo seria vantajosa, pois poderia tornar disponíveis intermediários de carbono assimiláveis para outros micro-organismos introduzidos em um consórcio microbiano, caracterizando-se como um processo tecnológico viável. Uma variação deste conceito de ativação de substratos agrícolas, foi idealizada e praticada pelo grupo do NUDIBA, já foi experimentalmente validada e publicada por Busato et al., (2012).

#### **4.2 Características morfológicas dos isolados bacterianos**

A diversidade de micro-organismos do solo é supostamente tão ampla quanto desconhecida, estima-se que um grama de solo pode conter 10 bilhões de micro-organismos, representando milhares de espécies (Rosseló-Mora & Amann, 2001).

A caracterização morfológica de colônias de bactérias, embora trabalhosa e até certo ponto subjetiva, é importante como uma primeira aproximação para avaliação da diversidade de populações microbianas (Júnior et al 1999). Segundo Kennedy (1999), a diversidade funcional compreende a diversidade das atividades microbianas no solo, sendo esta de grande importância em avaliações ecológicas dos micro-organismos dentro do ecossistema, sobretudo porque se conhece muito pouco sobre a relação entre diversidade estrutural e funcional desses micro-organismos. Portanto, existe um consenso de que a diversidade microbiana esteja diretamente relacionada à estabilidade do ecossistema.

Como mencionado anteriormente, trinta e oito isolados bacterianos (grupo I) foram obtidos em meio digys, oriundos de intestino de minhoca e vermicomposto de esterco bovino, alguns exemplos estão na figura 3. Na tabela 5 pode-se observar a morfologia celular descrita ao microscópio de luz em material corado e a reação de Gram para todos os isolados obtidos. Os resultados dessa tabela mostram que 84% destes isolados bacterianos apresentam características morfológicas de bastões (curtos ou longos), e 16% apresentaram características morfológicas esféricas (tipo cocos). Dos bastões isolados, 34% foram obtidos do intestino da minhoca, 59% de vermicomposto de esterco bovino e 7% do solo. Em relação aos cocos isolados, 50% foram oriundos do intestino da minhoca, 50% de vermicomposto de esterco bovino e nenhum foi isolado do solo.

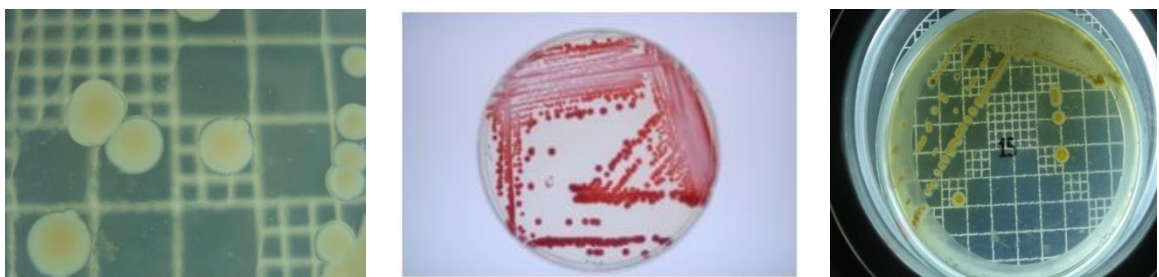


Figura 3: Exemplos de isolados bacterianos oriundos de vermicomposto de esterco bovino e intestino da minhoca *Eisenia foetida* (Grupo I).

A coloração de Gram é o método bacterioscópico mais importante e mais utilizado atualmente na bacteriologia e sua finalidade é a classificação de micro-organismos com base em suas características tintoriais, tamanho, forma e arranjo celular (Maza et al., 2001). As bactérias são classificadas basicamente em dois



grandes grupos: Gram-positivas e Gram-negativas. No que diz respeito às características tintoriais, as bactérias Gram-positivas coram-se de roxo e as bactérias Gram-negativas coram-se de rosa (Albini et al., 2002).

Foram realizadas coloração Gram em cada uma das amostras. De acordo com essa análise, verificou-se que das colônias de bactérias isoladas do (Grupo I) (Tabela 5) 60% foram caracterizadas como Gram-negativas e 39% como Gram-positivas (Tabela 5).

Tabela 5: Características morfológicas dos isolados bacterianos oriundos do vermicomposto de esterco bovino e intestino de minhoca (Grupo I)

Isolado	Morfologia da célula	Fonte	Coloração
1	Bastões pequenos e curvos	Vermicomposto	Gram
2	Bastões pequenos e curvos com mov.	Vermicomposto	Gram
3	Bastões pequenos	Vermicomposto	Gram
4	Bastões pequenos, curvos e pouco móveis	Intestino médio	Gram
5	Bastões pequenos, retos e pouco móveis	Vermicomposto	Gram
6	Bastões longos	Vermicomposto	Gram
7	Bastões pequenos, curvos e pouco móveis	Final do Intestino	Gram
8	Cocos	Vermicomposto	Gram
9	Cocos	Intestino médio	Gram
10	Bastões pequenos, curvos e pouco móveis	Intestino médio	Gram
11	Cocos	Vermicomposto	Gram
12	Bastões pequenos curvos	Vermicomposto	Gram
13	Bastões pequenos	Final do intestino	Gram
14	Bastões pequenos, curvos e pouco móveis	Vermicomposto	Gram
15	Bastões pequenos, curvos e pouco móveis	Início do intestino	Gram
16	Bastões pequenos, curvos e pouco móveis	Vermicomposto	Gram
17	Bastões médios	Intestino médio	Gram
18	Bastões pequenos, curtos e retos	Final do intestino	Gram
19	Bastões pequenos e pouco móveis	Intestino médio	Gram
20	Bastões pequenos	Vermicomposto	Gram
21	Cocos	Final do intestino	Gram
22	Bastões pequenos e pouco móveis	Vermicomposto	Gram
23	Bastões pequenos, curvos e pouco móveis	Vermicomposto	Gram
24	Bastões pequenos e pouco móveis	Solo	Gram
25	Cocos	Vermicomposto	Gram
26	Cocos	Final do intestino	Gram
27	Bastões pequenos com movimento	Fin. do intesti.	Gram
28	Bastões pequenos e curvos	Vermicomposto	Gram
29	Bastões pequenos, curvos e pouco móveis	Intestino médio	Gram
30	Bastões pequenos e curvos	Vermicomposto	Gram
31	Bastões pequenos e retos	Vermicomposto	Gram
32	Bastões pequenos	Vermicomposto	Gram
33	Bastões pequenos	Solo	Gram
34	Bastões pequenos e amarelos	Vermicomposto	Gram
35	Bastões pequenos	Vermicomposto	Gram
36	Bastões pequenos, curvos e pouco móveis	Vermicomposto	Gram
37	Bastões pequenos, curvos e pouco móveis	Intestino médio	Gram
38	Bastões pequenos	Vermicomposto	Gram

No segundo grupo de isolados foram isoladas 20 bactérias oriundas dos diferentes tipos de vermicomposto. A identificação parcial desses isolados teve início pela observação das características morfológicas e a coloração de Gram (Tabela 6). Os resultados indicam que não houve diversidade nas características morfológicas dos isolados bacterianos, ou seja, 100 % apresentaram formas de bastões. O emprego da coloração Gram teve como objetivo verificar a pureza da cultura e a forma predominante como as bactérias se apresentavam (cocos ou bastões). Sendo que 85% das bactérias foram caracterizadas como Gram-negativas e 15% como Gram-positivas.

Tabela 6: Características morfológicas dos isolados bacterianos fixadores de N<sub>2</sub> oriundos de diferentes vermicompostos (GRUPOII)

<b>Isolados</b>	<b>Características morfológicas</b>	<b>Fonte</b>	<b>Coloração Gram</b>
<b>1</b>	Bastões curtos	BC, -3; PI	Gram-negativa
<b>2A</b>	Bastões curtos	BC, -5; PI	Gram-positiva
<b>2B</b>	Bastões curtos	TG, -3; PI	Gram-negativa
<b>3</b>	Bastões curtos	TG, -3; PI	Gram-negativa
<b>4</b>	Bastões curtos e retos	E, -3; PI	Gram-negativa
<b>5A</b>	Bastões curtos	E, -3; PI	Gram-negativa
<b>5B</b>	Bastões curtos e retos	E, -3; PI	Gram-negativa
<b>6</b>	Bastões curtos e retos	E, -3; PI	Gram-negativa
<b>8</b>	Bastões curtos	BCTG, -3; PI	Gram-negativa
<b>9</b>	Bastões curtos	TF, -4; CI	Gram-negativa
<b>10</b>	Bastões curtos	TF, -3CI	Gram-negativa
<b>14</b>	Bastões curtos	TF, -3CI	Gram-negativa
<b>16</b>	Bastões curtos	TF, -3CI	Gram-negativa
<b>17</b>	Bastões curtos	TF, -3CI	Gram-negativa
<b>21</b>	Bastões curtos	TF, -3CI	Gram-positiva
<b>22</b>	Bastões curtos	TF, -5; CI	Gram-negativa
<b>23</b>	Bastões curtos	TF, -3	Gram-negativa
<b>25</b>	Bastões curtos	TF, -3	Gram-negativa
<b>26</b>	Bastões curtos	TF, -3	Gram-positiva
<b>27</b>	Bastões curtos	TF, -3	Gram-negativa

TG: torta de girassol, BC: bagaço de cana, E: esterco, BCTG: bagaço de cana e torta de girassol, TF: torta de filtro, PI: planta induzida, CI: carbono induzido, -3, -4, -5: diluições seriadas.

Na tabela 07 são encontrados os micro-organismos oriundos de diferentes tipos de vermicomposto capazes de utilizar AH como única fonte de C (Grupo III). Dentre os micro-organismos isolados, 48,3% são actinomicetos, 48,3% são bactérias e 0,4% são fungos. De acordo com Ouhdouch et al (2001), os actinomicetos são numerosos no processo de compostagem e desempenham importantes funções na sua decomposição, devido à habilidade de degradar moléculas complexas e recalcitrantes, como celulose, lignina e lignocelulose. São micro-organismos Gram-positivos e caracterizam-se pela sua diversidade morfológica e de metabólitos (Monciardini et al., 2002). Dos isolados bacterianos, 87% são Gram-positivos e 13% são Gram-negativos.



Figura 4: Micro-organismos capazes de utilizar AH como fonte de C (Grupo III)

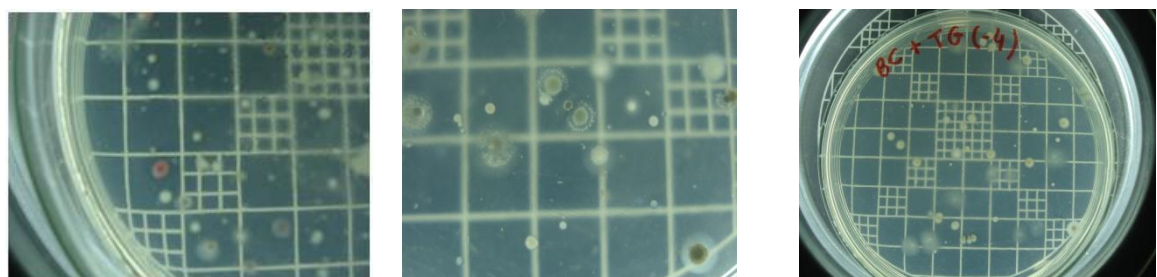


Figura 5: Plaqueamento de diferentes diluições evidenciando unidades formadoras de colônia crescendo em meio de cultura sólido cuja única fonte de C é o AH.

Tabela 7: Características morfológicas dos micro-organismos oriundos de diferentes vermicompostos que usam AH como fonte de C (GRUPOIII)

<b>Isolados</b>	<b>Características morfológicas</b>	<b>Fonte, diluição</b>	<b>Coloração Gram</b>
1	Actinomiceto rosa	TG, -3	na
2	Actinomiceto branco	TG, -3	na
3	Bastões longos	TG, -3	Gram-positiva
4	Actinomiceto branco	TG, -3	na
5	Actinomiceto amarelo	TG, -4	na
6	Actinomiceto branco	TG, -4	na
7	Cocos	E, -6, PI	Gram-positivo
8	Cocos	TF, -4; CI	Gram-positivo
9	Cocos	TG, -3	Gram-positivo
10	Bastões longos	BC, -4	Gram-positivo
11	Bastões pequenos e curvos	BC, -4	Gram-positivo
12	Bastões pequenos e curvos	TG, -3	Gram-positivo
13	Bastões pequenos	BC,-4	Gram-positivo
14	Cocos	BC,-4	Gram-positivo
15	Actinomiceto amarelo	TF, -4	na
16	Actinomiceto	TF, -4	na
17	Cocos	TF, -4	Gram-positivo
18	Bastões longos	E, -4	Gram-positivo
19	Actinomiceto	TG, -4	na
20	Actinomiceto amarelo	TG, -4	na
21	Actinomiceto amarelo	TF, -4	na
22	Actinomiceto	TF, -4	na
23	Actinomiceto branco	TF, -4; CI	na
24	Bastões pequenos	BC, -4	Gram-positivo
25	Bastões longos e retos	BCTG, -6; PI	Gram-negativo
26	Cocos	E, -4	Gram-negativo
27	Actinomiceto	BC, -4	na
28	Bastões pequenos	TF, -6; PI	Gram-positiva
29	Actinomiceto	TF, -4	na
30	Fungo verde	BC, -6; PI	na
31	Actinomiceto	TG, -4	na

TG: torta de girassol, BC: bagaço de cana, E: esterco, BCTG: bagaço de cana e torta de girassol, TF: torta de filtro, PI: planta induzida, CI: carbono induzido, na: não avaliado, -3, -4, -6: diluições seriadas.

De acordo com o gráfico 1, verificou-se que das colônias de bactérias isoladas a maioria constituiu-se de bastões gram-negativos (50%), com 33% de bastões gram-positivos, Cocos gram-negativos (14%) e cocos gram-positivos (3%). Esse dado não corrobora com outros resultados citados na literatura, onde foi relatado micro-organismos em forma de bastões gram-positivos como o representante majoritário na comunidade bacteriana do solo (Batista, 2010). De acordo com o autor, a prevalência dos bastões gram-positivos pode estar relacionada ao fato de que a maioria das bactérias pertencentes a esse grupo forma esporos, sendo mais resistentes a situações adversas. Nesse mesmo trabalho foi relatado um número expressivo de cocos gram-positivos. Esse resultado foi explicado devido ao solo não ser um ambiente isolado, possuindo ligações diretas com a água, ar, planta e animais.

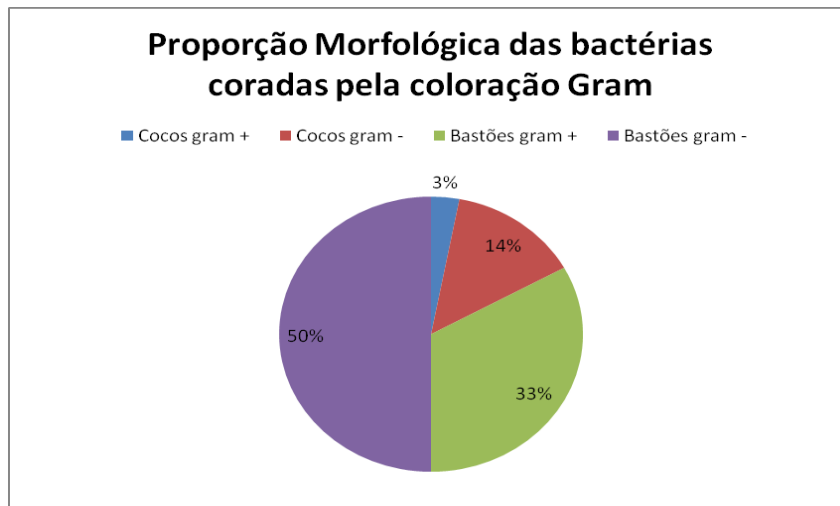


Figura 6: Característica Morfológica das bactérias isoladas (Grupo I, II e III).

#### **4.3 Classificação dos micro-organismos isolados quanto às características fenotípicas da colônia segundo Perin (2003).**

As características culturais dos isolados do grupo I em meio dygs sólido estão descritas na tabela 8. De acordo com a coloração das colônias 58% apresentaram coloração amarela, 24% branca, 16% marron e 2% rosa. Com relação à forma das colônias 98% são circulares e 2% mostraram-se irregulares. Nessa tabela foi observado que a elevação dos isolados apresentou 88% do tipo pulvinada, 8% convexa, 2% do tipo lente e 2% plana.

Tabela 8: Classificação dos isolados bacterianos oriundos de vermicomposto de esterco bovino e intestino de minhoca *E. foetida* (Grupo I) segundo Perin (2003).

<b>Isolados</b>	<b>Cor</b>	<b>Forma</b>	<b>Elevação</b>	<b>Bordo</b>	<b>Superfície</b>	<b>Tamanho</b>
1	Amarela	Circular	Lente	Ondulado	Rugosa	Puntiforme
2	Amarela	Circular	Pulvinada	Inteira	Lisa	Puntiforme
3	Amarela	Circular	Pulvinada	Inteira	Lisa	Puntiforme
4	Amarela	Circular	Pulvinada	Inteira	Lisa	Puntiforme
5	Amarela	Circular	Pulvinada	Inteira	Lisa	Puntiforme
6	Branca	Circular	Plana	Ondulada	Lisa	Puntiforme
7	Amarela	Circular	Pulvinada	Inteira	Lisa	Puntiforme
8	Marrom	Circular	Pulvinada	Inteira	Lisa	Puntiforme
9	Marrom	Circular	Pulvinada	Inteira	Lisa	Puntiforme
10	Amarela	Circular	Pulvinada	Inteira	Lisa	Puntiforme
11	Amarela	Circular	Pulvinada	Inteira	Lisa	Puntiforme
12	Branca	Circular	Pulvinada	Inteira	Lisa	Puntiforme
13	Marrom	Circular	Pulvinada	Inteira	Lisa	Puntiforme
14	Marrom	Circular	Pulvinada	Inteira	Lisa	Puntiforme
15	Amarela	Circular	Pulvinada	Inteira	Lisa	Puntiforme
16	Amarela	Circular	Pulvinada	Inteira	Lisa	Puntiforme
17	Amarela	Circular	Pulvinada	Inteira	Lisa	Puntiforme
18	Amarela	Circular	Pulvinada	Inteira	Lisa	Puntiforme
19	Branca	Circular	Pulvinada	Inteira	Lisa	Puntiforme
20	Marrom	Circular	Convexa	Inteira	Lisa	Puntiforme
21	Branca	Circular	Pulvinada	Inteira	Lisa	Puntiforme
22	Rosa	Circular	Pulvinada	Inteira	Lisa	Puntiforme
23	Branca	Circular	Pulvinada	Inteira	Lisa	Puntiforme
24	Branca	Circular	Pulvinada	Inteira	Lisa	Puntiforme
25	Branca	Circular	Pulvinada	Inteira	Lisa	Puntiforme
26	Branca	Circular	Pulvinada	Inteira	Lisa	Puntiforme
27	Branca	Circular	Pulvinada	Inteira	Lisa	Puntiforme
28	Amarela	Circular	Pulvinada	Inteira	Lisa	Puntiforme
29	Amarela	Circular	Pulvinada	Inteira	Lisa	Puntiforme
30	Amarela	Circular	Pulvinada	Inteira	Lisa	Puntiforme
31	Amarela	Circular	Pulvinada	Inteira	Lisa	Puntiforme
32	Amarela	Irregular	Convexa	Ondulada	Lisa	Puntiforme
33	Amarela	Circular	Pulvinada	Inteira	Lisa	Puntiforme
34	Amarela	Circular	Pulvinada	Inteira	Lisa	Puntiforme
35	Marrom	Circular	Convexa	Inteira	Lisa	Puntiforme
36	Amarela	Circular	Pulvinada	Ondulada	Lisa	Puntiforme
37	Amarela	Circular	Pulvinada	Inteira	Lisa	Puntiforme
38	Amarela	Circular	Pulvinada	Inteira	Lisa	Puntiforme

De acordo com o bordo das colônias 89% são inteiras e 11% onduladas. Com relação à superfície, 98% apresentaram-se lisas e 2% rugosas e 100% dos isolados apresentaram tamanho puntiforme.

Na tabela 9 estão dispostos os isolados bacterianos pertencentes ao Grupo II e sua classificação segundo algumas características de colônias. De acordo com a coloração 75% são marrons, 20% amarelas e 5% são amarelo-escuras, com relação à forma das colônias 85% são circulares e 15% irregulares. Dos isolados que pertencem ao grupo II, 65% apresentaram elevação lente, 25% plana e 10% pulvinada. Com relação ao bordo das colônias 85% foram classificadas como inteira e 15% como filamentosa, 100% dos isolados bacterianos apresentaram superfície lisa e tamanho puntiforme.

Tabela 9: Classificação dos isolados bacterianos fixadores de N<sub>2</sub> oriundos de diferentes vermicompostos (Grupo II), segundo Perin, (2003).

<b>Isolados</b>	<b>Cor</b>	<b>Forma</b>	<b>Elevação</b>	<b>Bordo</b>	<b>Superfície</b>	<b>Tamanho</b>
<b>1</b>	Amarela	Circular	Lente	Inteira	Lisa	Puntiforme
<b>2A</b>	Marrom	Circular	Lente	Inteira	Lisa	Puntiforme
<b>2B</b>	Amarela	Irregular	Plana	Filamentosa	Lisa	Puntiforme
<b>3</b>	Amarela	Circular	Plana	Inteira	Lisa	Puntiforme
<b>4</b>	Marrom	Circular	Plana	Inteira	Lisa	Puntiforme
<b>5A</b>	Marrom	Circular	Plana	Inteira	Lisa	Puntiforme
<b>5B</b>	Marrom	Irregular	Plana	Filamentosa	Lisa	Puntiforme
<b>6</b>	Marrom	Irregular	Lente	Filamentosa	Lisa	Puntiforme
<b>8</b>	Marrom	Circular	Lente	Inteira	Lisa	Puntiforme
<b>9</b>	Marrom	Circular	Lente	Inteira	Lisa	Puntiforme
<b>10</b>	Marrom	Circular	Lente	Inteira	Lisa	Puntiforme
<b>14</b>	Marrom	Circular	Lente	Inteira	Lisa	Puntiforme
<b>16</b>	Marrom	Circular	Lente	Inteira	Lisa	Puntiforme
<b>17</b>	Marrom	Circular	Lente	Inteira	Lisa	Puntiforme
<b>21</b>	Marrom	Circular	Lente	Inteira	Lisa	Puntiforme
<b>22</b>	Marrom	Circular	Lente	Inteira	Lisa	Puntiforme
<b>23</b>	Marrom	Circular	Lente	Inteira	Lisa	Puntiforme
<b>25</b>	Amarela e	Circular	Pulvinada	Inteira	Lisa	Puntiforme
<b>26</b>	Marrom	Circular	Lente	Inteira	Lisa	Puntiforme
<b>27</b>	Amarela	Circular	Pulvinada	Inteira	Lisa	Puntiforme

A tabela 10 representa a classificação dos isolados bacterianos do Grupo III. De acordo com a coloração das colônias, 66% dos isolados apresentaram cor marrom, 7% verde, 13% amarela, 7% transparente e 7% amarelo-escura. Com relação ao formato das colônias, 87% apresentaram forma circular e 13% irregular. As colônias bacterianas apresentaram elevação do tipo pulvinada 53%, plana 27%, lente 13% e convexa 7%. Com relação ao bordo das colônias 86% foram caracterizadas como inteira, 7% ondulada e 7% filamentosa. Dos isolados obtidos 100% apresentaram superfície lisa, e em relação ao tamanho 87% apresentaram-se puntiforme e 13% com 1 cm de diâmetro.

Tabela 10: Classificação dos isolados bacterianos oriundos de diferentes vermicompostos que usam AH como fonte de C (Grupo III), segundo Perin 2003

<b>Isolados</b>	<b>Cor</b>	<b>Forma</b>	<b>Elevação</b>	<b>Bordo</b>	<b>Superfície</b>	<b>Tamanho</b>
1	Rosa	Circular	Pulvinada	Inteira	Rugosa	Puntiforme
2	Branca	Circular	Pulvinada	Inteira	Rugosa	Puntiforme
3	Marrom	Circular	Lente	Inteira	Lisa	Puntiforme
4	Branca	Circular	Pulvinada	Inteira	Rugosa	Puntiforme
5	Amarela	Circular	Pulvinada	Inteira	Rugosa	Puntiforme
6	Branca	Circular	Pulvinada	Inteira	Rugosa	Puntiforme
7	Verde	Circular	Plana	Inteira	Lisa	Puntiforme
8	Marrom	Circular	Pulvinada	Inteira	Lisa	Puntiforme
9	Marrom	Circular	Pulvinada	Inteira	Lisa	Puntiforme
10	Amarela	Circular	Pulvinada	Inteira	Lisa	Puntiforme
11	Amarela	Circular	Plana	Inteira	Lisa	Puntiforme
12	Marrom	Circular	Pulvinada	Inteira	Lisa	Puntiforme
13	Marrom	Irregular	Plana	Filamentosa	Lisa	1cm
14	Transparente	Circular	Pulvinada	Inteira	Lisa	Puntiforme
15	Amarela	Circular	Pulvinada	Inteira	Rugosa	Puntiforme
16	Branca	Circular	Pulvinada	Inteira	Rugosa	Puntiforme
17	Amarela esc.	Circular	Pulvinada	Inteira	Lisa	Puntiforme
18	Marrom	Circular	Plana	Inteira	Lisa	Puntiforme
19	Branca	Circular	Pulvinada	Inteira	Rugosa	Puntiforme
20	Amarela	Circular	Pulvinada	Inteira	Rugosa	Puntiforme
21	Amarela	Circular	Pulvinada	Inteira	Rugosa	Puntiforme
22	Branca	Circular	Pulvinada	Inteira	Rugosa	Puntiforme
23	Branca	Circular	Pulvinada	Inteira	Rugosa	Puntiforme
24	Marrom	Irregular	Lente	Ondulada	Lisa	Puntiforme
25	Marrom	Circular	Pulvinada	Inteira	Lisa	Puntiforme
26	Marrom	Circular	Convexa	Inteira	Lisa	1cm
27	Branca	Circular	Pulvinada	Inteira	Rugosa	Puntiforme
28	Marrom	Circular	Pulvinada	Inteira	Lisa	Puntiforme
29	Branca	Circular	Pulvinada	Inteira	Rugosa	Puntiforme
30	Branca	Circular	Pulvinada	Inteira	Rugosa	Puntiforme
31	Branca	Circular	Pulvinada	Inteira	Rugosa	Puntiforme

Amarela esc: Amarela escura.



#### 4.4 Características fenotípicas relacionadas à promoção de crescimento dos micro-organismos isolados

As bactérias promotoras do crescimento de vegetal (BPCV) atuam promovendo diretamente o crescimento pela produção de fitormônios (como AIA), solubilização de fosfato e zinco, fixação biológica de nitrogênio, degradação de composto, entre outros (Conn et al., 1997; Lazarovits & Nowak, 1997). Esses mecanismos proporcionam um efeito benéfico na germinação de sementes, emergência de plântulas, comprimento de ramos e produção de biomassa, grãos e frutos. Como exemplo dos efeitos de BPCV na produtividade, pode-se citar aumentos de 33% na produção de ervilha e de até 150% em plantas de rabanete com inoculação de *Pseudomonas* sp. (Parke et al., 1991).

No presente trabalho foram isolados micro-organismos oriundos de cinco diferentes tratamentos de vermicomposto e intestino de minhoca *Eisenia faetida*. Todos os isolados foram testados quanto à capacidade de solubilizar fósforo e zinco, degradar celulose, fixar N<sub>2</sub> atmosférico e produzir compostos indólicos na presença ou não de triptofano. Na tabela 11 pode-se observar a distribuição dos traços fenotípicos de promoção de crescimento entre os isolados pertencentes ao grupo I. Dos trinta e oito isolados bacterianos, 40% apresentaram halo de solubilização de fosfato, com destaque para os isolados 6, 22 e 23, que obtiveram o maior halo. A fonte de fósforo utilizada para todos os micro-organismos foi o fosfato de cálcio e a fonte de C para crescimento foi a glicose.

Estudos envolvendo a biomineralização de P têm recebido atenção crescente em função da baixa eficiência da adubação fosfatada e da redução das jazidas de fósforo. A fração majoritária do fósforo liberado por processos de intemperismo de minerais primários passa para uma forma não disponível para as plantas pela precipitação com formas iônicas de cálcio, ferro e alumínio, e principalmente, pela sua adsorção pelos óxidos, hidróxidos e oxi-hidróxidos de ferro e alumínio, presentes, em maiores quantidades em solos mais intemperizados.

Uma alternativa para biodisponibilidade destas formas de P envolve a capacidade de solubilizar fontes de fosfatos inorgânicos insolúveis aumentando o conteúdo de fósforo solúvel na solução do solo pela ação de diferentes grupos microbianos através de diferentes mecanismos. Nesta direção, a seleção de

isolados capazes de solubilizar P se constitui um passo inicial para alavancar tais tecnologias nos diferentes sistemas de produção.

Os micro-organismos solubilizadores de fosfato inorgânico (MSFI) constituem cerca de 5 a 10% da microbiota total dos solos, estes aumentam a disponibilidade do fósforo, que é considerado o macronutriente mais limitante para o crescimento e a produção agrícola em condições brasileiras (Raij, 1991). Por isso a inoculação de bactérias solubilizadoras de fósforo ou o manejo da população destes micro-organismos em culturas agronomicamente importantes, traz grandes benefícios ao desenvolvimento das plantas, melhorando o suprimento de fósforo (Souchie et al., 2005).

Um desafio a ser superado para as condições de solos intemperizados predominantes em solos de clima tropical advém dos estudos conduzidos por Silva Filho & Vidor (2000) a partir de 57 isolados (15 bactérias e 42 fungos) pertencentes à coleção de micro-organismos solubilizadores de fosfatos. Nenhum isolado produziu halo no meio com fosfato de ferro, apenas cinco produziram-no na presença de fosfato de alumínio e, com exceção do isolado 148, todos solubilizaram fosfato de cálcio. Na maioria dos casos, os isolados solubilizam somente fosfatos de cálcio (Louw & Webley, 1959; Duff et al., 1963; Wenzel et al., 1994).

Para solubilização de zinco, um grupo mais restrito de isolados (21% dos isolados do Grupo I) apresentou o halo translúcido em torno das colônias de bactérias. Os isolados inoculados em meio a base de óxido de zinco (ZnO) mais promissores para a solubilização desse nutriente são os de número 21, 22, 23 e 24.

A celulose, dentre os materiais naturais, é o biopolímero mais abundante do planeta (Bayer & Lamed 1992) e pode ser hidrolisada, com ácidos, a glicose. Na natureza, existe uma grande variedade de micro-organismos que produzem celulasas; apenas alguns são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, isto é, são capazes de degradar a celulose natural. Para degradação de celulose os resultados mostraram que 40% dos isolados do Grupo I inoculados em meio sintético contendo metil celulose como única fonte de C foram capazes de produzir celulase. Os isolados que obtiveram maior halo de solubilização foram os de número 11 e 30. Porém, pode não significar que a atividade da celulase é maior nesses isolados (Tabela 11), já que Nogueira & Cavalcanti (1996)

observaram que 48 linhagens de fungos isolados de aveia industrializada, tiveram colônias de menor diâmetro e maiores valores de atividade da celulase.

Ruegger & Tauk-Tornisielo (2004) isolaram 80 fungos filamentosos de solo da Mata Atlântica capazes de degradar celulose. Neste trabalho foi analisado o potencial quanto à produção de celulases em resposta à presença de celulose. Os resultados aqui obtidos demonstraram que, entre as linhagens estudadas, não houve nenhuma que se destacasse das demais, quanto ao potencial para produção de atividade da celulase. Todas elas, praticamente, se igualaram sendo que o tamanho dos halos eram diferentes.

Dos isolados bacterianos do Grupo I (Tabela 11), inoculados 10 vezes consecutivas em meio semi-sólido JNFB (isento de  $N_2$ ), 37% foram capazes de formar película aerotáxica. As bactérias de número 4, 9, 11, 12, 13, 15, 17, 22, 24, 25, 35, 36 e 37, provavelmente promovem o crescimento de plantas a partir do processo de fixação biológica de  $N_2$ .

Vale ressaltar que no presente estudo a capacidade de fixar  $N_2$  foi atestada pela expressão da película em meio semi-sólido isento de N e evidentemente, outras abordagens terão que ser empregadas para validação destes resultados. .

Cerca de 78% do ar é constituído de  $N_2$  e apesar da sua grande disponibilidade, as plantas não conseguem utilizá-lo, mas existem grupos filogenéticos de procariotos, altamente diversos que são capazes de expressar a enzima nitrogenase denominados diazotróficos, ou também conhecidos como bactérias fixadoras de nitrogênio (FBN) (Reis et al., 2006). Bashan & Holguin (1997) relatam que devido à capacidade do *Azospirillum* em fixar nitrogênio, produzir fitormônios, sideróforos, aumentando a absorção de minerais, a inoculação deste gênero tem contribuído para o aumento da produtividade de plantas.

Além da capacidade de fixar nitrogênio, inúmeras pesquisas têm demonstrado que, por exemplo, a inoculação de bactéria promotora do crescimento como *G. diazotrophicus* (bactéria capaz de fixar  $N_2$ ) em diferentes genótipos de cana-de-açúcar pode provocar uma série de mudanças anatômicas e fisiológicas na planta hospedeira não relacionada à atividade diazotrófica. Dentre essas mudanças pode-se citar aumento das raízes laterais, assim como mudanças na geometria das raízes pelo aumento da proporção de raízes finas e do sistema radicular como um todo (Olivares et al., 2002), as quais têm sido

extensivamente atribuídas à capacidade destes micro-organismos de produzir e secretar fitormônios. O ácido indol acético (AIA) é o fitormônio mais estudado no metabolismo das plantas, influenciando processos fisiológicos relacionados ao crescimento e desenvolvimento em baixas concentrações. Inúmeros estudos evidenciam que a aplicação exógena de AIA e alguns de seus derivados químicos exercem efeitos marcantes sobre a arquitetura radicular e a bioquímica da absorção e assimilação de nutrientes (Weyers & Paterson, 2001). Além da produção em tecidos da planta, a síntese de AIA é difundida entre bactérias associadas à planta (Patten & Glick 1996). Assim, o isolamento e a seleção de isolados bacterianos com a capacidade de produzir e secretar compostos com atividade auxínica representam um importante traço fenotípico para geração de produtos biotecnológicos baseados na promoção do crescimento vegetal.

Existem muitos relatos na literatura evidenciando a capacidade de bactérias associadas a plantas em produzir fitormônios e conseqüentemente influenciar o crescimento de planta. Marchioro (2009) avaliou a produção de AIA e derivados em sobrenadantes da cultura de bactérias diazotróficas endofíticas isoladas de diferentes plantas hospedeiras (gramíneas, abacaxi, banana e palmeira) pertencentes aos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Ochrobactrum* e também estirpes de *Rhizobium*. O autor utilizando o método de Salkowski aplicado a 48 linhagens na presença de triptofano observou grande variabilidade entre as bactérias testadas e ausência de relação entre posição taxonômica e capacidade de produzir AIA. Entre as estirpes testadas, X8 (*Herbaspirillum seropedicae*), A3b (*Azospirillum* sp.), BR322 (*Rhizobium* sp.) e FP2 (*Azospirillum brasilense*) mostraram os níveis mais elevados de AIA: 31,52 µg/mL, 75,27 µg/mL, 24,80 µg/mL e 31.45 µg/mL, respectivamente, e 77% das linhagens de diazotrófos endofíticos testados produziram quantidades significantes de derivados indólicos entre 20 e 30 µg AIA/mL.

Devido à sua facilidade, rapidez, sensibilidade e custo, o reagente de Salkowski tem sido largamente empregado na detecção do AIA produzido por bactérias diazotróficas e fitopatogênicas (Hartmann, 1983; Radwan et al., 2005; Steenhoud & Vanderleyden, 2000). O método colorimétrico baseia-se na oxidação de compostos indólicos por sais férricos. A reação de uma solução de AIA com o reagente de Salkowski resulta na coloração amarelada para o teste negativo e rosa avermelhado para o teste positivo.

Neste contexto, isolados bacterianos pertencentes ao Grupo I (Tabela 11) foram testados quanto à capacidade de produzir AIA. Foram feitas leituras em espectrofotômetro a 492 nm em placas de Elisa contendo meio dygs e triptofano com e sem bactérias. Os maiores valores para a síntese de indol foram obtidos com o acréscimo de triptofano nos meios de cultivo dygs. Este experimento mostrou que 100% dos isolados foram capazes de produzir esse fitormônio em quantidades variáveis. As produções variam de 36,8 a 184,6  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em meio na presença de triptofano e de 27,0 a 52,2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em meio sem triptofano. Os isolados pertencentes ao grupo I mais promissores para a produção de AIA foram os de número 4, 5, 7, 8, 10, 12, 19.

De acordo com Inui (2009), a produção de AIA para os isolados *E. homaechei* subsp. *verschuerenii* (USC7), *Enterobacter* sp. (USC8), *Labrys portucalensis* (A5142) e *Burkholderia* sp. (A5155) foi avaliada com 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , obtendo valores superiores aos obtidos por Da Silveira (2008) com isolados selvagens de arroz (9,8 a 29,36  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de AIA), cultivados em meio Dygs suplementado com 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de triptofano. Entretanto, os resultados deste trabalho foram inferiores aos obtidos por isolados de rizóbio de solos ácidos e de baixa fertilidade da Amazônia, que apresentaram níveis elevados de produção de AIA variando de 1.160 a 2.660  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , utilizando 150  $\text{mg mL}^{-1}$  de triptofano (Chagas Junior, 2007).

Perin (2007) avaliou a produção de AIA por bactérias do gênero *Burkholderia*, mas nenhum isolado produziu o hormônio vegetal, indicando que esta habilidade é rara em espécies diazotróficas deste gênero. O isolado identificado como *Burkholderia* sp. (A5155) apresentou capacidade para produção de AIA, obtendo valor máximo de 58,34  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Inui, 2009).

Algumas bactérias como *Aeromonas veronas*, *Agrobacterium* sp., *Azospirillum brasilense*, *Bradyrhizobium* sp., *Rhizobium* sp., *Enterobacter* sp., entre outras, são capazes de produzir AIA, por isso, são conhecidas na literatura como promotoras do crescimento de plantas (Vessey et al., 2003). Zakharova et al. (2003) verificaram que 80% das bactérias isoladas de rizosfera são capazes de produzir esse hormônio. Porém, existem poucos trabalhos sobre a síntese de auxinas por micro-organismos no solo, mas sabe-se que o aminoácido L-triptofano (L-Trp) é um precursor fisiológico para a produção de auxinas em diversas plantas e micro-organismos, e que a enzima chamada ipdC (indole-3-

pyruvate decarboxylase-EC 4.1.1.74) é a enzima-chave para a biossíntese deste fitormônio (Lebuhn & Hartmann, 1993).

Tabela 11: Características fenotípicas de promoção de crescimento de isolados bacterianos oriundos de vermicomposto de esterco bovino e intestino de minhoca (Grupo I)

Isolados	Solub. P	Solub. Zn	Deg.celu.	FBN	Aux.c/trip.	Aux.s/trip.
1	-	-	-	-	36,8 (12,8)	35,8 (6,8)
2	+ (0,4)	-	-	-	80,5 (3,2)	47,0 (5,8)
3	+ (0,5)	-	-	-	93,3 (3,9)	45,5 (5,8)
4	-	-	-	+	122,2 (2,2)	38,0 (5,6)
5	+ (0,3)	-	-	-	109,2 (6,1)	37,7 (1,3)
6	+ (0,8)	+ (0,5)	-	-	87,0 (11,1)	50,0 (17,9)
7	+ (0,5)	+ (0,6)	-	-	107,7 (17,1)	32,7 (1,0)
8	-	-	-	-	121,0 (0,5)	46,2 (5,4)
9	-	-	-	+	66,8 (3,2)	43,3 (12,5)
10	-	-	-	-	101,7 (2,4)	34,7 (6,4)
11	+ (0,6)	+ (0,5)	+	+	99,1 (6,6)	34,2 (2,3)
12	-	-	-	+	100,1 (11,1)	44,7 (4,3)
13	-	-	-	+	78,6 (10,4)	38,7 (4,2)
14	-	-	-	-	70,7 (15,6)	47,7 (7,3)
15	-	-	-	+	57,5 (4,4)	56,2 (0,3)
16	+ (0,4)	-	-	-	66,1 (13,5)	68,5 (12,8)
17	-	-	-	+	68,2 (1,1)	51,0 (2,6)
18	-	-	-	+	79,1 (18,4)	29,5 (0,9)
19	-	-	-	-	106,6 (5,5)	27,0 (2,8)
20	-	-	-	-	55,08 (1,5)	51,1 (5,1)
21	+ (0,4)	+ (1,0)	+	-	81,27 (3,2)	63,5 (2,3)
22	+ (1,0)	+ (3,0)	+	+	66,7 (5,3)	43,5 (6,0)
23	+ (0,8)	+ (1,1)	+	-	72,4 (1,2)	54,4 (0,3)
24	+ (0,6)	+ (1,6)	+	+	95,1 (7,6)	86,0 (13,1)
25	+ (0,6)	-	+	+	64,3 (11,4)	58,1 (9,3)
26	-	-	+	-	118,6 (10)	62,2 (4,8)
27	+ (0,2)	-	+	-	72,1 (5,3)	42,5 (10,7)
28	-	-	+	-	57,8 (6,7)	52,4 (4,8)
29	-	-	+	-	184,6 (10)	41,1 (5,5)
30	+ (0,5)	-	+	-	99,7 (6,3)	44,8 (2,7)
31	-	-	+	-	90,6 (1,7)	38,1 (3,3)
32	-	-	-	-	182,7 (33,4)	46,2 (6,3)
33	+ (0,4)	+ (0,3)	+	-	128,2 (2,1)	46,2 (8,3)
34	-	-	-	-	92,1 (4,5)	41,4 (4,7)
35	-	-	+	+	93,5 (9,1)	52,7 (6,9)
36	-	-	+	+	92,1 (2,9)	40,5 (3,8)
37	-	-	-	+	98,2 (3,9)	50,5 (6,7)
38	-	-	-	-	82,2 (2,9)	36,8 (3,6)
<b>HRC 54</b>	-	-	-	+	68,9 (8,6)	17,5 (2,6)

Solub.P: Solubilização de fósforo, Solub.Zn: Solubilização de zinco, Deg.celu: Degradação de celulose, FBN: Bactérias fixadoras de nitrogênio, Aux.c/trip: Produção de auxina com triptofano, Aux.s/trip: Produção de auxina sem triptofano.

A tabela 12 representa a atividade para promoção de crescimento dos isolados bacterianos pertencentes ao Grupo II. Para solubilização de fosfato 57% das bactérias foram capazes de formar halo em torno das colônias. As bactérias mais promissoras na solubilização desse macronutriente são as de número 4 e 26. Para solubilização de zinco 24% dos isolados foram capazes de solubilizar esse micronutriente, sendo que as bactérias que formaram o maior halo foram as de número 5B, 6, 14. Apenas a bactéria número 4 apresentou atividade para degradação de celulose. Para produção de AIA a partir do triptofano, os dados mostraram que 100% dos isolados foram promissores para essa atividade.

Os resultados sobre as características fenotípicas para os mecanismos de promoção de crescimento representados pelos micro-organismos isolados do (Grupo III), estão demonstrados na tabela 13. De acordo com os dados 66% das bactérias, 81% dos actinomicetos e 0% dos fungos foram capazes de solubilizar P. Quanto à solubilização com óxido de Zn, os resultados mostraram que 20% das bactérias, 6% dos actinomicetos e 0% dos fungos foram capazes de formar halo de solubilização. Para degradação de celulose 0% das bactérias, 31% dos actinomicetos e 0% dos fungos apresentaram um halo amarelo-alaranjado em torno das colônias. Todas as bactérias pertencentes ao Grupo III foram capazes de fixar N<sub>2</sub> atmosférico. Os actinomicetos não foram avaliados quanto à fixação biológica de N<sub>2</sub>. Segundo Huguet et al. (2001), actinomicetos do gênero *Frankia* são capazes de se associar simbioticamente às raízes de espécies arbóreas angiospermas denominadas plantas actinorrízicas, conduzindo à formação de estruturas nodulares onde ocorre a fixação biológica do nitrogênio.

Em geral, os fitormônios excretados por micro-organismos, principalmente o AIA, desempenham papel essencial na promoção do crescimento de plantas.

A tabela 13 mostrou que 80% dos isolados bacterianos foram capazes de produzir esse fitormônio, sendo que os isolados de número 10, 24 e 26 apresentaram maior produção de AIA com valores entre 41, 55,5 e 45,2 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Os actinomicetos não foram avaliados quanto a esse mecanismo de promoção de crescimento, porém o primeiro relato da produção de compostos indólicos por estirpes de *Frankia* foi feito por Andrade et al (2007).

Tabela 12: Características fenotípicas de promoção de crescimento de isolados fixadores de N<sub>2</sub> oriundos de diferentes vermicompostos (Grupo II)

Isolados	Solub.P	Solub. Zn	Deg.celu.	FBN	Aux.c/trip.	Aux.s/trip.
<b>1</b>	-	-	-	+	72,9 (7,0)	43,1 (19,2)
<b>2A</b>	-	-	-	+	56,2 (2,0)	46,8 (23,2)
<b>2B</b>	+ (0,5)	-	-	+	68,0 (2,0)	45,4 (4,8)
<b>3</b>	-	-	-	+	66,7 (5,2)	40,4 (6,2)
<b>4</b>	+ (0,7)	-	+	+	73,2 (4,4)	33,6 (4,2)
<b>5A</b>	-	-	-	+	133,9 (7,4)	43,9 (2,6)
<b>5B</b>	+ (0,6)	+ (1,2)	-	+	117,2 (16,8)	40,7 (3,2)
<b>6</b>	+ (0,4)	+ (1,8)	-	+	107,1 (24,5)	33,6 (5,1)
<b>8</b>	-	-	-	+	138,1 (27,1)	45,9 (6,1)
<b>9</b>	+ (0,5)	-	-	+	65,7 (5,9)	43,4 (3,8)
<b>10</b>	-	-	-	+	82,5 (11,6)	29,8 (6,1)
<b>14</b>	+ (0,5)	+ (1,7)	-	+	60,0 (4,9)	33,7 (8,6)
<b>16</b>	+ (0,6)	-	-	+	84,2 (16,2)	36,2 (4,4)
<b>17</b>	-	-	-	+	60,7 (11,8)	35,1 (5,6)
<b>19</b>	-	-	-	+	57,5 (13,9)	39,2 (4,1)
<b>21</b>	+ (0,5)	-	-	+	55,4 (7,5)	5,98 (1,1)
<b>22</b>	+ (0,5)	-	-	+	82,5 (3,0)	53,1 (9,1)
<b>23</b>	+ (0,5)	-	-	+	80,0 (5,9)	45,6 (6,8)
<b>25</b>	+ (0,5)	+ (0,7)	-	+	64,8 (1,7)	50,1 (3,2)
<b>26</b>	+ (1,2)	+ (1,0)	-	+	82,5 (3,7)	50,4 (9,3)
<b>27</b>	-	-	-	+	80,7 (2,1)	51,9 (9,0)
<b>HRC54</b>	-	-	-	+	58,2 (5,3)	21,1 (2,1)

Solub.P: Solubilização de fósforo, Solub.Zn: Solubilização de zinco, Deg.celu: Degradação de celulose, FBN: Bactérias fixadores de nitrogênio, Aux.c/trip: Produção de auxina com triptofano, Aux.s/trip: Produção de auxina sem triptofano.



Tabela 13: Características fenotípicas de promoção de crescimento dos micro-organismos capazes de utilizar AH como fonte única de C vermicompostos (GRUPO III)

Isolados	Solub.P	Solub.Zn	Deg.celu.	FBN	Aux.c/trip.	Aux.s/trip.
1	-	-	+	na	na	Na
2	+ (0,4)	-	-	na	na	Na
3	+ (0,3)	-	-	+	64,1 (10,4)	34,1 (6,50)
4	+ (0,8)	-	-	na	na	Na
5	+ (0,4)	-	+	na	na	Na
6	+ (0,4)	-	-	na	na	Na
7	-	-	-	+	43,4 (5,68)	44,7 (5,49)
8	+ (0,5)	-	-	+	54,6 (1,98)	43,3 (5,49)
9	+ (0,6)	-	-	+		
10	-	-	-	+	77,1 (6,22)	36,1 (5,36)
11	+ (0,5)	-	-	+	75,7 (22,0)	35,8 (1,19)
12	+ (0,5)	+ (0,2)	-	+	70,0 (10,6)	47,6 (17,0)
13	+ (0,9)	-	-	+	36,9 (2,34)	31,1 (0,99)
14	+ (1,0)	+ (1,1)	-	+	71,7 (4,62)	42,3 (4,83)
15	+ (0,5)	-	-	na	na	Na
16	-	-	-	na	na	Na
17	+ (0,5)	-	-	+	73,0 (18,5)	41,2 (11,9)
18	-	-	-	+	57,9 (8,93)	33,0 (6,04)
19	+ (0,5)	-	-	na	na	Na
20	+ (0,7)	-	+	na	na	Na
21	+ (0,6)	-	+	na	na	Na
22	+ (0,2)	-	-	na	na	Na
23	-	-	-	na	na	Na
24	-	-	-	+	88,0 (15,8)	32,5 (2,14)
25	+ (0,9)	+ (1,5)	-	+	82,6 (2,79)	42,5 (4,10)
26	-	-	-	+	82,0 (12,5)	36,8 (3,96)
27	+ (2,1)	+ (2,9)	-	na	na	Na
28	+ (0,5)	-	-	+	53,6 (7,14)	45,3 (6,97)
29	+ (1,2)	-	-	na	na	Na
30	+ (1,8)	-	-	na	na	Na
31	+ (0,5)	-	+	na	na	Na

Solub.P: Solubilização de fósforo, Solub.Zn: Solubilização de zinco, Deg.celu: Degradação de celulose, FBN: Bactérias fixadores de nitrogênio, Aux.c/trip: Produção de auxina com triptofano, Aux.s/trip: Produção de auxina sem triptofano, na: não avaliado.

Os resultados globais para características fenotípicas de promoção de crescimento dos isolados pertencentes aos Grupos I, II e III se encontram na tabela 14. De acordo com os dados mostrados por essa tabela, grande parte dos isolados foi capaz de solubilizar P, fixar N atmosférico e produzir AIA a partir do Triptofano. Poucos foram capazes de solubilizar Zn e degradar celulose. Estes resultados corroboram com informações postuladas que muitas bactérias são ubíquas desempenhando além de FBN, solubilização de fosfatos insolúveis e produção de AIA, que são mecanismos amplamente distribuídos entre micro-organismos rizosféricos (Khan et al., 2009). Na figura 10 estão representados exemplos dos isolados pertencentes ao Grupo I, II e III, com atividade positiva para solubilização de P, Zn e degradação de celulose. Estes dados evidenciaram que micro-organismos isolados de diferentes vermicompostos e intestino de minhoca possuem potencial para promoção de crescimento vegetal.

Tabela 13: Resultados globais para características fenotípicas de promoção de crescimento dos isolados pertencentes ao grupo I, II, III.

Promoção de crescimento	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Fonte	VC 1 e Intes.Min.	Diferentes VCs	Diferentes VCs
N <sup>o</sup> de isolados	39%	19%	31%
Meio de isolamento	Dygs sólido	JNFB semi-sólido	JNFB+25mg.L <sup>-1</sup> AH
Fixadoras de N <sub>2</sub>	16%	100%	100%
Solubiliza P	16%	20%	23%
Solubiliza Zn	9%	8%	7%
Degrada celulose	15%	2%	16%
Produz AIA	100%	100%	100%

VC1: Vermicomposto de esterco bovino, Intes.Min: Intestino de minhoca, Diferen. VCs: Diferentes vermicompostos, AH: Ácido Húmico.

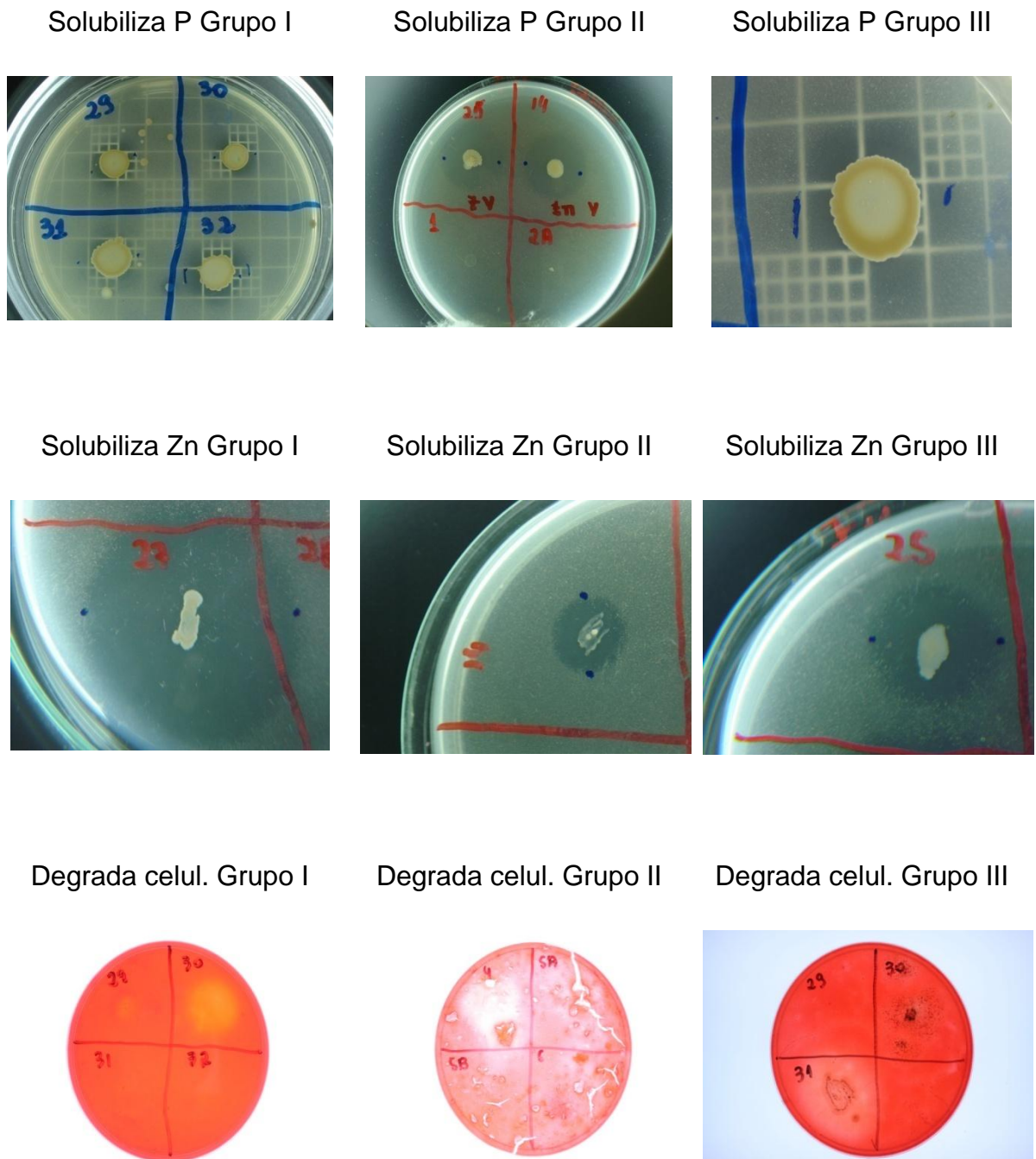


Figura 10: Promoção de crescimento dos micro-organismos isolados.

#### 4.5 Avaliação do crescimento de plântulas de milho em sistemas axênicos

Os efeitos na promoção de crescimento incluem aumentos na altura, na biomassa da parte aérea, do caule e da raiz e na formação de pelos radiculares e foliares da planta, na lignificação de vasos do xilema e na produção de tubérculos em batata (Pillay & Nowak, 1997; Sturtz, 1995).

Os principais mecanismos pelos quais as bactérias promovem o crescimento de plantas são a fixação de nitrogênio (Boddey & Döbereiner, 1995) e o controle biológico de fitopatógenos, seja este pelo antagonismo direto da microflora deletéria ou pela indução de resistência sistêmica (Hallmann et al., 1997). No entanto, BPCV podem também promover o crescimento de plantas pela produção de hormônios vegetais ou de substâncias análogas (Arshad & Frankenberger, 1991).

Neste sentido oitenta e nove micro-organismos foram isolados e avaliados quanto ao potencial de sintetizar auxina a partir do triptofano, solubilizar óxido de Zn e fosfato de Ca, fixar N atmosférico e degradar celulose. Após 10 dias da inoculação desses isolados em sistemas axênicos, foi constatado incrementos nas características de crescimento de plântulas de milho *Zea mays* var. UENF/506-11.

Nos isolados bacterianos representados pelo grupo I (Tabela 14), não foram observadas diferenças estatísticas para altura das plântulas (alt.), comprimento radicular (CR), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da raiz (MSR), massa seca da parte aérea (MSPA) e relação raiz/parte aérea (RRPA). No entanto, foram observadas algumas diferenças estatísticas nos valores representados pela massa fresca da raiz (MFR). Sendo os isolados de número 19, 20, 21, 23, 28, 29, 31, 32, 33 os mais promissores. Os isolados 21, 23 e 33 foram capazes de solubilizar fosfato e óxido de zinco, degradar celulose e produzir AIA. Já os isolados 28, 29 e 31 foram capazes de degradar celulose e produzir AIA.

Os isolados bacterianos de número 19, 20 e 32 apresentaram atividade positiva somente para produção de AIA. Principalmente os isolados 19 e 32 que alcançaram valores de 79,6 e 136,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente.

Uma das respostas da planta ao AIA sintetizado por bactérias é o crescimento das raízes, como constatado em estudos realizados com *Azospirillum* (Döbbelaere et al., 2002). Auxina e etileno são conhecidos como reguladores de vários processos que modificam a arquitetura do sistema radicular, incluindo alongamento da raiz primária e formação e alongamento de pelos radiculares. Alguns autores verificaram uma correlação positiva entre a produção de auxina e o estímulo de promoção do crescimento vegetal (Asghar et al., 2002; Khalid et al., 2004).

Tabela 14: Efeito da inoculação de isolados bacterianos diazotróficos e não diazotróficos oriundos de vermicomposto (esterco bovino) e intestino de minhoca (Grupo I) sobre características biométricas de plântulas de milho variedade UENF 506-11 (*Zea mays* L.). Os resultados representam média de três repetições com significância validada pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

Características biométricas						
Estirpes	Alt.(cm)	MFR.(g)	MFPA.(g)	MSR.(mg)	MSPA.(mg)	RRPA
1	27,83 n.s <sup>7</sup>	0,95B	0,99 n.s <sup>7</sup>	58 n.s <sup>7</sup>	94 n.s <sup>7</sup>	66 n.s <sup>7</sup>
2	28,50	0,92B	1,03	59	101	58
3	27,33	1,15B	1,06	62	99	63
4	27,16	1,08B	1,12	71	108	66
5	27,66	1,15B	1,31	66	111	59
6	25,00	1,26A	1,02	70	99	74
7	28,33	1,28A	0,87	68	103	67
8	28,16	1,26A	1,13	64	92	74
9	29,66	0,96B	1,00	69	90	78
10	28,66	1,07B	1,09	70	99	71
11	24,83	1,31A	1,17	81	103	78
12	27,33	0,99B	0,96	73	92	83
13	27,33	1,00B	0,92	66	84	79
14	28,50	1,33A	1,09	62	89	71
15	26,50	1,39A	1,03	67	85	79
16	28,83	1,17B	1,12	58	93	63
17	24,83	0,98B	1,06	59	86	68
18	24,16	1,30A	1,40	63	107	58
19	25,16	1,51A	1,05	69	82	87
20	29,00	1,51A	1,35	68	110	64
21	29,33	1,41A	1,55	65	121	53
22	26,33	1,22A	1,13	61	92	67
23	25,83	1,52A	1,14	71	93	77
24	28,33	1,31A	1,09	74	84	87
25	24,33	1,33A	1,24	65	96	68
26	21,16	1,00B	0,96	66	78	85
27	26,00	1,17B	1,06	61	93	66
28	27,33	1,46A	1,03	65	94	70
29	24,50	1,42A	1,11	76	94	82
30	27,83	1,13B	1,01	66	90	74
31	29,16	1,32A	1,21	66	103	65
32	25,66	1,52A	1,28	60	109	55
33	24,66	1,51A	1,08	74	95	78
34	24,83	1,00B	0,87	61	69	94
35	21,83	1,19B	0,83	62	76	81
36	26,33	1,17B	1,08	76	102	74
37	26,33	1,34A	1,02	74	91	82
38	23,50	1,18B	1,03	61	83	76
<b>Controle</b>	20,66	0,69B	0,64	42	49	86
<b>CV%</b>	11,34	19,75	16,92	15,15	17,39	22,07

Altura (alt); Massa fresca radicular (MFR); Massa fresca da parte aérea (MFPA); Massa seca radicular (MSR); Massa seca da parte aérea (MSPA); Relação raiz/parte aérea (RRPA). n.s. (não significativo).

As auxinas são consideradas os fitormônios quantitativamente secretados mais abundantes em espécies de *Azospirillum* e, é geralmente aceito que a produção de auxinas é o fator majoritário responsável pela estimulação do enraizamento e crescimento das plantas inoculadas com bactérias (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000).

O incremento verificado na MFR das plântulas inoculadas pode ser creditado a uma eficiente interação planta – bactéria na região da raiz, pois a inoculação com rizobactérias provoca um estímulo ao desenvolvimento do sistema radicular, com aumento do número de pelos radiculares, proporcionando maior absorção de água e nutriente (Pazos & Hernández, 2001).

Os isolados bacterianos do grupo II (Tabela 15) não apresentaram diferenças estatísticas na alt. das plântulas, MFPA, MSPA e RRPA em relação ao controle não inoculado. No entanto, dos parâmetros analisados, foram observadas algumas diferenças estatísticas nos valores de CR, MFR e MSR.

Quando avaliado o CR das plântulas de milho nos diferentes tratamentos de inoculação, verificou-se que as bactérias de número 1, 2A, 2B, 4, 5A, 5B, 8, 9, 10, 16, 21, 22, 25, 26, 27 apresentaram valores estatisticamente superiores aos demais isolados e ao controle não inoculado. Os isolados 5B, 25, 26 foram capazes de solubilizar fosfato e óxido de zinco, fixar N<sub>2</sub> e produzir AIA. Os isolados de número 1, 2A, 5A, 8, 10 e 27 foram capazes de fixar N<sub>2</sub> e produzir auxina. Os isolados de número 2B, 9, 16, 21 e 22 foram capazes de solubilizar fosfato, fixar N<sub>2</sub> e produzir auxina. O isolado de número 4 foi capaz de solubilizar fosfato, degradar celulose, fixar N<sub>2</sub> e produzir auxina.

Quanto à MFR, verificou-se diferença estatisticamente significativa nos isolados de número 1, 2B, 4, 5A, 6, 10, 14, 16, 22, 25, 26, 27. Os isolados 6, 14, 25, 26 foram capazes de solubilizar fosfato de Ca e óxido de Zn, fixar N<sub>2</sub> e produzir AIA. Os isolados de número 1, 5A, 10 e 27 foram capazes de fixar N<sub>2</sub> e produzir auxina. Os isolados de número 2B e 22 foram capazes de solubilizar fosfato Ca, fixar N<sub>2</sub> e produzir auxina. Os isolados de número 2B e 4 foram capazes de solubilizar fosfato, degradar celulose, fixar N<sub>2</sub> e produzir auxina.

Tabela 15: Efeito da inoculação de isolados bacterianos diazotróficos oriundos de diferentes vermicompostos (Grupo II) sobre características biométricas de plântulas de milho variedade UENF 506-11 (*Zea mays* L.). Os resultados representam média de três repetições com significância validada pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

Características biométricas							
Estirpes	Alt.(cm)	CR.(cm)	MFR.(g)	MFPA.(g)	MSR.(mg)	MSPA.(mg)	RRPA
<b>26V</b>	6,83 n.s <sup>8</sup>	29,66A	1,60A	0,30n.s.	148A	126 n.s.	1,18n.s
<b>25V</b>	9,20	26,10A	1,58A	0,32	161A	144	1,12
<b>1V</b>	5,66	26,33A	1,57A	0,95	83B	98	0,85
<b>16V</b>	7,03	23,40A	1,55A	0,95	138A	115	1,19
<b>27V</b>	9,96	23,33A	1,54A	1,10	145A	0,144	1,03
<b>5AV</b>	9,23	26,16A	1,40A	1,12	116A	146	0,79
<b>4V</b>	7,70	22,00A	1,36A	1,02	131A	115	1,16
<b>6V</b>	7,00	20,23B	1,34A	1,17	116A	133	0,87
<b>2BV</b>	7,33	24,00A	1,33A	0,88	124A	105	1,25
<b>22V</b>	7,56	26,00A	1,24A	0,85	100B	94	1,11
<b>14V</b>	7,83	17,33 B	1,21A	0,88	109B	119	0,91
<b>10V</b>	6,73	22,33A	1,21A	0,88	91B	101	0,89
<b>9V</b>	6,66	24,16A	1,14B	0,90	84B	40	0,59
<b>2AV</b>	7,56	27,16A	1,07B	0,89	105B	106	0,98
<b>17V</b>	7,00	19,26B	0,99B	0,89	93B	111	0,84
<b>5BV</b>	6,96	23,00A	0,99B	0,69	83B	73	1,24
<b>8V</b>	8,50	23,50A	0,96B	1,07	120A	127	0,94
<b>23V</b>	7,16	17,06 B	0,96B	0,93	99B	97	1,04
<b>3B</b>	8,23	19,00B	0,87B	1,06	101B	132	0,76
<b>21V</b>	9,00	27,33A	0,82B	1,06	110B	132	0,85
<b>Controle</b>	4,00	11,66B	0,81B	0,65	59B	78	1,20
<b>19V</b>	8,06	20,5B	0,62B	0,87	90B	99	0,91
<b>CV%</b>	<b>18,91</b>	<b>17,06</b>	<b>24,69</b>	<b>43,08</b>	<b>23,56</b>	<b>88,44</b>	<b>33,04</b>

Altura (alt); Comprimento radicular (CR); Massa fresca radicular (MFR); Massa fresca da parte aérea (MFPA); Massa seca radicular (MSR); Massa seca da parte aérea (MSPA); Relação raiz/parte aérea (RRPA). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade, n.s. = diferença não significativa.

Com relação à MSR, os isolados bacterianos de número 2B, 4, 5A, 6, 8, 16, 25 e 26 provocaram aumento estatisticamente significativo com relação ao controle. As bactérias de número 5A, 8 e 27 são fixadoras de N<sub>2</sub> e produzem auxina. Os isolados bacterianos de número 6, 25 e 26 foram capazes de solubilizar fosfato de Ca e óxido de Zn, fixar N<sub>2</sub> e produzir AIA. Os isolados de

número 2B e 16 foram capazes de solubilizar fosfato de Ca, fixar N<sub>2</sub> e produzir auxina. Já o isolado bacteriano de número 4 apresentou atividade positiva para solubilização de fosfato de Ca, fixação de N<sub>2</sub>, degradação de celulose e produção de celulose.

Os micro-organismos isolados do grupo III (Tabela 16) apresentaram diferenças estatísticas em todos os parâmetros analisados, menos RRPA, onde não houve diferenças estatísticas entre as amostras.

Os isolados mais promissores para a promoção da altura das plântulas foram os de número 29 e 30 (actinomiceto e bactéria, respectivamente). O isolado 29 apresentou atividade positiva para solubilização de fosfato de Ca, porém não foi avaliado quanto à capacidade de fixar N<sub>2</sub> e produzir AIA. Alguns gêneros de actinomicetos são capazes de solubilizar P inorgânico tornando esse nutriente disponível para planta, agindo como microrganismo promotor de crescimento (Mikanová & Kubat, 2002).

Outro actinomiceto que demonstrou resultados estatisticamente significativos para alt. das plântulas foi de número 31. Esse apresentou atividade positiva para solubilização de fosfato de Ca e degradação de celulose. A capacidade celulolítica de actinomicetos já foi verificada e envolve a ação de várias enzimas, como: endoglucalase, exoglucanase e B-glucosidase. A primeira possui a habilidade de clivar substitutos derivados da celulose, tais como carboximetil celulose; a segunda libera unidades de celobiose de cadeias finais não reduzidas de celulose microcristalinas (Avicel); e a terceira catalisa a hidrólise de celobiose e celooligossacarídeos a glicose (Wachinger et al., 1989).

Na literatura está descrito vários gêneros de fungos solubilizadores de fosfato. Reyes et al. (1999) encontraram correlação positiva entre a solubilização de fosfatos por *Penicillium rugulosum*. Rodriguez & Fraga, (1999) afirmaram que das populações fúngicas, os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são os que mais se destacam para solubilização desse nutriente.

Com relação à MFR, os micro-organismos de número 2, 15, 16, 21, 25, 27, 29, 30 foram os mais promissores. Sendo que os isolados 2, 15, 16, 21, 27 e 29 são actinomicetos, o isolado 25 e 30 são bactérias. Quanto aos mecanismos de promoção de crescimento testados, os actinomicetos 2, 15 e 29 apresentaram atividade positiva para solubilização de P. Já o actinomiceto solubiliza P e degrada celulose, e o 27 solubiliza P e Zn. O actinomiceto 16 não apresentou



nenhuma atividade positiva para os mecanismos de promoção de crescimento avaliados neste trabalho. A bactéria 25 foi capaz de solubilizar P, Zn, fixar N e produzir AIA, e a bactéria 30 foi capaz de solubilizar P.

Quando avaliada a MFPA nos diferentes tratamentos de inoculação, verificou-se que a inoculação com os micro-organismos 30 e 31 determinou valores estatisticamente superiores aos demais. O mesmo aconteceu com a altura das plântulas (já descrito acima).

Quanto à MSR, os micro-organismos de número 29, 30 e 31 se destacaram em relação aos demais tratamentos de inoculação. Okon & Kapulnik (1986) conduziram estudos sobre a morfologia das raízes de milho inoculadas com *A. brasilense* e verificaram que este microrganismo causa alterações morfológicas na raiz logo após a germinação. Durante as três primeiras semanas após a germinação aumentam o número de pelos radiculares e de raízes laterais nas plantas inoculadas, mas não se altera o peso da raiz. A massa seca radicular aumenta em estágios posteriores.

No entanto, no presente trabalho foi verificado incremento na MSR e MFR das plântulas de milho após sete dias de inoculação. Este resultado pode estar relacionado à presença da interação entre planta e actinomiceto, decorrentes de características genéticas específicas da planta, como produção de exsudados radiculares.

Quanto a MSPA foi verificado que os micro-organismos de número 2, 31 e 29 foram os mais promissores. Esses também se destacaram em alguns parâmetros analisados como: alt. das plântulas, MFR, MFPA. Os resultados demonstraram que isolados 31 e 29 apresentaram uma resposta positiva como bioinoculantes em plântulas de milho.

Tabela 16: Efeito da inoculação de micro-organismos oriundos dos diferentes vermicompostos que utilizam AH como única fonte de C (Grupo III). Sobre características biométricas de plântulas de milho variedade UENF 506-11 (*Zea mays* L.). Os resultados representam média de três repetições com significância validada pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

Características biométricas						
Estirpes	Alt.(cm) <sup>1</sup>	MFR.(g) <sup>2</sup>	MFPA. (g) <sup>3</sup>	MSR(mg) <sup>4</sup>	MSPA(mg) <sup>5</sup>	RRPA <sup>6</sup>
1	27.33C	1.18B	0.91B	96C	130B	0.73B
2	28.33B	1.54 <sup>a</sup>	1.09B	130B	166A	0.79B
3	28.00B	0.98C	1.08B	83C	140B	0.60B
4	26.83C	1.11C	0.84C	90C	106C	0.84B
5	26.83C	1.01C	0.81C	80C	103C	0.78B
6	27.33C	1.26B	0.99B	116B	140B	0.83B
7	25.16D	0.58D	0.66D	40C	106C	0.36B
8	28.16B	1.34B	1.05B	103B	116C	0.95B
9	26.83C	1.09C	0.81C	90C	126B	0.73B
10	27.00C	0.97C	0.91B	73C	103C	0.71B
11	28.00B	0.91C	1.02B	70C	103C	0.69B
12	27.16C	0.81D	0.95B	63C	83C	0.76B
13	27.00C	0.93C	0.94B	76C	100C	0.73B
14	26.50C	0.79D	0.92B	76C	96C	0.82B
15	26.66C	1.40 <sup>a</sup>	0.98B	133B	147B	0.92B
16	27.16C	1.54 <sup>a</sup>	1.07B	126B	113C	1.10B
17	27.33C	1.04C	1.12B	93C	106C	0.88B
18	26.33C	1.10C	0.95B	93C	93C	1.03B
19	25.33D	1.26B	0.76C	103B	110C	0.97B
20	26.00C	1.34B	0.91B	103B	93C	1.13B
21	27.00C	1.53 <sup>a</sup>	0.97B	116B	96C	1.21B
22	26.66C	1.02C	0.88C	83C	96C	0.87B
23	26.83C	1.33B	1.11B	116B	110C	1.07B
24	26.66C	1.23B	0.94B	94C	76D	1.24B
25	27.66B	1.53 <sup>a</sup>	1.00B	126B	100C	1.30B
26	26.66C	1.22B	0.99B	106B	90C	1.23B
27	28.00B	1.50 <sup>a</sup>	1.02B	130B	100C	1.27B
28	27.16C	1.15C	1.03B	106B	120C	0.91B
29	29.66A	1.51 <sup>a</sup>	1.43A	240A	260A	9.17A
30	29.66A	1.45 <sup>a</sup>	1.58A	143B	150B	0.95B
31	28.66B	1.29B	1.06B	120B	173A	0.71B
Controle	23.50E	0.79D	0.67D	63C	0.67D	0.91B
CV%	2,54	15,52	9,44	22,37	15,10	54,75

Altura (alt); Comprimento radicular (CR); Massa fresca radicular (MFR); Massa fresca da parte aérea (MFPA); Massa seca radicular (MSR); Massa seca da parte aérea (MSPA); Relação raiz/parte aérea (RRPA). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade, n.s. = diferença não significativa.

## 5. RESUMO E CONCLUSÕES

O processo de vermicompostagem envolve uma série de transformações da matéria orgânica catalizadas por comunidades microbianas complexas e pela ação de minhocas que resultam na formação de um produto com grande potencial de uso na agricultura. Os vermicompostos constituem uma fonte diversa de microorganismos cujo potencial biofertilizante e bioestimulante para plantas tem sido pouco explorado. O Núcleo de Desenvolvimento de Insumos Biológicos para a Agricultura (NUDIBA) da UENF produz vários tipos de vermicompostos a partir de diferentes resíduos. Foi estabelecido um programa preliminar de prospecção microbiana com intuito de obter bactérias candidatas a compor formulações envolvendo inoculantes, substratos agrícolas biologicamente enriquecidos e fertilizantes organo-minerais. O presente trabalho tem como objetivos quantificar, isolar e caracterizar o potencial de promoção de crescimento de diferentes isolados bacterianos diazotróficos e não diazotróficos obtidos a partir de diluições seriadas dos vermicompostos produzidos com esterco bovino (E), esterco e torta de filtro (TF), esterco e bagaço de cana (BC), esterco e torta de girassol (TG) e com a mistura de todos os resíduos (TGBC), além de fragmentos de minhoca e solo. Para avaliação do potencial de inóculo das bactérias diazotróficas presentes nas diferentes fontes de matéria orgânica estabilizadas foi proposta uma nova

metodologia baseada na quantificação das populações bacterianas induzidas ou não pela aplicação de fontes de carbono ou exsudados da rizosfera. Os isolados bacterianos com potencial diazotrófico foram obtidos a partir do meio semi-sólido JNFB isento de N e as bactérias não fixadoras de N foram obtidas a partir de placas contendo meio sólido Dygs. Ademais, a partir de um meio sólido modificado, contendo ácidos húmicos ( $20 \text{ mg C L}^{-1}$ ) como fonte única de carbono, foram realizadas tentativas de obtenção de micro-organismos capazes de utilizar ácidos húmicos como fonte de energia para futuros trabalhos de enriquecimento biológico de substratos agrícolas. Foram caracterizados 89 isolados em relação ao tipo de colônia, morfologia celular ao microscópio óptico, coloração de gram e traços fenotípicos relacionados à promoção do crescimento (solubilização de P e Zn, produção de compostos indólicos, degradação de celulose). Os resultados evidenciaram que 56% dos isolados foram capazes de solubilizar P. e 19% capazes de solubilizar Zn. A habilidade para produção de AIA foi positiva para 100% dos isolados analisados e 24% se mostraram capazes de degradar celulose. Além disso, os isolados foram testados quanto ao potencial de promoção de crescimento vegetal em condições monoxênicas utilizando milho como planta modelo. Os resultados mostraram que dos parâmetros analisados, 78% dos isolados foram estatisticamente significativos pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. O estudo da vida microbiana nestes vermicompostos contribui para entendimento melhor sobre a diversidade microbiana e pode garantir o sucesso em etapas subsequentes do programa de desenvolvimento de insumos biológicos para agricultura desenvolvidos no NUDIBA.

- Foram obtidos 89 isolados bacterianos oriundos de diferentes vermicompostos maturados e do intestino de minhocas. A maioria dos isolados demonstrou alguma característica fenotípica associada à promoção do crescimento, com isolados de número 29, 30 e 31 (grupo III) mostrando grande potencial para uso em inoculantes em plântulas de milho.
- A metodologia da determinação do potencial de inóculo de diazotróficos naturalmente presentes no vermicomposto demonstrou-se sensível para discriminação da sua capacidade diferencial em abrigar estes grupos funcionais. Estes resultados podem gerar vertentes para evolução no uso de vermicompostos e outras frações húmicas como veículo microbiano.

- O meio idealizado para capturar micro-organismos capazes de degradar ácidos húmicos como única fonte de carbono se revelou eficaz, gerando resultados importantes para futuros estudos de enriquecimento biológico de substratos.
- Curiosamente todos os isolados bacterianos, obtidos a partir de um meio com ácido húmico como fonte de carbono e que pertencem ao Grupo III foram capazes de fixar N.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abeles, F.B., Morgan, P.W., Saltveit Jr, M.E. (1992) Ethylene and plant biology. 2<sup>nd</sup> ed., *Academic Press*, San Diego.
- Albanell, E., Plaixats, J., Cabrero, T. (1988) Chemical changes during vermicomposting (*Eisenia fetida*) of sheep manure mixed with cotton industrial wastes. *Biology and Fertility of Soils.*, 6:266-269.
- Albini C.A., Souza, H.M., Pereira, S.M. (2002) Manual Newprow de Microbiologia. Curitiba: *Microscience.*, 152.
- Albrecht, F., Lang, S., Hölbling, D. (2010) Spatial accuracy assessment of object boundaries for object-based image analysis. In Third international conference on all aspects of Geographic Object-Based Image Analysis, 29 June, Belgium.
- Alexander, M. (1999) Biodegradation and bioremediation. Ed.2. New York *Academic.*, 453.

- Amorim, E.P.R., Melo, I.S. (2002) Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora* parasítica e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. *Revista Brasileira de Fruticultura.*, 24:565-568.
- Andrade, D.S., Ataíde L.T., Souza J.R.P., Goes, K.C.G.P., Moritz, P. (2007) Morphological, physiological and plant infectivity characterization of Frankia strains isolated from Casuarina's nodules. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina., 28:597-608.
- Aquino, A.M., Almeida, D.L., Silva, V.F. (1992) Utilização de minhocas na estabilização de resíduos orgânicos: vermicompostagem. Rio de Janeiro: Embrapa – CNPDS, (1992) p.12 (Comunicado Técnico, 8). Longo, A. D. Minhoca: de fertilizadora do solo a fonte alimentar. Ed.4. São Paulo: Ícone., 79.
- Aquino, A.M., Almeida D.L., Guerra, D.L.J.G.M., De-Polli, H. (2005) *Pesq. Agropec. Bras.*, 11:40.
- Arshad, M., Frankenberger, W.T (1991) Microbiol production of plant hormones. In: Keister, D. L.; Cregan, P. B. (Eds.). *The rhizosphere and plant growth*. Dordrecht: *Kluwer Academic.*, 327-334.
- Asghar, H.N., Zahir, Z.A., Arshad, M., khaliq, A (2002). Relationship Between *in vitro* Production of Auxins by Rhizobacteria and their Growth Promoting Activities in *Brassica juncea* I, *Biol. Fert. Soils.*, 35:231-237.
- Ash, C., Priest, F.G., Collins, M.D. (1993) Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *App. Environ. Microbiol.*, 19:253-260.
- Baldani, J.I., Caruso, L., Baldani, V.L.D., Goi, S.R., Dobereiner, J. (1997) Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology & Biochemistry*, Oxford., 29:911-922.

- Baldani, J.I., Reis, V.R.S., Texeira, K.R.S., Baldani, V.L.D. (2002) Potencial Biotecnológico de bactérias diazotróficas associativas e endofíticas. In: Serafine, L.A., Barros, N.M., Azevedo, J.L. (org) Biotecnologia: avanços na agricultura e agroindústrias. EDUCS, Caxias do Sul., 433.
- Baldani, V.D.L. (1996) Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp no processo de colonização e infecção de plantas de arroz, ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica. *Tese de Doutorado*. UFRRJ Seropédica, RJ.
- Baldotto, L.E.B., Baldotto, M.A., Giro, V.B., Canellas, L.P., Olivares, F.L., Bressan-Smith, R. (2009) Desempenho do abacaxizeiro 'Vitória' em resposta à aplicação de ácidos húmicos durante a aclimação. *Revista Brasileira de Ciência do Solo.*, 33:979-990.
- Baldotto, L.E.B., Baldotto, M.A., Olivares, F.L., Viana A.P., Smith, R.B. (2010) Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar Vitória durante a aclimatização. Viçosa. *Revista Brasileira de Ciência do Solo.*, 34.
- Balota, E.L., Hungria, M., Colozzi, F. (1998) A biologia do solo, EMBRAPA: Brasília.
- Barraquio, W.L., Ladha, J. K., Watanabe, I. (1983) Isolation and identification of N<sub>2</sub>-fixing *Pseudomonas* associated with wetland rice. *Can. J. Microbiol.*, 29: 867-873.
- Bashan, Y., Holguin, G. (1997) *Azospirillum*-Plant Relationships: Environmental and Physiological Advances (1990-1996). *can. j. microbiol.* 43:103-121.
- Batista, S.B. (2010). Análise Fenotípica e Genotípica de bactérias isolada do solo da floresta nacional dos tapajós, Pará Brasil, sob Efeito de Estresse Hídrico. *Revista Uniara.*, 13.



- Bayer, E.A. & Lamed, R. (1992) The cellulose paradox: pollutant par excellence and/or a reclaimable natural resource? *Biodegradation* 3:171-188.
- Blanc, M. (1999) Thermophilic bacterial communities in hot compost as revealed by most probable number counts and molecular (16s rDNA) methods. *Microbiology Ecology.*, 28:141-149.
- Boddey, R.M., Döbereiner, J. (1995) Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent results and perspectives for the future research. *Fertilizers Research.*, 42:241-250.
- Boddey, R.M., Peoples, M.B., Palmer, B., Dart, P.J. (2000) Use of the <sup>15</sup>N natural abundance technique to quantify biological nitrogen fixation by woody perennials. *Nutr. Cycl. Agroecosys.*, 57:235-270.
- Boddey, R.M., Polidoro, J.C., Resende, A.S., Alves, B.J.R., Urquiaga, S. (2001) Use of <sup>15</sup>N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N<sub>2</sub> fixation to sugar cane and other grasses. *Australian Journal of Agricultural Research.*, 28:889-895.
- Broquedis, M., Bouard, J. (1989) L'acide abscissique dans différents aspects de la physiologie de la Vigne. *Connaissance de la Vigne et du Vin - Aspects Actuels de la Viticulture*, n. Hors Série., 89-94.
- 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. *Bioresour Technol.*, 110:390-5.
- Cadete, L.L. (2009). Potencial promoção de crescimento vegetal por bactérias associadas ao feijão caupi (*Vigna unguiculata*).
- Canellas, L.P., Façanha, A.O., Olivares, F.L., Façanha, A. R. (2002) Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root

- emergence, and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity in maize roots. *Plant Physiology*, 130:1951-1957.
- Canellas, L.C., Santos, G.A (2005). Humosfera: Tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas. Campos dos Goytacazes., 309.
- Canellas, L.P., Zandonadi, D.B., Olivares, F.L., Façanha, A. R. (2006) Efeitos fisiológicos de substâncias húmicas - o estímulo às H<sup>+</sup>-ATPases. In: Manlio Silvestre Fernandes. (Org.). Nutrição Mineral de Plantas. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo.,175-200.
- Capitani, G., Hohenester, E., Feng, L., Storici, P., Kirsch, J.F., Jansonius, J.N. (1999) Structure of 1-aminocyclopropane- 1-carboxylate synthase, a key enzyme in the biosynthesis of the plant hormone ethylene. *Journal of Molecular Biology*., 294:745-756.
- Castro, P.R.C., Kluge, R.A., Peres, L.E.P. (2005) Manual de fisiologia vegetal: teoria e prática. Piracicaba: Agronômica Ceres., 650.
- Cattelan, A.J. (1999) Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal. Londrina: Embrapa.
- Cavalcante, V.A., Döbereiner, J.A. (1988) New acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil*., 108:23-31.
- Chabot, R., Antoun, H., Cescas, M.P. (1996) Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar. phaseoli. *Plant and Soil*., 184:311-321.
- Chagas Junior, A.F. (2007) Características agronômicas e ecológicas de rizóbios isolados de solos ácidos e de baixa fertilidade da Amazônia. 158p. Tese de Doutorado em Biotecnologia para Agrofloresta. Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

- Chanway, C.P. (1997) Inoculation of tree roots with plant growth promoting soil bacteria: an emerging technology for reforestation. *Rev. Forest. Sci., Bethesda.*, 43:99-112.
- Chen, Y., Aviad, T. (1990) Effects of humic substances on plant growth. In: Maccarthy, P., Capp, C.E., Malcolm, R.L., Bloom, P.R., eds. Humic substances in soil and crop sciences: selected readings. Madison, American Society of America., 161-186.
- Compagnoni, L., Putzolu, G. (1985) Cría moderna de las lombrices y utilización rentable del humus. Barcelona: Editora de Vecchi., 127.
- Conceição, P.M., Vieira, H.D., Canellas, L.P., Júnior, R.B.M., Olivares, F.L. (2008) Recobrimento de sementes de milho com ácidos húmicos e bactérias diazotróficas endofíticas. *Notas Científicas. Pesquisa Agropecuária Brasileira.*, 43.
- Conn, K.L., Nowak, J., Lazarovits, G.A. (1997) Gnotobiotic Bioassay for Studying Interactions between Potatoes and Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *Canadian Journal of Microbiology.*, 43:801-808.
- Cunningham, J.E., Kuiack, C. (1992) Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58:1451-1458.
- Datta, M., Banik, S., Gupta, R.K. (1982) Studies on the efficacy of a phytohormone producing phosphate solubilizing *Bacillus firmus* in augmenting paddy yield in acid soils of Nagaland. *Plant Soil.*, 69:365-373.
- Davies, P.J. (1995). The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence, and Functions. In: Davies, P. J. (Ed). Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Estados Unidos, *Kluwer Academic Publishers.*, 1-12.

- Dees, P.M., Ghiorse, W.C. (2001) Microbial diversity in hot synthetic compost as revealed by PCR-amplified Rrna sequences from cultivated isolated and extracted DNA. *Microbiology Ecology.*, 35:207-216.
- Delfine, S., Tognetti, R., Desiderio, E., Alvino, A. (2005) Effects of foliar application of N and humic acids on growth and yield of durum wheat. *Agronomy Sustainable Development.*, 25:183-191.
- Dell'agnola, G., Nardi, S. (1987) On overview of earthworm activity in the soil. In: Bonvicini Pagliai A.M., Omodeo P. (Eds.), On earthworms selected symposia and monographs. Part 2. Mucchi Editore, Modena, Italy., 103-112.
- Demason, D.A. (2005) Auxin-cytokinin and auxin-gibberellin interactions during morphogenesis of the compound leaves of pea (*Pisum sativum*). *Planta.*, 32:1432-2048.
- Dey, R., Pal, K.K., Bhatt, D.M., Chauhan, S.M. (2004) Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea L.*) by application of plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological Research.*, 159:371-394.
- Dileep, C., Kumar, B.S.D., Dube, H.C. (1998) Promotion of plant growth and yield by two rhizoplane fluorescent pseudomonas. *Indian-Journal-of-Experimental-Biology.*, 36:399-402.
- Do Nascimento., Adelina, M. (2005). Química e Meio Ambiente: Reciclagem de lixo e química verde: papel, vidro, pet, metal, orgânico. Secretaria de Educação: Curso Formação Continuada Ciências da Natureza, Matemática e suas Tecnologias.
- Döbbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Okon, Y., Vanderleyden, J. (2002) Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. *Biol. Fertil. Soils* 36:284–297.

- Döbereiner, J. (1961) Nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* Derx in the rhizosphere of sugarcane. *Plant and Soil.*, 15:211-216.
- Döbereiner, J., Baldani, V.L.D., Reis, V.M. (1995a) Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops In: Fendrik, I., Del Gallo, M.; Vanderleyden, J.; De Zamaroczy, M. (Ed.). *Azospirillum* VI and related microorganisms. Berlin: Springer-Verlag., 3 -14.
- Döbereiner, J., Baldani, V.L.D., Baldani, J.I. (1995b) Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas. *Seropédica, Embrapa Agrobiologia.*, 66.
- Duff, R.B., Webley, D.M., Scoott, R.O (1963) Solubilization of minerals and related materials by 2-ketogluconic acid- producing bacteria. *Soil Sci.*, 95:105-114.
- During, H., Alleweldt, G. (1973) Der Jahresgang der Abscisinsäure in vegetativen Organen von Reben. *Vitis.*, 12:26-32.
- During, H. (1974) Abscisinsäure in reifenden Weinbeeren. *Vitis.*, 13:112-119.
- During, H. (1992) Gas exchange of grapevines leaves as affected by soil factors. In: *Simposium International Sur La Physiologie De La Vigne*, 4., San Michel All'adige. *Comptes Rendus. San Michell All'adige: [s.n.]*, 295-298.
- Eklof, S., Astot, C., Sitbon, F., Moritz, T., Olsson, O., Sandberg, G. (2000) Transgenic tobacco plants co-expressing *Agrobacterium* *iaa* and *ipt* genes have wild-type hormone levels but display both auxin- and cytokinin-overproducing phenotypes. *Plant Journal.*, 23:279-284.
- Embrapa, (1999). *Sistema Brasileiro de classificação de solos*. Brasília., 412.
- Façanha, A.R., Façanha, A.L.O., Olivares, F.L., Guridi, F., Santos, G.A., Velloso, A.C.X., Rumjanek, V.M., Brasil, F., Schripsema, J., Braz, R., Oliveira, M.A., Canellas, L.P. (2002) Bioatividade de ácidos húmicos: efeitos sobre o

desenvolvimento radicular e sobre as bombas de prótons da membrana plasmática. *Pesquisa Agropecuária Brasileira.*, 37:1301-1310.

Ferrara, G., Brunetti, G. (2008) Influence of foliar applications of humic acids on yield and fruit quality of table grape cv. Itália. *Journal International des Science du la Vigne et du Vin.*, 42:79-87.

Flaig, W. (1960) Comparative chemical investigations on natural humic compounds and their model substances. *Sci. Proc. Royal Dublin Society.*, 4:149-162.

Franco, A.A., Döbereiner, J. (1994) A biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. *Summa Phytopathologica.*, 20:68-74.

Freitas, S.S. (1989) Desenvolvimento de plântulas de café pela inoculação de *Pseudomonas sp.* *Revista Brasileira de Ciência do Solo.*, 13:31-34.

Fukuda, H. (1996) Xylogenesis: Initiation, progression and cell death. *Plant Physiology Plant Mol Biol*, 47:299-325.

Gerke, J. (1992) Phosphate Aluminum, and Iron in the Soil Solution of Three Different Soils in Relation to Varying Concentration of Citric Acid. *Z. pflanzenernahr. Bodenk.*, 55:339-343.

Gliessman, S.R. (2001) Agroecology: Ecological process in sustainable agriculture. Boca Raton: *Lewis Publishers.*, 357.

Gowing, D.J.G., Jones, H.G., Davies, W.J. (1993) Xylem-transported abscisic acid: the relative importance of its mass and its concentration in the control of stomatal aperture. *Plant, Cell and Environment.*, 16:453-459.

Guimarães, S.L., Baldani, J.I., Baldani, V.L.D., Jacob-Neto, J. (2007) Adição de molibdênio ao inoculante turfoso com bactérias diazotróficas usado em duas cultivares de arroz irrigado. *Pesq. agropec. bras.*, 42(3):393-398.

- Haahtela, K., Wartioraara, T., Sundmann, V., Skujins, J. (1981) Root-associated  $N_2$  fixation (acetylene reduction) by *Enterobacteriaceae* and *Azospirillum* strains in cold climate spodosols. *Appl. Environ. Microbiol.*, 4:203-206.
- Hager, A., Menzel, H., Krauss, A. (1971) Versuche und Hypothese zur Primaerwirkung des Auxins Beim Streckungswachstum. *Planta.*, 100:47–75.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W.F., KLoepper, J.W. (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 43:895-914.
- Hanssen, A. (2001). Microbial characterization during composting of municipal solid waste. *Bioresource technology.*, 80:217-225.
- Harris, G.D., Platt, W.L., Price, B.C. (1990) Vermicomposting in a community. *Biocycle*, New York, 4(1):48-51.
- Hartmann, W.M. (1983) Localization of Sound in Rooms-The Effect of Visual Fixation., 139-142.
- Hofte, M., Boelens, J., Verstraete, W. (1991) Seed protection and promotion of seedling emergence by the plant growth beneficial *Pseudomonas* strains 7NSK2 and ANPIS. *Soil Biology and Biochemistry.*, 23(5):407-410.
- Huguet, V., Batzli, J.M., Zimpfer, J.F., Normand, P., Dawson, J.O.; Fernandez, M. P. (2001) Diversity and specificity of Frankia strains in nodules of sympatric *Myrica gale*, *Alnus incana*, and *Shepherdia Canadensis* determined by rrs gene polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology*, New York, 67(5):2116-2122.
- Hungria, M., Andrade, D.S., Chueire, L.A.O., Probanza, A., Gutierrez-Manero, F.J., Megias, M. (2000) Isolation and characterization of new efficient competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biology & Biochemistry.*, 32:515-528.

- Inui, N. (2009) Isolamento e identificação de bactérias solubilizadoras de fósforo e produtoras de auxinas em solo com cana-de-açúcar. *Tese de Mestrado*. Universidade Estadual Paulista Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Câmpus de Jaboticabal. SP.
- Ishii, K., Takii, S. (2003) Comparison of microbial communities in four different composting processes as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Journal of applied Microbiology.*, 95:109-119.
- Jesus, J.A., Chagas, J.G., Aguiar, K.P., Aguiar, N.O., Canellas, L.P., Olivares, F.L. (2011). Biodegradação da estrutura supramolecular de ácidos húmicos por isolados de actinomicetos. CD-ROM dos *Anais do IX Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas. Matéria Orgânica Natural e Substâncias: Dos avanços das técnicas de caracterização ao seqüestro de C*. Aracajú. SE. Brasil.
- Jiménez, E.I., García, V.P. (1989) Instituto de Productos Naturales y Agrobiología de Canarias CSIC, Avda. Francisco Sanchez 3, 38206 La Laguna, Tenerife, Canary Islands, Spain.
- Jimenez, M.B. (2001) Endophytic bacteria in rice seeds inhibit early colonization of roots by *Azospirillum brasiliense*. *Soil Biol. Biochem.*, 33:167-172.
- Júnior, C.R.C., Silva, L.D.A., Oliveira, A.V., Sousa, C.A., Coutinho, A.E., Costa, A. L., Junior, M.A.L. (1999) Isolamento e caracterização morfológica de bactérias em nódulos de leguminosas forrageiras.
- Kang, S.C., Ha, C.G., Lee, T. G., Maheshwari, D.K. (2002) Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a soil- inhabiting fungus *Fomitopsis* sp. PS 102. *Current Science.*, 439-442.
- Kennedy, A.C. (1999) Bacterial diversity in agro ecosystems. *Agriculture. Ecosystems and Environment*, Amsterdam, 74(1):65-76.



- Khalid, A., Arshad, M., Zahir, Z. A. (2004) Screening Plant Growth-Promoting Rhizobacteria for Improving Growth and Yield of Wheat. *J. Appl. Microbiol.* 96:473-480.
- Khan, M.A., Ansari, R., Ali, H., Gul, B., Nielsen, B. L. (2009) *Panicum turgidum*: A Sustainable Feed Alternative for Cattle in Saline Areas. *Agric. Ecosys. Environ.* 129:542-546.
- Kiehl, E. J. (1998) Manual de Compostagem: maturação e qualidade do composto. Piracicaba.
- Kloepper, J.W., Quadt-Hallmann., Mahaffee, W.F., Hallmann, J. (1997) Recent studies on the microbial ecology of bacterial endophytes in plants. In: Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, 26, Rio de Janeiro, 1997. Resumos. Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo.
- Kloepper, J.W., Sher, F.M., Laliberte, M., Tipping, B. (1986) Emergence promoting rhizobacteria: description and implications for agriculture. Swinburn, T.R. (ed.) In: Iron, siderophores and plant disease. New York, Plenum Press., 155-164.
- Kononova, M.M. (1966) Soil organic matter. Pergamon Press, Oxford, 1966, p.75-156. Apud Ré Poppi, N. Estudos dos ácidos húmicos e fúlvicos extraídos de solos, por métodos químicos e espectroscópicos - separação e identificação de seus produtos de oxidação por CG/EM. Tese de Mestrado, Instituto de Química e Física de São Carlos, São Carlos.
- Krikorian, A.D. (1991) Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In: Roca, W.M.; Mroginsky, L.A. (Eds.). Cultivo de tejidos em la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Cali: CIAT., 41-77.
- Ladha, J.K., Barraquio, W.L., Watanabe, I. (1983) Isolation and identification of nitrogen-fixing *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella planticola* associated with rice plants. *Can. J. Microbiol.*, 29:1301-1308.

- Lazarovits, G., Nowak, J. (1997) Rhizobacteria for improvement of plant growth and establishment. *HortScience.*, 32,(2):188-192.
- Lebuhn, M., Hartmann, A. (1993) Method for the determination of indole-3-acetic acid and related compounds of L-tryptohan catabolism in soils. *Journal of Chromatography.*, 629:255-266.
- Louw, H.A. & Webley, D.M. (1959) A study of soil bacteria dissolving certain mineral phosphate fertilizers and related compounds. *J. Appl. Bact.*, 22:227-233.
- Macmillan, J. Pryce, R.J. (1973) Phitochemistry, Ed. Miller, P., Van Nostrand-Reinhold, New Jersey., 3:283.
- Macrae, A., Lucon, C.M.M., Rimmer, D.L., O`Donnell, A.G. (2001) Sampling DNA from the rhizosphere of *Brassica napus* to investigate rhizobacterial community structure. *Plant and soil.*, 223:233-230.
- Madhaiyan, M., Saravanan, V.S., Jovi, D.B., Lee, H.; Thenmozhi, R., Hari, K., Sa, T. (2004) Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in tropical and subtropical plants of Western Ghats, India. *Microbiology Res.*, 159(3):233-43.
- Malonek, S., Bomke, C., Bornberg-Bauer, E., Rojas, M.C., Hedden, P., Hopkins, P., Tudzynski, B. (2005) Distribution of gibberellin biosynthetic genes and gibberellins production in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Phytochemistry.*, 66:1296-1311.
- Marchioro, V.S., Franco, F.D.A., Nora, T.D. (2009) Nova Cultivar de trigo de ampla adaptação. *Revista Pesquisa Agorpecuária Brasileira.*, 44(4):424-426.
- Mariano, R.L.R. (2004) Importância de Bactérias Promotoras de Crescimento e de Biocontrole de Doenças de Plantas para uma Agricultura Sustentável. Recife: Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, 1:89-111.

- Marques Júnior, R.B., Canellas, L.P., Da 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.
- Martinez, A. A. (1991) Folder sobre minhocultura. Campinas: CAT.
- Masciandaro, G., Ceccanti, B., Garcia, C. (1999) Soil agroecological management: fertirrigation and vermicompost treatments. *Biores. Technol.*, 59:199-206.
- Maza L.M., Pezzlo M.T., Baron E.J. (2001) Atlas de Diagnóstico Microbiológico. Porto Alegre: Artmed., 216.
- Mcclung, C.R., Patriquin, D.G. (1980) Isolation of a nitrogen fixing *Campylobacter* species from the roots of *Spartina alterniflora* Loisel. *Can. J. Microbiol.*, 26: 881- 886.
- Mendonça, H.L., Romeiro, R.S., Garcia, F.A.O. (2003) Rizobactérias como promotoras de crescimento em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). Anais do Congresso Paulista de Fitopatologia, XXVI. Araras, São Paulo: Summa Phytopathologica.
- Mikanová, O., Kubat, J. (2002) Phosphorus solubilization from hardly soluble phosphates by soil microflora. *Rostlinná Výbora.*, 40:833-844.
- Monciardini, P. (2002) New PCR primers for the selective amplification of 16S rDNA from different groups of actinomycetes. *FEMS. Microbioly Ecology.*, 1414:1-11.
- Muscolo, A., Nardi, S. (1997) Auxin or auxin-like activity of humic matter. In: Drozd, J., Gonet, S.S., Senesi, N.E., Weber, J., eds. The role of humic substances in the ecosystems and environmental protection. Wroclaw, Polish *Society of Humic Substances.*, 987-992.

- Muscolo, A., Bovalo, F., Gionfriddo, F., Nardi, S. (1999) Earthworm humic matter produces auxin-like effects on *Daucus carota* cell growth and nitrate metabolism. *Soil Biol. Biochem.*, 31:1303-1311.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Vianello, A. (1996) Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biology & Biochemistry.*, 34:1527-1536.
- Nahas, E. (1991) Ciclo do fósforo: transformações microbianas. Jaboticabal- SP: FUNEP., 67.
- Nahas, E., Centurion, J.F., Assis, L.C. (1994) Efeito das características químicas dos solos sobre os micro-organismos solubilizadores de fosfato e produtores de fosfatases. *Revista Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa.*, 18:49-53.
- Nautiyal, C.S. (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters.*, 110:265-270.
- Nogueira, E.B.S. & Cavalcanti, M.A.Q. (1996) Cellulolytic Fungi Isolated from Processed Oats. *Revista de Microbiologia.*, 27:7-9.
- Nordstrom, A., Tarkowski, P., Tarkowska, D., Norbaek, R., Astot, C., Okon, Y., Landera-Gonzalez, C.A. (2004) Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biology & Biochemistry.*, 26:1591-1601.
- Okon, Y., Kapulnik, Y. (1986) Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots. *Plant and Soil.*, 30:1-3.
- Olivares, F.L., Reis, V.M., Façanha, A.R. (2002) The role of endophytic diazotrops insugarcane root morphogenesis and development. In: Finam, T.M., O' Brian, M.R., Layzell, D.B., Vessey, J.K. and Newton, W. (Eds), *Nitrogen Fixation: Global perspectives*, Oxon: CAB International., 476-477.

- Oliveira, A.L.M., Urquiaga, S., Döbereiner, J., Baldani, J.I. (2002) The effect of inoculating endophytic N<sub>2</sub>-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant and Soil*, 242:205-215.
- Ouhdouch, Y., Barakate, M., Finance, C. (2001) Actinomycetes of moroccan habitats: isolation and screening for antifungal activities. *European journal soil biology*, 37:69-74.
- Park, M., Kim, C., Yang, J., Lee, H., Shin, W., Kim, S., Sa, T. (2005) Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiology Research*, 160(2):127-133.
- Parke, J.L., Rand, R.E., Joy, A.E., King, E.B. (1991) Biological control of Pythium damping-off and Aphanomyces root rot of peas by application of Pseudomonas cepacia or P. fluorescens to seed. *Plant Disease*, 75:987-992.
- Patten, C.L., Glick, B.R. (1996) Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*, 42(3):207-220.
- Pazos, M., Hernández, A. (2001) Evaluación de Cepas Nativas del Género Azopirillum y su Interacción con el Cultivo del Arroz. *Cultivos Tropicales*, 22(4):25-28.
- Pelczar Junior, M.J., Chan, E.C.S., Krieg, N.R. (1996) Exigências nutricionais e o meio microbiológico. In: Trad. S. F. Yamada, T. U., Nakamura, T.C.R.M., Oliveira, B.P., Dias Filho, L.B., Garcia *Microbiologia: Conceitos e Aplicações*. 2 ed. São Paulo. Makron books. (Tradução de: Microbiology: concepts and applications), 146-165.
- Pereira Neto, J. T. (1987) Lixo Urbano no Brasil: Descaso, Poluição Irreversível e Mortalidade Infantil. Ação Ambiental. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal de Viçosa, MG.

- Perin, L. (2002) Ecologia e diversidade de *Gluconacetobacter diazotrophicus* associada à cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*). *Dissertação de Mestrado*. UFRRJ, Seropédica, RJ.
- Perin L., Silva M.F., Ferreira J.S., Canuto E.L., Medeiros A.F.A., Olivares F. L., Reis V.M. (2003) Avaliação da Capacidade de Estabelecimento Endofítico de Estirpes de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* em milho e arroz. *Agronomia.*, 37(2):47–53.
- Perin, L. (2007) Estudo da comunidade de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* em associação com cana-de-açúcar e descrição de *Burkholderia silvatlantica*. *Tese de Doutorado*. UFRRJ, Seropédica, RJ.
- Pillay, V.J., Nowak, J. (1997) Inoculum density, temperature, and genotype effects on in vitro growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium. *Canadian Journal of Microbiology.*, 43: 354-361.
- Pleban, S., Ingel, F., Chet, I. (1995) Control of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfii* in the greenhouse using endophytic *Bacillus sp.* *Europ. J. Plant Pathol.*, 101:665-672.
- Polidoro, J.C. (2001) O molibdênio na nutrição nitrogenada e na fixação biológica de nitrogênio atmosférico associada à cultura de cana-de-açúcar. *Tese de Doutorado*. UFRRJ, Seropédica, RJ.
- Quaggiotti, S., Rupert, B., Pizzeghello, D., Francioso, O., Tugnoli, V., Nardi, S. (2004) Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Experimental Botany.*, 55:803-813.
- Radwan, T.E.E., Mohamed, Z.K., Reis, V.M. (2005) Aeração e adição de sais na produção de ácido indol acético por bactérias diazotróficas. *Pesq. Agropec. Bras.*, 40:997-1004.

- Raij, B. (1991). Fertilidade do solo e adubação. São Paulo, Ceres., 343.
- Reis Júnior, F.B., Reis, V.M., Urquiaga, S., Dobereiner, J. (2000) Influence of nitrogen fertilisation on the population of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum* spp. and *Acetobacter diazotrophicus* in sugar cane (*Saccharum* spp.). *Plant and Soil.*, 219:153-159.
- Reyes, I., Bernier, L., Simard, R.R., Antoun, H. (1999).. Effect of nitrogen source on the solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. *FEMS Microbiology Ecology.*, 28:281-290.
- Resende, A.S. (2000) A Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) como suporte da fertilidade nitrogenada dos solos e da produtividade da cultura de cana-de-açúcar: uso de adubos verdes. *Dissertação de Mestrado*. UFRRJ, Seropédica, RJ.
- Roberts, L.W. (1988) Hormonal Aspects of Vascular Differentiation. In: Roberts, L. W., Gahan, P. B., Aloni, R. *Vascular Differentiation and Plant Growth Regulators*. Estados Unidos, Springer-Verlag. 22-38.
- Rodda, M.R.C., Canellas, L.P., Façanha, A.R., Zandonadi, D.B., Guerra, J.G.M., Almeida, D.L., Santos, G.A. (2006a) Estímulo no crescimento e na hidrólise de ATP em raízes de alface tratadas com humatos de vermicomposto. I - Efeito da concentração. *R. Bras. Ci. Solo*, 30:649-656.
- Rodda, M.R.C., Canellas, L.P., Façanha, A.R., Zandonadi, D.B., Guerra, J.G.M., Almeida, D.L., Santos, G.A. (2006b) Estímulo no crescimento e na hidrólise de ATP em raízes de alface tratadas com humatos de vermicomposto. II - efeito da fonte de vermicomposto. *R. Bras. Ci. Solo*, 30:657-664.
- Rodriguez, H., Fraga, R. (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances.*, 17:319-339.

- Romeiro, R.S. (2007) *Controle biológico de doenças de plantas: Fundamentos*. Viçosa: Editora UFV. 269.
- Rosseló-Mora, R., Amann, R. (2001) The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Review*, 25(1):39-67.
- Ruegger, M.J.S., Tauk-Tornisielo S.M. (2004) Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. *Revista Brasil. Bot.*, 27(2):205-211.
- Saravanan, V.S., Subramoniam, S.R., RAJ, S.A. (2003) Assessing in vitro solubilization potential of different zinc solubilizing bacterial (zsb) isolates. *Braz. J. Microbiol.*, 34:121-125.
- Sarwar, M., Kremer, R.J. (1995) Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. *Plant Soil*, 172:261-269.
- Seldin, L., Van Elsas, J.D., Penido, E.G.C. (1984) *Bacillus azotofixans* sp. nov. a Nitrogen-Fixing Species from Brazilian Soils and Grass Roots. *International Journal of Systematic Bacteriology.*, 34(4):451-456.
- Sidhu, M.S., Heir, E., Leegaard, T., Wiger, K., Holck, A. (2002) Frequency of Disinfectant Resistance Genes and Genetic Linkage with Beta-Lactamase Transposon TN552 Among Clinical Staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother.*, 46:2797-803.
- Silva Filho G.N., Vidor C. (2000) Solubilização de fostatos por micro-organismos na presença de fontes de carbono. *R. Bras. Ci. Solo*, 24:311-319.
- Simpson, F.B., Burris, R.H. (1984) A nitrogen pressure of 50 atmospheres does not prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. *Science.*, 224:1095-1096.



- Siqueira, J.O., Franco, A.A. (1998) Microbiota do solo. Biotecnologia do solo. Fundamentos e perspectivas. Brasília: MEC Ministério da Educação, ABEAS, Lavras: ESAL, FAEPE, 2: 23-46.
- Schnitzer, M., Khan, S.U. (1985) Soil Organic Matter. In: Aiken, G.R.; Mcknight, D.M.; Wershaw R.L. (Eds.) *Humic Substances in Soil, Sediment and Water*. John Wiley & Sons, New York, 465.
- Skoog, F., Miller, C.O. (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symposia of the Society for Experimental Biology.*, 54(11):118-130.
- Sladky, Z.O. (1985) Efeito de extratos de substâncias húmicas no crescimento de plantas de tomate. *Bio Plant.*, 1:142-150.
- Smalle, J., Van Der Straeten, D. (1997) Ethylene and vegetative development. *Physiologia Plantarum.*, 100:593-605.
- Solano, B.R., Barriuso, J., Gutiérrez-Mañero, F.J. (2008) Physiological and molecular mechanisms of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). In: Ahmad, I.; Pichtel, J.; Hayat, S. *Plant-Bacteria Interactions - strategies and techniques to promote plant growth*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. 41-54.
- Souchie, E.L., Campello, E.F.C., Saggin-Júnior, O.J., Silva, E.M.R. (2005) Mudanças de espécies arbóreas inoculadas com bactérias solubilizadoras de fosfato e fungos micorrízicos arbusculares. *Floresta.*, 35(2):329-334.
- Stacey, G., Burris, R.H., Evans, H.J. (1992) *Biological Nitrogen Fixation*. New York, Chapman and Hall. 943.
- Steenhoudt, O., Vanderleyden, J. (2000) *Azospirillum*, A Free-Living Nitrogen-Fixing Bacterium Closely Associated With Grasses: genetics, Biochemical and Ecological aspects. *FEMS Microbiol Rev.*, 24:487–506.

- Stein, R.L.B. (1988) Efeito de *Pseudomonas* spp. fluorescentes no controle in vitro de fungos do solo e no desenvolvimento do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife.
- Stenlid, G. (1982) Cytokinins as inhibitors of root growth. *Physiol. Plant.*, 56:500-506.
- Steveson, F.J. (1994). In: *Humus Chemistry: Genesis, Composition and Reaction*. 2<sup>a</sup> Ed., John Wiley & Sons, New York.
- Steveson, F.J. (1985). Geochemistry of soil humic substances. In: Aiken, G. R., Mcknight, D. M., Wershaw, R. L. (Eds.). *Humic Substances in Soil, Sediment and Water*, John Wiley & Sons, New York, p.13.
- Sturtz, A.V (1995) The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization. *Plant and Soil.*, 175:257-263.
- Sturz, A. V., Nowak, J. (2000) Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. *Applied Soil Ecology.*, 15:183-190.
- Symanski, C.S. (2005) Caracterização de bactérias mesófilas presentes em processo de compostagem. *Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente*. Faculdade de Agronomia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.
- Taiz, L. Zeiger, E. (2004). *Fisiologia Vegetal*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 527.
- Tardieu, F., ZhanG, J., Gowing, D.J.G. (1993) Stomatal control by [ABA] in the xylem sap and leaf water status: a test of a model for droughted or ABA field-grown maize. *Plant, Cell and Environment.*, 16:413-420.

- Tardieu, F., Davies, W.J. (1993) Integration of hydraulic and chemical signalling in the control of stomatal conductance and water status of droughted plants. *Plant, Cell and Environment.*, 16:341-349.
- Tauk, S.M. (1988) Aspectos da microbiota fúngica no solo de cultura de milho (*Zea mays*), tratado com vinhaça no município de Rio Claro – SP. *Revista de Microbiologia.*, 19(3):282-289.
- Taulé, C., Mareque, C., Barlocco, C., Hackembruch, F., Reis V.M., Sicardi M., Battistoni, F. (2011) The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. *Plant and Soil*, DOI: 10.1007/s11104-011-1023-4.
- Tejada, M., Gonzalez, J.L. (2004) Effect of foliar application of a byproduct of the two-step olive oil mill process on rice yield. *European Journal of Agronomy.*, 21:31-40.
- Tomati, U., Galli, E., Pasetti, L., Volterra, E. (1995) Bioremediation of olive-mill wastewaters by composting. *Waste Management and Research.*, 13:509-518.
- Trautmann, N., Olynciw, E. (2005) Compost Microorganisms. In: Cornell Composting, Science & Engineering. *Disponível em:* <http://compost.css.cornell.edu/microorg.html>.
- Urquiaga S., Resende A., Alves B.J.R., Boddey R.M., Döbereiner, J. (1997) Fixação biológica de nitrogênio na cultura de cana-de-açúcar: Perspectivas. *Workshop sobre avaliação e manejo dos recursos naturais em áreas de exploração da cana-de-açúcar*. Aracajú, SE, EMBRAPA-CPATC, 11 a 13 de novembro, 126.
- Urquiaga, S., Cruz, K.H.S., Boddey, R.M. (1992) Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. *Soil Science and Society of America Journal*, 56:105-114.

- Utkhede, R.S., Lévesque, C.A., Dinh D. (2000) *Pythium aphanidermatum* root rot in hidroponically grown lettuce and the effect of chemical and biological agents on its control. *Canadian Journal of Plant Pathology.*, 22:138-144.
- Vassileva, M., Azcon, R., Barea, J.M., Vassilev, N. (1999) Effect of encapsulated cells of *Enterobacter* sp on plant growth and phosphate uptake. *Bioresource Technology.*, 67(3): 229-232.
- Vassilev, N., Franco, I., Vassileva, M., Azcon, R. (1996) Improved Plant Growth With Rock Phosphate Solubilized by *Aspergillus niger* Grown on Sugar-Beet Waste. *Bioresouice Tecnology.*, 55:237-241.
- Vaughan, D., Malcolm, R.E. (1985) Influence of humic substances on growth and physiological process. In: Vaughan, D., Malcolm, R.E. (Ed.). *Soil organic matter and biological activity*. Dordrecht: Kluwer Academic, 37-75.
- Verma, S.C., Ladha, J.K., Tripathi, A.K. (2001) Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *J. Biotechnol.*, 91:127-141.
- Vessey, J.K. (2003) Plant growth-promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil.*, 255:571-586.
- Wachinger, G. (1989). Identification of mycelium-associated cellulose from *Streptomyces reticuli*. *Applied and environmental microbiology*, Washington, 55(10):2653-265.
- Wahid, O.A.A., Mehana, T A. (2000) Impact of addition of different carbon and nitrogen sources on solubilization of rock by phosphate-solubilizing micro-organisms. *Indian J. Agric. Sci.*, 68(6):221-227.
- Wenhua, T., Hetong, Y. (1997) Research and application of biocontrol of plant diseases and PGPR in China. *Anais 40 International Workshop On Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*. Sapporo, Japan.

- Wenzel, C.L., Ashford, A.E., Summerell, B.A. (1994) Phosphate-solubilizing bacteria associated with proteoid roots of seedlings of waratah. *Telopea speciosissima* (Sm.). *R. Br. New Phytol.*, 128:487-496.
- Weyers, J.D.B., Paterson, N.W. (2001) Plant hormones and the control of physiological processes. *New Phytol.*, 152:375–407.
- Xavier, R.P. (2002) Adubação verde em cana-de-açúcar: influência na nutrição nitrogenada e na decomposição dos resíduos da colheita. *Dissertação de Mestrado*. UFRRJ, Seropédica, RJ.
- Zakharova, E., Shcherbakov, A., Brudnik, V., Skripko, N., Bulkin, N., Ignatov, V. (1999) Biosynthesis of Indole-3-Acetic Acid in *Azospirillum brasilense*. Insights from Quantum Chemistry. *Eur. J. Biochem.*, 259:572-576.
- Zakharova, E.A., Scherbakov, A.A., Brudnik, A.V., Skripko, N.G., Bulkin, N.S., Ignatoy, V.V. (2003) Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*. *European Journal Biochemistry.*, 259:572-576.
- Zandonadi, D.B., Canellas, L.P., Façanha, A.R. (2007) Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H<sup>+</sup> pumps activation. *Planta.*, 225:1583-1595.
- Zucconi, F., Bertoldi, M. (1987) Composts specifications for the production and characterization of composts from municipal solid waste. In: *Compost: production, quality and use*. M de Bertoldi, M.P. Ferranti, P.L'Hermite, F.Zucconi eds. Elsevier Applied Science, London, 30-50.