



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA**



YAMINA COENTRO MONTALDO

Bioprospecção e isolamento de bactérias associadas à cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) com características para a promoção de crescimento vegetal

Maceió - Al
2016



REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
RENORBIO

YAMINA COENTRO MONTALDO

Bioprospecção e isolamento de bactérias associadas à cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) com características para a promoção de crescimento vegetal

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (Renorbio), Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia em Agropecuária.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Ramalho Neto

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^a Tania Marta Carvalho dos Santos

Maceió - Al
2016

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

M762b Montaldo, Yamina Coentro.
Bioprospecção e isolamento bactérias associadas à cana-de-açúcar
(*Saccharum officinarum L.*) com características para a promoção de crescimento
vegetal / Yamina Coentro Montaldo. – 2016.
101 f. : il. tabs., graf.

Orientador: Eduardo Ramalho Neto.

Coorientadora: Tania Marta Carvalho dos Santos.

Tese (doutorado na Rede Nordeste de Biotecnologia) – Universidade
Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. RENORBIO.
Maceió, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Bactéria do solo. 2. Fosfato inorgânico. 3. Expolissacarídeos.
4. Inoculantes. I. Título.

CDU: 631.461


YAMINA COENTRO MONTALDO

"Bioprespeção e isolamento de bactérias associadas à cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) com características para a promoção de crescimento vegetal".

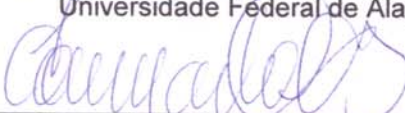
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Alagoas, Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Saúde.

Aprovada em: 29/01/2015.

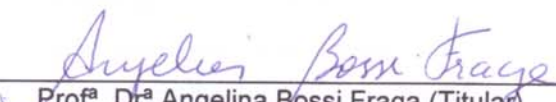
BANCA EXAMINADORA




Prof. Dr. Eduardo Ramalho Neto, (Orientador – Presidente),
Universidade Federal de Alagoas - UFAL




Prof^a. Dr^a. Tania Marta Carvalho dos Santos (Co-orientadora),
Universidade Federal de Alagoas - UFAL



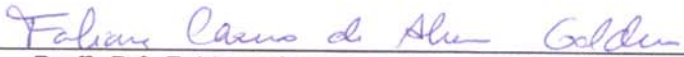
Prof^a. Dr^a Angelina Bossi Fraga (Titular)
Universidade Federal de Alagoas - UFAL



Prof Prof. Dr. Guilherme Benjamim Brandão Pitta (Titular)
Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas- UNCISAL



Prof^a. Dr^a. Ruth Rufino do Nascimento (Titular)
Universidade Federal de Alagoas – UFAL



Prof^a. Dr^a. Fabiane Caxico de Abreu Galdino (Titular)
Universidade Federal de Alagoas - UFAL

AGRADECIMENTOS

Ao longo destes anos tive a oportunidade de conhecer pessoas maravilhosas e de me deparar com situações inusitadas e únicas. Tenho muito a agradecer, e a muitos, contudo me faltam as palavras certas. O que me consola é que sei que no fundo de suas almas, eles sabem do meu amor e agradecimento.

À Deus, pela vida. Agradeço a minha família em nome do meu caríssimo pai, Wilmor Siemond Montaldo e saudosa e amorosa mãe, Silvana Coentro Montaldo (*in memoriam*), a minha linda e paciente companheira, Ana Karina de Aguiar Calheiros, aos meus irmãos maravilhosos, Munir, Jamil e Lilás Coentro Montaldo e aos amores da minha vida, minhas sobrinhas, Yohane e Letícia Montaldo, e aos recém-chegados Davi e Daniel Calheiros. Gostaria de agradecer também aos meus amigos pessoais e profissionais, as meninas: Sybelle Georgia Mesquita da Silva, Beatriz Paes Duarte Brandão, Micheline thais dos Santos, Érica Lívea ferreira Guedes, Rosana Barbosa dos Santos, Maisa Silva Nascimento e Mayara Morais de Brito Mendes. Os meninos: João Manoel da Silva, Felipe Alexandre Tenório, Renaldo Casado Brandão Júnior, Clayton Dos Santos Silva e Adenildo Raimundo dos Santos: a todos muito obrigada!

Agradeço, por fim, mas não menos importante, aos mestres e professores que passaram em minha vida, aqui representados pelos meus orientadores Prof. Dr. Cícero Eduardo Ramalho Neto e Prof^a Dr^a. Tania Marta Carvalho dos Santos, aos professores Prof. Dr. Cícero Cerqueira Cavalcanti Neto, Prof. Msc. José Ubaldo Lima de Oliveira e Prof. Dr. Velber Xavier Nascimento.

RESUMO

Tendo em vista a preocupação com a preservação ambiental, devido à constatação de que as atividades antrópicas podem causar profundos impactos, os trabalhos de pesquisa têm levado a uma mudança da agricultura dita convencional, que utiliza produtos agroquímicos e fertilizantes, para uma agricultura que busca formas de manejo menos nocivos ao ambiente. Objetivou-se a prospecção e o isolamento de bactérias com características para promoção de crescimento a partir do solo rizosfera de cana-de-açúcar para serem utilizados na produção de inoculantes microbianos. Foram coletadas 24 amostras de solos provenientes de usinas sucroalcooleiras do Estado de Alagoas, de onde foram retirados os isolados para qualificação e quantificação de fósforo solúvel, produção de Exopolissacarídeos (EPS) e a verificação da formação de biofilme, produção de ácido indolacético (AIA), Produção de citocininas e giberelinas, Indução de enraizamento e brotação de gemas de cana-de-açúcar. A metodologia utilizada para solubilização de fosfato foi realizada de acordo com as recomendações dos autores. Os resultados obtidos para solubilização de fosfato em meio Nbrp demonstraram que 17% apresentaram alta capacidade de solubilização de fosfato inorgânico e 67% alcançaram média capacidade. Os demais estão entre baixa e ausência de solubilização. Dos isolados testados, 75% foram capazes de crescer em meio com atividade de água reduzida 0,919 A_w , a 30°C, o aparecimento de colônias foi observado cinco dias após a inoculação. Os resultados para produção de EPS em temperatura ambiente demonstraram que 4% dos isolados pesquisados atingiram uma ótima produção, seguido de 42% que obtiveram média produção e os demais, 54%. Quanto à capacidade de produção de biofilme em meio TSB em absorbância de 540 nm, 4% dos isolados obtiveram maior frequência para formação de biofilme, 83% atingiram média produção e 13% dos isolados com baixa frequência de produção. As maiores quantidades para produção de AIA, na presença do precursor L-triptofano foi evidenciada ao final de 72 horas, apesar das diferenças significativas entre os isolados estudados, exceto o isolado sete que foi considerado elevado 51,62194 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e o isolado seis com a produção mais baixa 14,98113 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, os demais isolados foram classificados altos produtores. Dentre os isolados testados 25% foram capazes de sintetizar citocininas e 83,33% sintetizaram giberelinas comparados ao controle. Todos os isolados, comparados a testemunha, aumentaram em tamanho, sugerindo a ação de um ou dos dois hormônios em questão. Na brotação das gemas inoculadas comparados ao controle sem inoculação da variedade RB72454 de cana-de-açúcar, ao final da avaliação, na presença dos isolados 4, 16, 21 e 24, apenas 25% das gemas haviam brotado e emitido raízes, não diferindo significativamente do controle. A inoculação aumentou significativamente a velocidade de brotação para 83,33% dos isolados, sendo os melhores resultados obtidos para 7, 12, 19 e 20 (94,5, 100, 95 e 94,5% respectivamente) tanto para o número de gemas brotadas como para velocidade de emissão de brotos e raízes.

Palavras – chave: Fosfato inorgânico; exopolissacarídeo; inoculantes.

ABSTRACT

Given the concern for environmental preservation, by cause of human activities and its profound impacts, research works have led to a shift from conventional said agriculture using agrochemicals and fertilizers to agriculture that pursues ways less harmful to the environment management. The objective was to prospect and also isolate the bacteria with proper characteristics for growth benefits from the rhizosphere sugarcane soil and its subsequent use in production of microbial inoculants. As to reach this purpose, 24 soil samples from sugarcane mills in the state of Alagoas were collected and isolated for qualification and quantification of soluble phosphorus, production of exopolysaccharides (EPS), verification of biofilm formation, production of indole acetic acid (IAA), cytokinins and gibberellins production, rooting induction and sugarcane budding. The used methodology for phosphate solubilization was performed according to the recommendations of the authors referenced in the bibliography. According to the results obtained for phosphate solubilizing growth medium (Nbrip) showed that 17% had high capacity and inorganic phosphate solubilizing growth medium capacity Reached 67%. The others results stayed between low or absence of solubilization. Of the isolates tested, 75 % Were able to grow in medium with low water activity A_w 0.919 at 30 °C and the appearance of colonies was Observed five days after inoculation. Results for EPS production at room temperature showed that 4% of the isolates surveyed achieved a high production, followed by 42% which has achieved average production and the remaining 54% of low production. Analysing biofilm production capacity in TSB medium in absorbance of 540 nm were observed that 4% of the isolates had a higher frequency for biofilm formation, 83% achieved average production and 13% of isolates with low frequency output. Larger quantity for production of IAA in the presence precursor L-tryptophan was observed at the end of 72 hours despite significant differences among the isolates, except for isolate 7 which was considered high $51.62194 \mu\text{g.mL}^{-1}$ and isolated 6 to lower production $14.98113 \mu\text{g.mL}^{-1}$, all other isolates were classified as high producers. Among the isolates tested 25% were able to synthesize cytokines and 83.33% synthesized gibberellin compared to the control. All isolates, compared in control, increased in size which suggested the action of one or both hormones in question at the same time. The sprouting of inoculated buds compared in control to those without inoculation, the RB72454 variety of sugarcane, in end of the evaluation, in the presence of isolated samples 4, 16, 21 and 24 demonstrated that only 25% of the buds had sprouted and grew roots, not differing significantly from the control. As the result inoculation significantly increased a sprouting rate up to 83.33% of the isolates, and the best results obtained were in samples 7, 12, 19 and 20 (94.5, 100, 95 and 94.5% respectively) in both the number of sprouted buds as for speed emission of shoots and roots.

Keywords: Inorganic phosphate; Exopolysaccharides; Inoculants.

LISTA DE SIGLAS E SIMBOLOS

% - Porcentagem

(Ca₃(PO₄)₂) – Fosfato de Cálcio

°C – Graus Celsius

µg - Micrograma

ABA - Ácido abscísico

ACC - carboxilato de 1-aminociclopropano

AIA - Ácido Indol Acético

Al - Alumínio

Aw - Atividade de água

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

BPCPs - Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas

BSF – Bactéria solubilizadora de fosfato

C - Carbono

Ca - Cálcio

CaCl₂ – Cloreto de Cálcio

cm - Centímetros

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

DO – Densidade Ótica

DPV - Pressão de Vapor

EDTA - Ácido Etilenodiaminotetracético

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EPS - Exopolissacarídeos

Fe - Ferro

FeCl₃ – Cloreto de Ferro III

FeSO₄ – Sulfato de Ferro

g - Grama

h - Horas

H₂CO₃ – Ácido carbônico

H₂O - Água

H₂S – Sulfeto de Hidrogênio

H₂SO₄ – Ácido Sulfúrico

IAM - Indol-3-Acetamida

IAN - Indol-3-Acetonitrila

IAOX - Indol 3-Acetaldoxima

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IPA - Ácido Indol-3-Pirúvico

IpyA - Indole-3-Piruvato

IS - Índice de Solubilização

K - Potássio

K₂HPO₄ – Fosfato de Potássio

Kb - kilobase

KCl – Cloreto de potássio

KH₂PO₄ – Hidrogenofosfato de Potássio

L - Litros

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Mg - Magnésio

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

MgSO₄ – Sulfato de Magnésio

mL - Mililitro

mm - Milímetro

MnSO₄ – Sulfato de Manganês

MPa – Mega Pascal

N - Nitrogênio

NA – Nutriente Agar

Na - Sódio

NaCl – Cloreto de Sódio

Nbrip – Meio de cultura

NCBI - National Center for Biotechnology Information

NH₄ - Amônia

Ø - Diâmetro

OH - Hidroxila

P - Fósforo

PCA – Contagem padrão em placa

PGPB - Plant Growth-Promoting Bacteria

PGPR - Plant Growth-Promoting Rhizobacteria

Ph - Potencial Hidrogeniônico

PIB – Produto Interno Bruto

PO₄ - Fosfato

PSHR - Plant Stress Homeostasis-Regulating Rhizobacteria

QS - Quorum Sensing

RPCP - Rizobactérias Promotoras de Crescimento em Plantas

rpm – Rotações por Minuto

rRNA - Ácido Ribonucleico Ribossômico

SO₄ - Sulfato

SP – São Paulo

TAM - Triptamina

TBE – Tampão Tris-Borato-EDTA

Tris-HCl – Solução tampão

Trp - Triptofano

TSA – Meio de cultura Agar Triptona de Soja

TSB - Meio de cultura Tryptone Soya Broth

TSO - Oxidase da Cadeia Lateral do Triptofano

UFC – Unidade de Formação de Colônias

UNICA - União da Indústria de Cana de Açúcar

USDA - United States Department of Agriculture

µg.mL - micrograma por mililitro

µL - Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Descrição geral das diferentes vias de síntese dependente e independente de triptofano de AIA em bactérias. IAAld, Indol-3-acetaldeído; IAM, Indol-3-acetamida; IPCD, Indol-3-piruvato descarboxilase; Trp, Triptofano.	29
Figura 2. Concentração de Fósforo solúvel $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em meio NBRIP líquido inoculado pelos isolados após 15 dias de cultivo.	45
Figura 3. Solubilização de fosfato em meio NBRIP líquido, em quinze dias de cultivo por isolados de bactérias. Valor de cada ponto representa média de nove repetições subtraindo-se a média do P solubilizado do tratamento sem inoculação.	46
Figura 4. Frequência de isolados bacterianos quanto a solubilização de fosfato tricalcico em meio NBRIP líquido, sob cultivo por quinze dias, de acordo com a concentração de P solúvel detectado; baixa solubilização ($< 50 \mu\text{g.mL}^{-1}$); média solubilização ($50-100 \mu\text{g.mL}^{-1}$); alta solubilização ($101-500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e elevada solubilização ($> 501 \mu\text{g.mL}^{-1}$).....	47
Figura 5. Evolução do pH do meio de cultura NBRIP durante 15 dias de incubação com isolados bacterianos. Valor de cada ponto representa média de três repetições subtraindo-se a média da redução do pH no tratamento sem inoculação.	48
Figura 6. Frequência de produção de EPS a 28°C , em meio contendo sacarose em pH 7,5, pelos isolados bacterianos.....	52
Figura 7. Confirmação do teste qualitativo da produção de EPS em álcool etílico, a ausência de EPS, com presença apenas de massa celular, torna o meio turvo (A) o EPS é precipitado (B).	54
Figura 8. Formação de biofilme por isolados bacterianos em meio TSB Contendo sacarose, baseada nos valores de absorbância obtidos, $\text{DO}_{540} \text{ nm}$	55
Figura 9. Formação de biofilme em superfície abiótica por isolados bacterianos em meio TSB suplementado com 10 % de sacarose.	56
Figura 10. Presença de AIA por isolados bacterianos em meio TSB suplementado com triptofano, –após a adição do Reagente de Salkowski, baseada nos valores de absorbância obtidos, $\text{DO}_{560} \text{ nm}$	57
Figura 11. Produção de AIA de isolados de bactérias, em TSA suplementado com 200 de triptofano em $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 2.0 em intervalos de 12 horas (0-72) crescimento. Média de cinco repetições.....	60

Figura 12. Evidência da produção de citocinina (peso de cotilédones) por isolados de bactérias na planta teste (pepineiro <i>Cucumis sativus</i> L.).....	63
.....	63
.....	63
B controle (papel de filtro umedecido com caldo nutriente) C e D papel de filtro umedecido com com suspensão bacteriana.	63
Figura 13. Produção de citocinina (peso de cotilédones) por isolados de bactérias da planta teste (pepineiro <i>Cucumis sativus</i> L.). Média de cinco repetições.....	64
Figura 14. Produção de giberelina (comprimento de hipocótilos) por isolados de bactérias da planta teste (pepineiro <i>Cucumis sativus</i> L.). Média de cinco repetições.	65
Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott-Knott $p < .05$	65
Figura 15. Brotação das gemas de cana de açúcar promovido pela inoculação dos isolados bacterianos.....	67
Figura 16. Brotação de gemas de minitoletes da variedade de cana-de açúcar RB92579 inoculada com isolados de bactéria com potencial para promoção de crescimento vegetal....	70
Figura 17. Colonização de raízes da variedade de cana-de açúcar RB92579 inoculada com isolados de bactéria com potencial para promoção de crescimento vegetal indicado pela presença de uma região turva no entorno da raiz ao longo das raízes.	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação das bactérias com capacidade para solubilização de fosfato isolados em meio NBRIP, pela sequencia parcial dos genes 16SrRNA	35
Tabela 2 Eficiência da solubilização de fosfato em meio NBRIP sólido indicada pelo índice de solubilização (IS) calculado pela razão entre a média do diâmetro dos halos e a média dos diâmetros das colônias de cada isolado após 5, 10 e 15 dias de incubação. Médias obtidas de três repetições.	43
Tabela 3. Crescimento de isolados bacterianos em cinco dias de incubação, em meio em TSA (10%) suplementado com sorbitol, produzindo o valor de 0,919A _w a 28°C. Média de três repetições.	50
Tabela 4. Produção de EPS a 28°C em meio contendo três fontes de carbono e dois valores de pH caracterizada visualmente mediante medida do halo. Média de três repetições.....	53
Tabela 5. Produção de AIA de isolados de bactérias, em TSA suplementado com 200µl de triptofano em DO 600 de 2.5 em intervalos de 12 horas (0-72) crescimento. Média de cinco repetições.	58
Tabela 6. Coeficientes de correlação simples entre as características Ácido Indolacético (AIA), Fósforo Solúvel (PSO), Exopolissacarídeos (EPS), Biofilme (BIO), Giberelinas (GIB), Citocininas (CIT) e Brotagem da gema (BRO)	72
Tabela 7. Componentes principais (CP), autovalores (λ_i), porcentagem da variância explicada pelos componentes (% VCP) e porcentagem acumulada das características: Ácido Indolacético (AIA), Fósforo Solúvel (PSO), Exopolissacarídeos (EPS), Biofilme (BIO), Giberelinas (GIB), Citocininas (CIT) e Brotagem da gema (BRO)	72
Tabela 8. Coeficientes de ponderação das características Ácido Indolacético (AIA), Fósforo Solúvel (PSO) e, Exopolissacarídeos (EPS), Biofilme (BIO), Giberelinas (GIB), Citocininas (CIT) e Brotação de gema (BRO) com os componentes principais descartados em ordem de menor importância.....	73

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. Cultura da Cana-de-açúcar.....	17
2.2. Rizobactérias.....	18
2.3. Solubilização de Fosfato	20
2.6. Estresse Hídrico.....	26
2.7. Fitormônios	28
2.9. Indução de crescimento	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1. Solubilização de fosfatos inorgânicos ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$).....	35
3.1.1. Avaliação qualitativa	35
3.1.2. Avaliação quantitativa	36
3.1.3.pH.....	37
3.2. Crescimento em meio com reduzida atividade de água.....	37
3.2.1. Avaliação quantitativa de EPS	37
3.2.2. Avaliação qualitativa de EPS	38
3.3. Biofilme	38
3.3.1. Formação de biofilme em superfície abiótica	38
3.3.2. Quantificação da formação de biofilme em superfície abiótica	38
3.4. Ácido Indolacético (AIA)	38
3.4.1. Avaliação qualitativa da produção de ácido indolacético	38
3.4.2. Avaliação quantitativa da produção de ácido indolacético	39
3.5. Produções de citocininas e giberelinas	39
3.6. Indução de enraizamento e brotação de gemas de cana-de-açúcar.....	40
3.7. Análise Estatística.....	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42

4.1.	Solubilização de fosfatos inorgânicos $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	42
4.2.	Crescimento em meio com reduzida atividade de água.....	49
4.2.1.	Produção de exopolissacarídeos (EPS)	51
4.2.2.	Formação de biofilme em superfície abiótica	54
4.3.	Produção de ácido indolacético (AIA).....	57
4.4.	Produção de citocininas e giberelinas	63
4.5.	Brotação de gemas Colonização de raízes emissão de raízes e folhas	66
4.6.	Análise de componentes principais para avaliação de parâmetros de crescimento da cana-de-açúcar	71
5.	CONCLUSÃO	74
6	DESCRIÇÃO PATENTÁRIA	75
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

1. INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca no cenário atual como o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, onde a área ocupada por esta cultura no território nacional de 9,5 milhões em 2013 (UNICA, 2014; IBGE 2013). O cultivo da cana-de-açúcar destaca-se como importante para a economia brasileira desde o período colonial, ocupando atualmente a terceira posição na balança comercial do agronegócio, principalmente devido à exportação de açúcar para a China e outros países. Além da produção de açúcar a cultura se destaca pela importância estratégica para a produção de etanol, ainda, existem outros subprodutos originados dela, como o bagaço, diversos tipos de papéis, fármacos, levedura, ácido cítrico, ácido láctico e glutamato monossódico e diferentes produtos provenientes da álcoolquímica como polietileno, éter, acetona entre outros

O método de produção atual baseia-se no uso de pesticidas químicos e fertilizantes aplicados anualmente. Apesar da eficiência desses métodos na agricultura, os mesmos geram custos cada vez mais significativos para o meio ambiente e saúde humana (GUNNELL et al., 2007; LEACH et al., 2008), além de uma forte elevação nos custos de produção, reduzindo as margens de lucro do setor e revelando grande dependência de insumos importados.

Entre as tecnologias que poderão contribuir para o aumento da produtividade uma das mais estudadas baseia-se no uso de bactérias promotoras do crescimento vegetal. Os efeitos positivos observados em vários estudos revelam o potencial dessa prática como ferramenta biotecnológica para os sistemas de produção, proporcionando vantagens para produtores e a agroindústria. Nas estirpes bacterianas, espera-se àquelas que se destaquem, apresentando as melhores respostas aos testes realizados de forma criteriosa a seleção em ambiente controlado, procurando agregar conhecimento dos bioprocessos relacionados aos efeitos desses micro-organismos à cultura, visando à produção de um inoculante.

Segundo Thakore (2006) baseados nos mecanismos de promoção de crescimento, diversos inoculantes microbianos já estão no mercado e, nos últimos anos, a popularidade de inoculantes microbianos aumentou substancialmente, devido às pesquisas extensivas, a qual tem reforçado a sua coerência e eficácia. Um inoculante é caracterizado como o material que contém micro-organismos que atuam favoravelmente no desenvolvimento das plantas, composto por estirpes específicas para cada espécie vegetal. Esse veículo atua de maneira a aumentar a produtividade de determinada cultura, além de melhorar a qualidade dos solos, reduzir os custos e a quantidade de adubos com vistas à preservação ambiental. Bactérias

que compõem inoculantes podem promover o crescimento das plantas produzindo substâncias que resultam em crescimento radicular e conseqüente aumento na absorção de água e nutrientes, o que acarreta em incremento geral de crescimento na planta.

Neste sentido, bactérias que possuem mais de uma característica são almejadas e rastreadas para uma possível aplicação no campo com o intuito de aumentar a produção agrícola (VERMA et al., 2001). Os efeitos positivos exercidos sobre plantas por estes microorganismos são produção de reguladores de crescimento de plantas, tais como auxinas, giberelinas e citocininas, melhoria de processos como a germinação de sementes, nutrição mineral, desenvolvimento radicular, o uso da água, solubilização de fosfatos, fixação biológica de nitrogênio e controle de fitopatógenos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cultura da Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar pertence à família *Poaceae*, do gênero *Saccharum*, originária do sudeste da Ásia. Foi introduzida no Brasil pelos colonizadores portugueses (KLEIN, 2010) e sua expansão no território brasileiro, garantiu o Brasil como maior setor sucroalcooleiro do mundo, sendo líder na produção mundial (OLIVEIRA et al., 2014).

Atualmente a cultura ocupa no país uma área de 8.527 mil hectares e uma produção de 596.629 mil toneladas, dados da última safra, 2012/2013 (CONAB, 2012). O país também é líder na produção de açúcar, sendo responsável por mais da metade do açúcar comercializado no mundo (MAPA, 2013), exportando para países como China, Rússia e Egito (USDA, 2012).

Segundo Lopes (2013) o mercado da cana-de-açúcar apresenta-se em expansão devido, principalmente, ao aumento do consumo de etanol, como forma de combustível em substituição à gasolina, sendo possível acrescentar a este fato, a maior preocupação com o meio ambiente e a redução das reservas mundiais de petróleo.

A cultura da cana teve sua expansão no Nordeste Brasileiro no período de 1970 a 1975, com recursos do programa do álcool (Proálcool) principalmente nos tabuleiros costeiros por se tratar de uma região mais favorecida por chuvas em determinados períodos do ano (VICENTE et al., 2013).

A importância da cana-de-açúcar no desenvolvimento da região Nordeste é indiscutível. A atividade agrícola de plantação e o parque industrial, fizeram com que a região da zona da mata e no Litoral, tivessem concentrado grande parte da população e fosse considerada a mais importante do Nordeste.

No estado de Alagoas, como nos demais estados produtores de cana-de-açúcar, a cultura canavieira foi um dos principais fatores de formação e desenvolvimento regional. A marca da cultura canavieira estende-se além dos extensos canaviais que dominam o horizonte e tabuleiros costeiros; ela também se estende no tempo. Esta afirmação confirma-se quando se analisa o cenário socioeconômico alagoano e nota-se que o setor canavieiro definiu e até hoje define os rumos da economia do Estado (SANTOS, 2011).

Devido ao estado de Alagoas ser o segundo menor em extensão territorial e reunir condições naturais que favoreceram a expansão dos canaviais, a agroindústria se

transformou na sua principal atividade econômica. Desta forma, se faz necessário conhecer as repercussões da agroindústria sucroalcooleira no tecido social, nos recursos naturais, identificando as influências do setor sob o enfoque da sustentabilidade ambiental (SANTOS et al., 2007).

A participação da indústria da cultura canavieira na economia do estado atingiu 45% do PIB alagoano, tendo influência no setor agropecuário, na indústria e no setor de serviços. De acordo com dados da Secretaria da Fazenda do Estado de Alagoas, 60% da indústria e 30% do setor de serviços estão relacionados ao setor canavieiro (SANTOS, 2011).

A chegada da monocultura da cana-de-açúcar aos tabuleiros alagoanos foi marcada por dois atributos distintos: espaço e técnica. O condicionante espacial, inicialmente, foi o que lançou as bases para a permanência da cultura em terras alagoanas. Sem a umidade natural e fertilidade dos vales a cana não tinha como expandir os seus domínios (SANTOS et al., 2007).

Em nível de exploração, a monocultura é justificada pelo fato de, em cada conjuntura socioeconômica, haver sempre uma cultura que, se analisada isoladamente, origina maior receita que as restantes numa perspectiva de curto prazo, sendo, por isso, atrativa para o agricultor (AGUIAR, 2014).

No entanto, a monocultura da cana-de-açúcar, assim como qualquer outra, traz desvantagens ambientais, pois o solo é levado à exaustão com o tempo, sendo reduzida a biodiversidade. Uma vez degradado, um solo se torna inutilizável para fins agrícolas a não ser que haja um processo de tratamento e reconstituição dele quanto a nutrientes. A regeneração do solo é de caráter mais que fundamental para garantir seu uso contínuo (SÃO PAULO, 2010).

A remineralização do solo proporciona inúmeras vantagens para se ter um solo saudável e revitalizar o desgaste gerado pela monocultura. Com a remineralização tem-se elevado o desenvolvimento dos micro-organismos do solo, liberação contínua dos elementos minerais, aumentando o seu aproveitamento pelas plantas, melhoramento em sua estrutura, dentre outros (SÃO PAULO, 2010).

2.2. Rizobactérias

No solo existe um grande número de bactérias que se localizam na rizosfera, e aproximadamente cerca de 7 a 15% da superfície total das raízes é ocupada por estas células microbianas (GRAY; SMITH, 2005).

Vários estudos da atividade microbiológica que ocorre na rizosfera, que é a zona de influência das raízes que vai desde sua superfície até uma distância de 1 a 3 mm (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006), levaram ao descobrimento de diversos grupos de micro-organismos importantes para o desenvolvimento vegetal. Dentre eles estão as rizobactérias que são capazes de colonizar as raízes, estimulando-as diretamente ou beneficiando o crescimento e o desenvolvimento de diversas plantas. Essas bactérias são chamadas de “Plant growth-promoting rhizobacteria” (PGPR) (BISWAS et al., 2000; GYANESHWAR et al., 2001; GRAY; SMITH, 2005; BARRIUSO et al., 2005; KOKALIS-BURELLE et al., 2006) ou rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (RPCP).

As rizobactérias promotoras de crescimento de plantas foram primeiramente definidas por Kloepper e Schroth (1978) para definir um grupo de bactérias rizosféricas que atuavam no biocontrole, causando a supressão de doenças por substâncias inibidoras de patógenos ou pelo aumento da resistência vegetal. Entretanto, conforme aumentaram os estudos realizados neste campo, controvérsias apareceram com relação ao nome dado a este grupo de bactérias. Bashan e Holguim (1998) propuseram dois novos termos que pareciam abranger todos os benefícios que as bactérias têm a oferecer às plantas de acordo com o papel desempenhado. São eles: Bactérias biocontroladoras promotoras de crescimento de plantas (Biocontrol-Plant Growth-Promoting Bacteria (biocontrol-PGPB)) e Bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs), pois segundo os autores, o termo RPCP deixava de englobar as bactérias com interações não-rizosféricas, além de ser um termo muito geral e inespecífico. Cassán et al. (2009) introduziram um novo termo: Plant Stress Homeostasis-Regulating Rhizobacteria (PSHR), que seriam bactérias reguladoras de estresse em plantas. Então, as RPCPs podem ser divididas em três grupos funcionais: BPCPs, BPCPs biocontroladoras e PSHR, que podem promover o crescimento vegetal sob condições abióticas de estresse.

Qualquer que seja a definição adotada, essas bactérias promovem o crescimento de plantas de duas maneiras: fitoestimulação e/ou biofertilização (KUMAR et al., 2011) e para isto, possuem vários mecanismos (SARAF et al., 2011). Entre eles podemos citar: Solubilização de fosfato e produção de fitohormônios como ácido indol acético (AIA), gibberelina e citocinina.

Além disso, estas estirpes bacterianas também contribuem indiretamente para o desenvolvimento das plantas com a produção de diversos antibióticos ou outros mecanismos de biocontrole, os quais inibem o crescimento de diversos micro-organismos considerados fitopatogênicos (GRAY; SMITH, 2005).

A maioria das RPCPs estudadas na literatura tem como principal efeito sobre as plantas o fornecimento de fitormônios de crescimento, como auxinas, várias giberelinas e citocininas. Esses produtos auxiliam o crescimento da raiz e conseqüentemente da parte aérea do vegetal, aumentando assim, a captação de nutrientes pela planta (ASGHAR et al., 2002).

A inoculação de micro-organismos benéficos em plantas tem sido empregada para melhorar seu desenvolvimento, através da captação de nutrientes (CARAVACA et al., 2002), aumentando a tolerância à doenças, além de favorecer seu estabelecimento frente a condições adversas, como salinidade e estresse hídrico (GIRI; MUKERJI, 2004).

2.3. Solubilização de Fosfato

O fósforo (P) é um dos principais macronutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas devido à sua atuação em processos biológicos, tais como metabolismo energético, biossíntese de fosfolipídios e ácido nucléico, transdução de sinal e regulação de atividade enzimática (ROCHA et al., 2007).

Apesar de abundante nos solos, tanto na forma orgânica quanto inorgânica, o fósforo é o segundo nutriente limitante ao crescimento de plantas no solo. A baixa disponibilidade de P, principalmente nos solos ácidos das regiões tropicais e subtropicais, é um dos fatores limitantes para a produção de culturas vegetais. Sendo necessária altas dosagens de adubos fosfatados para a obtenção de alta produtividade (RAIJ, 1991).

No Brasil, em geral, os solos apresentam baixo teor de fósforo total e muito baixo teor de fósforo disponível para as plantas, devido a problemas de fixação que ocorrem com solos que apresentam ferro e alumínio, e de características ácidas. Do fósforo adicionado ao solo através de fertilizantes químicos, até 25% é aproveitado pelas plantas. Essas adubações são realizadas principalmente com fosfatos solúveis em água, atingindo dosagens de fósforo muito superiores às necessidades das culturas, pois a maior parte do adicionado torna-se indisponível às plantas (BRAGA, 2006).

Os micro-organismos solubilizadores de fosfatos desempenham importante papel na disponibilização de formas inorgânicas de fosfatos (Ca-P, Al-P e Fe-P), considerando o aumento do teor de fósforo na solução, que propicia melhor crescimento e maior rendimento das culturas (CHABOT et al., 1993).

Esses micro-organismos estão presentes na matéria orgânica do solo, ao qual representa um dos componentes da fertilidade do solo. Aparecem na formação do solo, na

decomposição dos resíduos orgânicos, na formação da matéria orgânica e na reciclagem dos nutrientes (BRAGA, 2006).

O fósforo (P) é adsorvido aos colóides do solo ou transformado em compostos de ferro e alumínio pouco solúveis para as plantas. Por isto é que as formulações de fertilizantes são representadas por altos teores de P. Com isto, maiores quantidades de P são adicionadas ao solo para que a planta aproveite 25%, o que se traduz numa baixa eficiência dos fertilizantes fosfatados. Neste sentido, os micro-organismos do solo têm um papel preponderante na mineralização e solubilização do fósforo. As formas orgânicas de P são mineralizadas pelos micro-organismos produtores das enzimas fosfatases (BRAGA, 2006).

O P orgânico é transformado em P solúvel pela ação das fosfatases, enzimas que catalizam a hidrólise de ésteres de fosfatos, liberando fosfato solúvel. As fosfatases são secretadas pelas raízes das plantas e pelos micro-organismos do solo (NAHAS et al., 1994).

Esta enzima, a fosfatase, no meio vegetal pode ser constitutiva ou induzida por fatores externos como deficiência de fósforo inorgânico ou dificuldade de absorver fósforo em condições de falta de água. Tarafdard et al (1981) verificaram que a atividade da fosfatase ácida apresenta uma correlação significativa com o fósforo inorgânico. A concentração de fósforo inorgânico no tecido da planta constitui um parâmetro de eficiência ao uso de fósforo. Quanto menor o teor de fósforo inorgânico no tecido, maior a atividade da fosfatase ácida no mecanismo de uso de fósforos pelas plantas (OLIVEIRA et al., 1999).

As fosfatases bacterianas são enzimas secretadas e produzidas como proteínas periplasmáticas solúveis ou ligadas à membrana, que geralmente são capazes de desfosforilar a estrutura de um substrato e exibir atividade catalítica ótima em valores de pH ácidos, neutros e alcalinos (ROSSOLINI et al., 1998). Muitas das enzimas fosfatases microbianas são secretadas para fora da membrana plasmática, onde são liberadas em forma solúvel, outras são mantidas ligadas a membrana (WANNER, 1996) e outras ainda, encontradas no citoplasma e envolvidas em reações de desfosforilação que ocorrem durante sinais de transdução e vias metabólicas dos micro-organismos (STOCK et al., 1995).

A classificação das fosfatases, incluindo aquelas de origem bacteriana, é baseada em critérios bioquímicos e biofísicos da enzima, como pH ótimo (ácido, neutro ou alcalino), especificidade de substrato (específico ou não específico) e tamanho molecular. Seguindo o critério de pH ótimo, as fosfatases são divididas em dois grandes grupos, o grupo das fosfatases alcalinas, com pH ótimo na faixa de 8 a 10,5 e o grupo das fosfatases ácidas com pH ótimo de 2,5 a 6 (DVORAK et al., 1988).

Os micro-organismos influem na habilidade das plantas em absorver P do solo, ou seja: aumentando a área de contato das raízes pelo desenvolvimento do sistema radicular (micorrizas); promovendo o crescimento das raízes laterais e pêlos radiculares; transferência de íon fosfato para a solução do solo; aumentando formas orgânicas de P; estimulando processos metabólicos que são importantes na solubilização e mineralização do P (BRAGA, 2006).

A inoculação de micro-organismos solubilizadores de fosfatos no solo tem sido sugerida como alternativa para substituir ou diminuir o uso de fertilizantes fosfatados solúveis, mediante melhor aproveitamento dos fosfatos naturais (IGUAL et al., 2001; VESSEY, 2003), existentes ou adicionados ao solo e dos formados pela aplicação de fontes solúveis, para incrementar a concentração de fósforo solúvel na rizosfera e promover a nutrição das plantas com fósforo (PEIX et al., 2001; GYANESHWAR et al., 2002).

2.4. Exopolissacarídeos

Os exopolissacarídeos (EPS) são definidos como polissacarídeos extracelulares produzidos por alguns fungos e bactérias, os quais são encontrados ligados à superfície das células ou são excretados para o meio. A maioria dos micro-organismos possui a habilidade de sintetizar polissacarídeos e excretar polímeros solúveis ou insolúveis, para fora das células, com várias funções (SEESURIYACHAN et al., 2012).

Os exopolissacarídeos possuem a função de proteger a célula bacteriana contra dessecação e ataque de fagos, bem como de antibióticos, compostos tóxicos e protozoários. Outra possível função do exopolissacarídeo inclui sequestrar cátions essenciais e o envolvimento na aderência em superfícies sólidas e formação de biofilmes (DE VUYST et al., 2001). A verdadeira função dos EPS, contudo, depende da ecologia da célula bacteriana que o produz

A produção de EPS pelos micro-organismos pode auxiliar na sobrevivência do vegetal em várias situações de estresses ambientais, como estresse salino, hídrico, variações de temperatura, entre outros. Esse composto possibilita a bactéria aderência e colonização às superfícies sólidas onde os nutrientes se acumulam (SILVA et al., 2013). Além disso, o EPS envolve as membranas das células protegendo-as do dessecação e outros estresses ambientais, além de poder ajudar na fixação de minerais e nutrientes próximos à bactéria (BARRETO et al., 2011; LIU et al., 2013).

Alguns exopolissacarídeos são sintetizados durante todo o crescimento bacteriano, enquanto que outros são produzidos somente durante a fase logarítmica ou na fase

estacionária. A síntese de todos esses exopolissacarídeos é um processo intracelular, utilizando açúcares difosfato nucleotídeos (DE SOUZA; SUTHERLAND, 1994).

Embora sejam conhecidos dois mecanismos diferentes para a síntese de exopolissacarídeos por bactérias, o utilizado na formação de dextrana, envolvendo enzimas extracelulares lipoprotéicas secretadas na superfície da célula de bactérias Gram-positivas, tal como *Leuconostoc mesenteroides*, não se aplica às espécies Gram-negativas. Nestas, os exopolissacarídeos (heteropolissacarídeos e homopolissacarídeos) são sintetizados intracelularmente. Os açúcares nucleotídeos (açúcar difosfato nucleotídeo) fornecem as formas ativa de monossacarídeos e também fornecem à célula bacteriana um meio de interconversão dos vários monossacarídeos através de reações de epimerização, desidrogenação e descarboxilação (HARDING et al., 1993).

A formação de agregados celulares extremamente organizados e envoltos por uma matriz composta principalmente por polissacarídeos, muitas vezes é chamada de biofilme (COSTERTON et al., 1995). A maioria dos micro-organismos não existe naturalmente em comunidades planctônicas, sendo, portanto encontrados aderidos à diversas superfícies e formando biofilmes que contém colônias organizadas (SUTHERLAND, 2001).

O processo de adesão celular e formação de biofilmes mostrou-se ser extremamente complexo, onde as células bacterianas alteram seus fenótipos em resposta à proximidade da superfície. Durante a fase inicial da formação do biofilme, bactérias sésseis encontram-se justapostas com células da mesma espécie ou espécies diferente dentro da matriz exopolissacarídica, condicionando o microambiente e respondendo de maneira distinta à influência do ambiente, dependendo da posição ocupada pela célula (XAVIER; FOSTER, 2007). A cooperatividade fisiológica é um fator chave para a arquitetura do biofilme e para o estabelecimento das microcolônias, tornando o biofilme uma comunidade dinâmica e eficiente aderida às superfícies (DAVIES et al, 1998).

Depois da polimerização das unidades repetidas, o polissacarídeo é excretado através do complexo parede/membrana para a superfície celular no ambiente extracelular. Este estágio final da secreção do exopolissacarídeo na membrana citoplasmática envolve a passagem pelo periplasma, pela membrana e finalmente sua excreção para o ambiente extracelular (SUTHERLAND, 2001).

Diversas pesquisas têm tentado elucidar a rota biossintética, as condições de crescimento e a fisiologia bacteriana que leva à produção de polissacarídeos. Geralmente, a produção de exopolissacarídeo em um micro-organismo é induzida pela limitação de um nutriente essencial, que não seja o carbono ou outra fonte de energia. Frequentemente uma

relação C:N alta tem sido considerada como a condição ambiental mais significativa para a produção de polissacarídeo (NAMPOOTHIRI et al., 2003).

No processo de produção de polissacarídeos, deve-se considerar desde o micro-organismo em estudo até a determinação dos parâmetros de fermentação, onde se destaca o meio de produção e sua influência na síntese, no rendimento e na composição dos exopolissacarídeos (FARIA, 2002). Os parâmetros que mais influenciam o processo de biossíntese de exopolissacarídeos são a bactéria, a composição do meio de cultivo, o pH e a temperatura de incubação (NAMPOOTHIRI et al., 2003).

Nestes têm sido pesquisadas as limitações das fontes de nitrogênio, fosfato ou enxofre em presença de excesso de carboidrato e foi observado que podem conduzir a um aumento na síntese de polissacarídeo, embora a quantidade seja também afetada pelo teor de oxigênio, pH e temperatura. Cada cepa bacteriana difere em sua resposta ao efeito destas mudanças ambientais e à fonte de carbono utilizada (FARIA, 2002).

Na literatura estão descritos vários meios de produção, entretanto a composição qualitativa é a mesma e cada suplemento apresenta uma determinada função na produção de polissacarídeo. Basicamente, os meios para produção de polissacarídeos apresentam uma fonte de fósforo (fosfato de potássio) e nitrogênio (sulfato de amônio) em concentrações adequadas para o crescimento do micro-organismo; uma fonte de carbono (glicose, sacarose, manose, frutose e outras) como reserva energética e ainda oligoelementos como Na^{+1} , K^{+1} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} e outros, os quais têm um papel importante como cofatores enzimáticos nas vias de produção do polissacarídeo (MADI et al., 1997).

A produção de EPS pelos micro-organismos pode auxiliar na sobrevivência da planta a determinados tipos de estresse ambientais, quando inoculadas com micro-organismos de interesse (KAVAMURA, 2012). O estudo de bactérias produtoras de EPS é de suma importância, com a finalidade de encontrar novas aplicações, representando fontes promissoras para exploração desses micro-organismos na interação solo/planta. (SILVA et al., 2013)

2.5. Biofilme

Os biofilmes bacterianos são agregados multicelulares aderidos a um substrato biótico ou não, inseridos em matrizes poliméricas (DANHORN; FUQUA, 2007). Estas matrizes conectam as células e consistem basicamente de polissacarídeos extracelulares (EPS) e podem conter DNA e proteínas (COSTERTON et al., 1999). Também podendo ser definido como uma estrutura comunitária de células microbianas protegidas por uma matriz polissacarídica ou protéica que é sintetizada pelas células e aderente tanto a superfícies

inertes ou vivas. Esta matriz é formada fundamentalmente por água e substâncias poliméricas extracelulares (“extracellular polymeric substances”) (WIMPENNY, MANZ; SZEWZYK, 2000; DONLAN, 2002).

Além do EPS, um biofilme também contém variadas partículas, como proteínas, lipídeos e outros tipos de carboidratos. A maioria destas moléculas são provenientes da fase aquosa e, desta forma, quanto mais rica esta for, maior será a quantidade e a variedade desses componentes em um biofilme (PARIZZI, 1998).

Os biofilmes podem ser constituídos por uma única espécie microbiana (por exemplo, alguns biofilmes associados à infecções e biofilmes que crescem em implantes médicos) ou, mais frequentemente, por várias espécies formando consórcio de fungos, algas, bactérias e outros micro-organismos (WIMPENNY et al., 2000). No interior dos biofilmes se encontram partículas de matéria orgânica e inorgânica que servem como nutriente aos micro-organismos e quanto maior a diversidade destes, maior a diversidade do consórcio (CAPPELLI et al., 2007).

O desenvolvimento e persistência dos biofilmes são afetados não somente pelo ambiente circunvizinho, mas também pela variedade de espécies presentes (KOMLOS et al., 2005). Nos ecossistemas terrestres e aquáticos os micro-organismos aparecem como células livres (estado planctônico) ou sob forma de biofilmes ligados à suportes sólidos.

A formação e desenvolvimento dos biofilmes ocorrem em etapas iniciando com a adesão das células a superfície, maturação, onde ocorre a produção de polímeros e reprodução celular até o desprendimento, onde pode ocorrer a liberação de células do biofilme, as quais podem voltar ao seu estado planctônico (DONLAN, 2002).

Como etapas importantes para sua formação são descritas as bioadesões iniciais, passando os micro-organismos de seu estilo de vida planctônico ao sésil, a formação de microcolonias, a maturação do biofilme e o destacamento de células, retornando estas ao seu estilo de vida planctônico.

Em todas estas etapas, uma série de transformações ocorre no íntimo do micro-organismo e na sua relação com os demais indivíduos e, em razão deste fato o seu processo de formação corresponde a um interessante objeto para se estudar o desenvolvimento microbiano (O'TOOLE et al., 2000).

São percebidas muitas alterações fenotípicas, principalmente nos aparatos de motilidade, no tamanho da célula e no metabolismo, recorrentes da restrição de nutrientes e de oxigênio em algumas fases, da variação na taxa de reprodução e em toda regulação gênica (STOODLEY et al., 2002). Estas adaptações determinadas por condições físicas,

bioquímicas e genéticas são interessante estratégia de sobrevivência (JOHNSON, 2007). Tais modificações, segundo Sauer et al. (2002) seriam o produto da ativação de algo em torno de 30 a 40 genes.

Monds e O'Toole (2009) afirmam que a formação de biofilme é um fenômeno biológico complexo, pois vários parâmetros ambientais podem influenciar o padrão de formação de biofilme. Nos biofilmes as células se comunicam através da elaboração e do reconhecimento de pequenas moléculas, tal mecanismo é conhecido como quorum sensing (QS) (SAKURAGI; KOLTER, 2007). Os sistemas QS estão envolvidos na regulação de uma variedade de processos fisiológicos incluindo biossíntese de antibióticos, motilidade, transferência de plasmídeos, produção de biofilme entre outros (JUHAS et al., 2005).

A produção de metabólitos secundários e a formação de biofilme podem ser reguladas pelo mecanismo de monitoramento populacional ou “quorum sensing” (QS) (CHOWDHURY et al., 2009). Por meio desse sistema, seres unicelulares produzem substâncias sinalizadoras, denominadas autoindutores, que se difundem livremente através da membrana celular para o meio. A partir de determinada concentração, estas substâncias desencadeiam alterações na expressão de genes específicos. Desta forma, o QS permite uma resposta coordenada do organismo em função da densidade populacional (RUMJANEK et al., 2004).

O sistema QS está envolvido com a competência rizosférica para regular a mobilidade, tolerância a estresses, transferência horizontal de genes, surfactantes, antibióticos, enzimas extracelulares e formação de biofilmes (BODMAN, 2003; DECHO et al., 2010).

A formação de biofilmes protege a população bacteriana quando inoculada no solo e nas sementes e favorece a manutenção de uma densidade populacional para que se iniciem interações benéficas ou deletérias entre a planta e a bactéria (DANHORN; FUQUA, 2007).

2.6. Estresse Hídrico

Um fator significativo que deve ser destacado visto a influência na produtividade das culturas, é a disponibilidade de água e de nutrientes. Com relação à água, nem sempre as chuvas atendem a real necessidade hídrica das plantas; daí a importância da irrigação a qual, quando bem planejada tem retorno econômico inquestionável (AZEVEDO, 2002).

A necessidade hídrica da cana-de-açúcar varia com o estágio vegetativo em que a cultura se encontra e a cultivar utilizada (AUDE, 1993) sendo, portanto função da área foliar, estágio fisiológico e densidade radicular.

O Nordeste brasileiro vem sofrendo com as baixas precipitações ocorridas na região nos últimos anos, que ocasionaram queda na produção de cana-de-açúcar, levando os produtores a recorrerem a novas técnicas como a irrigação suplementar, para a melhoria do cultivo, mas para uma eficiência melhor do uso da água de irrigação, é conveniente a utilização de fertilização equilibrada, de maneira eficiente e lucrativa.

Em regiões áridas e semiáridas, a falta de água, juntamente com o aumento das áreas em processo de desertificação, reduz a produtividade agrícola (BRASIL, 2004). O aumento da temperatura e a redução substancial das precipitações, em última instância, são traduzidos em aumento da demanda de água pelas culturas agrícolas. Com este cenário, aumenta-se a preocupação em busca por alternativas para reduzir o consumo de água pelas culturas, promover o crescimento de plantas em solos com baixa precipitação hídrica, como o observado na região nordeste (KAVAMURA, 2012).

Estresse é uma força ou uma condição adversa que inibe o funcionamento de um sistema biológico. Uma das primeiras respostas das plantas ao estresse, mais especificamente ao hídrico, ocorre por processos de sinalização envolvendo o ácido abscísico (AAB), que ocasionará o fechamento estomático, reduzindo a perda de água pela planta (SCHROEDER et al., 2001).

O espaço de tempo para a insuficiência de suprimento de água, necessário para causar reduções de crescimento depende do tipo de planta, da capacidade de retenção de água no solo, das condições atmosféricas, principalmente da diferença de pressão de vapor entre a folha e o ar (DPV) e da temperatura e de fatores que controlam a evapotranspiração (PIMENTEL, 2004). As respostas das plantas à seca são caracterizadas por alterações morfológicas como diminuição da área foliar, reduzida pelo enrolamento das folhas e diminuição do crescimento (PIMENTEL, 2004).

A diminuição da área foliar é uma estratégia para limitar a transpiração. Folhas jovens de cana-de-açúcar são capazes de se enrolar e reduzir a área foliar projetada e com isso reduzir a radiação recebida. Inman-Bamber e Smith (2005) relatam o enrolamento a partir de um potencial de -1,0 MPa ao meio dia, podendo ser esse considerado como suscetibilidade do genótipo à seca, como também uma estratégia de evitar o estresse.

O estresse hídrico afeta todos os aspectos ligados ao crescimento da planta. Os microorganismos são capazes de sobreviver a várias condições de estresse pela formação de biofilme, exopolissacarídeos, entre outros (CHAVES et al. 2002; LINDOW, 2003)

Em plantas tratadas com bactérias em situação de estresse, Mayak et al. (2004) encontraram estímulo de crescimento. Já Liddycoat et al. (2009) observaram crescimento

diferencial dependendo do genótipo de aspargo, para um deles o crescimento foi favorecido pela presença de bactérias apenas sob condições ideais de irrigação, enquanto que para outro genótipo o favorecimento ocorreu em situação de estresse hídrico. Os autores demonstraram assim uma resposta diferencial da interação entre bactéria e planta, associada à condição hídrica.

O estresse hídrico é a principal causa de perdas agrícolas e entender como as plantas respondem a essa alteração ambiental é importante para traçar estratégias e evitar prejuízos. Assim, a utilização de micro-organismos tolerantes à seca e que sejam capazes de proteger as plantas e promover seu crescimento sob estresse hídrico, poderá ser uma alternativa a esse problema (KAVAMURA, 2012).

2.7. Fitormônios

Fitormônios são substâncias químicas que em baixas concentrações promovem o crescimento das plantas, influenciando no seu crescimento, desenvolvimento e diferenciação celular de tecidos (SPAEPEN et al., 2009). Por causa da capacidade de estimular ou inibir o crescimento de plantas, estes também são chamados de reguladores de crescimento de plantas. Cinco principais grupos de fitormônios são reconhecidos: auxinas, giberelinas, etileno, citocininas e ácido abscísico (SAHARAN; NEHRA, 2011).

A produção de fitormônios citocinas e giberelinas por bactérias é de grande interesse para estudos de crescimento vegetal (GRAY; SMITH, 2005). Estas substâncias são reguladoras naturais de crescimento das plantas e também são capazes de interferir diretamente nos processos fisiológicos relacionados com o desenvolvimento vegetal (PEDRINHO, 2009).

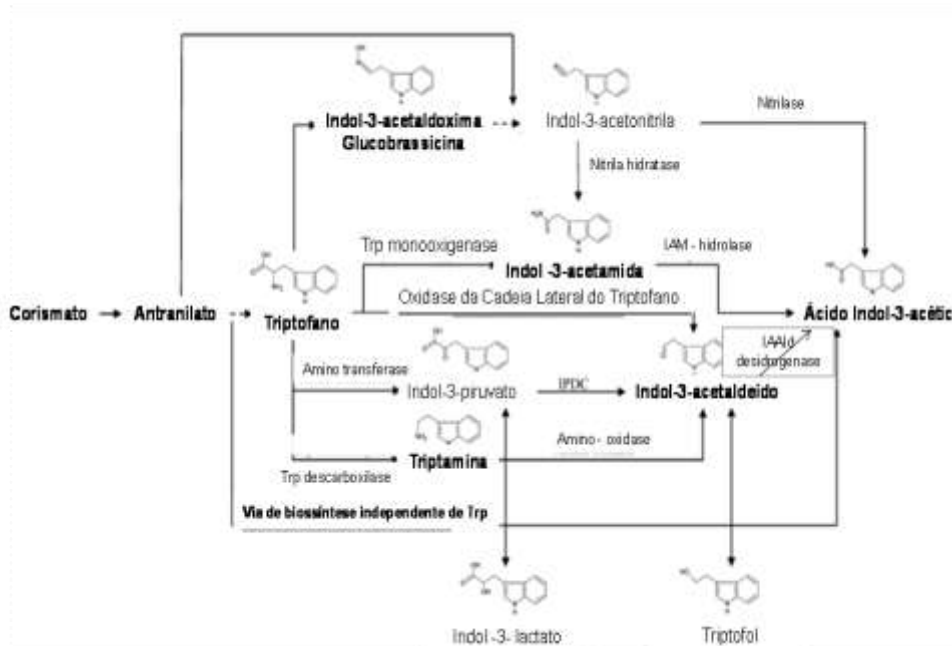
As auxinas são compostos que estimulam o crescimento, sendo o ácido -3 indolacético a principal auxina encontrada nas plantas, nos quais é produzido no meristema apical do caule, folhas jovens, flores, frutos em desenvolvimento e sementes, sendo também encontrados em raízes. O seu transporte ocorre unidirecionalmente, através das células parenquimáticas do floema e parenquimática que circulam os tecidos vasculares (RAVEN et al., 2001).

Este fitormônio funciona como uma chave reguladora para muitos aspectos do crescimento e desenvolvimento de plantas, incluindo divisão e alongação, diferenciação, tropismo, dominância apical, senescência, abscisão e floração (WOODWARD; BARTEL, 2005; TEALE, W. D. et al., 2006).

Este efeito no desenvolvimento da planta é dependente da concentração do hormônio auxina (BARAZANI; FRIEDMAN, 1999). Concentrações muito altas de auxina inibem a alongação celular e, portanto, o crescimento de órgãos. Adicionalmente, a sensibilidade das células a auxina varia nas diferentes partes da planta. O caule, por exemplo, é menos sensível a auxina, quando comparado à raiz (TAIZ; ZAIGER, 2004).

A biossíntese de auxina nas plantas é bastante complexa. As duas principais vias de biossíntese de AIA tem sido proposta para plantas; uma via dependente de triptofano (Trp) biossíntese do ácido 3-indol acetico (AIA), a partir do aminoácido triptofano e outra triptofano independente (WOODWARD; BARTEL, 2005; SPAEPEN et al., 2007; CHANDLER, 2009; NORMANLY, 2010) (Figura 1)

Figura 1. Descrição geral das diferentes vias de síntese dependente e independente de triptofano de AIA em bactérias. IAAld, Indol-3-acetaldeído; IAM, Indol-3-acetamida; IPCD, Indol-3-piruvato descarboxilase; Trp, Triptofano.



Fonte: Spaepen, Vanderleyden e Remans (2007).

Na biossíntese de AIA Trp-independente, o glicerol-3-indol fosfato ou indol é provavelmente o precursor, porém pouco é conhecido sobre a via bioquímica para AIA (OUYANG et al., 2000; ZHANG et al., 2008). Na biossíntese de AIA Trp-dependente, várias vias têm sido propostas: (i) via do Indol-3-Acetamida (IAM); (ii) via do Ácido Indol-3-

Pirúvico (IPA); (iii) via da Triptamina (TAM) e (4) via do Indol 3-Acetaldoxima (IAOX) (WOODWARD; BARTEL, 2005; POLLMANN et al., 2006; CHANDLER, 2009; MANO et al., 2010; NORMANLY, 2010; ZHAO, 2010).

O aminoácido L- triptofano, funciona como precursor fisiológico na biossíntese de auxinas em plantas e em micro-organismos (KHALID et al., 2004). Cinco diferentes vias utilizando o triptofano como precursor foram identificadas em bactérias: (i) via IAM, (ii) via IPA, (iii) TAM, (iv) via da Indol-3-Acetonitrila (IAN) e (v) via da Oxidase da Cadeia Lateral do Triptofano (TSO) (SPAEPEN et al, 2007).

Interações entre bactérias produtoras de AIA e plantas resultam em diferentes resultados, podendo variar de efeitos benéficos à patogenia. Quando secretado por bactérias, o fitormônio pode afetar de forma direta a morfologia das raízes, aumentando o comprimento e o número de pêlos radiculares ou, indiretamente, pela influência sobre a atividade da ACC desaminase (1-aminociclopropano-1-carboxilato, um precursor 13 do etileno) (PATTEN et al., 2002). Neste sentido, micro-organismos que sintetizam o AIA são considerados importantes promotores de crescimento vegetal, podendo melhorar o rendimento das culturas (ARKHIPOVA et al., 2005).

Evidências sobre a ação do AIA, no desenvolvimento radicular, foram obtidas pela inoculação de um mutante de *Azospirillum* deficiente na produção desse fitormônio (DOBBELAERE et al., 1999). Este aumento da raiz, facilita a captação de nutrientes pelas plantas e na liberação de exudatos. Estudos, demonstraram que a inoculação de mutantes espontâneos de *B. japonicum*, que produziam mais AIA resultou num aumento do volume do nódulo da raiz (KHALID et al., 2004).

Foram descritas, em *Azospirillum*, pelo menos três vias metabólicas responsáveis pela produção de AIA. Duas dessas vias são dependentes de triptofano, denominadas indole-3- acetamida (IAM) e indole-3-piruvato (IpyA). Já a terceira via é independente de triptofano (DOBBELAERE et al., 1999; LAMBRECHT et al., 2000).

O triptofano tem sido identificado como um precursor principal nas vias de biossíntese de AIA em bactérias. A transformação de triptofano em AIA pode ser realizada por micro-organismos que produzem uma conversão oxidativa quando o triptofano se encontra em presença de peroxidases e de radicais livres. As vias de sínteses do AIA se baseiam na evidência obtida a partir da presença de intermediários, atividade biológica e enzimas capazes de converter in vivo estes intermediários em AIA.

A produção destes reguladores já foi relatada em bactérias dos gêneros *Gluconacetobacter*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Methylobacterium*, *Erwinia*, *Pantoea* e *Pseudomonas* (CASSÁN et al., 2001, VERMA et al., 2001; KOENIG et al., 2002).

Chagas-Junior et al. (2009) avaliaram, em meio de cultura a produção de AIA de rizóbios isolados de solos da Amazônia, verificando que as 92 estirpes produziram AIA, sem a adição de triptofano, porém, em 52 isolados, a adição e a elevação da concentração de triptofano, aumentaram a produção do fitormônio.

2.8. Citocininas e giberelinas

Certas bactérias também podem produzir citocininas, substâncias conhecidas por induzirem processos mitóticos nas células vegetais e promovem o retardo do envelhecimento das plantas. Sintetizadas nas raízes, essas moléculas são transportadas para todas as partes da planta através do xilema. As citocininas podem ainda interagir com as auxinas e, desta forma, atuam sobre a formação de células precursoras do sistema vascular e aumentam a sensibilidade dessas células à auxina, induzindo de forma indireta o processo de diferenciação dos vasos e o desenvolvimento vegetal (OLIVEIRA et al., 2008), além disso, pode estimular ou inibir uma variedade de processos metabólicos, fisiológicos e bioquímicos em plantas superiores.

Elas estão envolvidas na regulação do crescimento e diferenciação, incluindo a divisão celular, dominância apical, formação de órgãos, retardamento da quebra de clorofila, desenvolvimento dos cloroplastos, senescência das folhas, abertura e fechamento dos estômatos, desenvolvimento das gemas e brotações, metabolismo dos nutrientes e como reguladores da expressão dos genes (VIEIRA; MONTEIRO, 2002). Entre as bactérias capazes de produzir citocininas pode ser mencionada a espécie *Pseudomonas fluorescens*, que produz elevadas concentrações deste fitormônio (GRAY; SMITH, 2005).

As giberelinas são hormônios sintetizados essencialmente nas raízes e nos brotos foliares, onde estimulam o crescimento de caules e folhas, mas, no entanto apresentam baixo efeito sobre o crescimento das raízes. Quando em associação com as auxinas, as giberelinas auxiliam no desenvolvimento dos frutos e junto à citocininas, executam um importante papel nos mecanismos voltados a germinação das sementes (ROSS et al., 2002). Bactérias como o *Bacillus sp.* produzem altos níveis de giberelinas que apresentam ação positiva no crescimento de caules e galhos de diversas plantas (GRAY; SMITH, 2005).

2.9. Indução de crescimento

As rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs) interferem positivamente no crescimento das plantas. Podem conferir as plantas: maior resistência às condições de estresse, alterações nas condições fisiológicas, proteção contra organismos patogênicos, solubilização de fosfato, promoção de crescimento diretamente pela produção de fitormônios, dentre outros.

As bactérias que vivem na rizosfera, ou seja, na região do solo sob influência das raízes, são capazes de promover o crescimento das plantas numa relação não simbiótica, trazem benefícios diretos para a produção agrícola, e ao mesmo tempo, uma alternativa de cultivo com menor uso de insumos agrícolas.

A promoção de crescimento pode ser resultado de diversos mecanismos como: controle biológico pela competição por nutrientes com o patógeno; produção de antibióticos; resistência induzida à doenças; produção de crescimento diretamente pela produção de fitormônios e aumento da disponibilidade de nutrientes pela fixação de nitrogênio ou solubilização de fósforo (WHIPPS, 2001).

Com o propósito de obter aumento no crescimento e rendimento das plantas, iniciou-se na Rússia e Ucrânia em 1885, pesquisas com as rizobactérias não simbióticas *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus megaterium* e outras espécies de *Bacillus*. Na época se contestou que a promoção de crescimento era devido à inoculação com as rizobactérias, devido a falta de identificação do mecanismo envolvido que justificassem os resultados (QUEIROZ, 2003).

Alguns pesquisadores detectaram a produção de reguladores químicos vegetais como o ácido giberélico e o ácido indol-acético por alguns micro-organismos em meio de cultura, sendo sugerida a sua produção como possível mecanismo na promoção de crescimento de plantas. Com os trabalhos de Burr et al. (1978) em batata e de Kloepper e Schroth (1978) em rabanete, ficou estabelecido a denominação rizobactérias promotoras de crescimento de plantas ou RPCP (Plant growth-promoting rizobacteria –PGPRs).

São encontrados também exemplos de bactérias endofíticas apresentando aumento em vários tipos de plantações, incluindo tomate (BASHAN et al., 1989b), batata (STURZ, 1995), milho (HINTON; BACON, 1995), pepino (VAN PEER; SCHIPPERS, 1989), arroz (HUREK et al., 1994) e algodão (BASHAN et al., 1989a). De acordo com Sturz (1995), aproximadamente 10 % de isolados benéficos recuperados de batatas mostraram promover crescimento. A inoculação de arroz com um endófito diazotrófico, *Azoarcus* sp linhagem BH72, resultou numa promoção de crescimento significativa (HUREK et al., 1994).

A capacidade das bactérias endofíticas em solubilizar fosfato inorgânico tem sido alvo de grande interesse por parte dos microbiologistas agrícolas, pois esta característica apresenta um grande potencial para a promoção de crescimento vegetal. É interessante ressaltar que as bactérias endofíticas com capacidade de solubilizar fosfato inorgânico ganham importância durante o processo de colonização, pois podem inicialmente colonizar superficialmente o hospedeiro e, conseqüentemente, provê-lo deste mineral essencial para o desenvolvimento vegetal (CERIGIOLI, 2005).

Para uma possível aplicação no campo, objetivando o aumento da produção agrícola, há um grande interesse no isolamento de linhagens bacterianas que apresentem mais de uma característica para a promoção de crescimento vegetal, como fixar nitrogênio e sintetizar auxina, solubilizar fosfato e produzir sideróforos ou produzir antibióticos e fixar nitrogênio (VERMA et al., 2001). Neste aspecto as bactérias endofíticas levam vantagem, pois estão sujeitas a uma menor competição e estão livres de predação dentro dos tecidos das plantas se comparado com o solo. Poucos trabalhos explorando estes aspectos foram realizados (CERIGIOLI, 2005).

Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivos: bioprospectar e isolar rizobactérias de cana-de-açúcar; avaliar suas potencialidades como promotoras de crescimento vegetal, utilizando os seguintes parâmetros: solubilização de fosfato, produção de fitormônios (ácido 3-indol acético, citocinina e giberelinas), tolerância ao estresse hídrico, produção de Exopolissacarídeos e biofilmes; avaliar os isolados quanto a potencial para

3. MATERIAL E MÉTODOS

As coletas de solo foram realizadas em áreas de Usinas sucroalcooleiras, no período de abril a junho de 2011. Foram realizadas vinte e quatro coletas de solo, sendo uma amostra de solo para cada usina sucroalcooleira.

As amostras de solo foram coletadas entre 0 a 20 cm de profundidade e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia Agrícola, no Centro de Ciências Agrárias – Universidade Federal de Alagoas, onde foram peneiradas para retirada de raízes, folhas e outros materiais.

Para o isolamento de bactérias de solo e rizosfera, 1 g de solo foi transferido para Erlenmeyers contendo 10 mL de tampão (0,8% NaCl) a solução foi submetida a agitação por 1 hora. Após agitação, foram realizadas diluições seriadas de 10^{-2} a 10^{-8} seguida de retirada de alíquotas de 100 μ L das diluições adequadas que foram semeadas em placas de Petri, contendo o meio NBRIP sólido (National Botanical Research Institute's Phosphate Medium) (NAUTIYAL, 1999), constituído de 10 g glicose; 5g $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$; 5g e $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0.25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.2 g KCl; 0.1 g e $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$; 1.5% de ágar e pH 7.0 para volume total igual a 1L. As culturas foram incubadas em placas de Petri em triplicata, por 5, 10 e 15 dias, a 28°C.

A confirmação do isolamento de bactérias com capacidade de solubilização de fosfato de cálcio foi realizada por meio da presença de um halo claro ao redor da colônia. Os isolados foram mantidos em meio de cultura Nutriente Agar (18g de ágar; 5g de Peptona; 3g de extrato de carne; 8 NaCl; para 1L, pH 7.2).

Para identificação (Tabela 1), os isolados selecionados foram cultivados em 10 mL de NA em tubos de vidro com 15 cm x 1,5 cm, com tampa de rosca, sob agitação de 142 rpm a 28°C durante 48 horas. Cada cultura líquida foi centrifugada a 13000rpm por 5 minutos em temperatura ambiente, utilizando-se a centrífuga Eppendorf (mod. 5415C), sendo o sobrenadante descartado. O DNA genômico total foi extraído, através de kit de extração GFX (GE) seguindo-se as instruções do fabricante, e quantificado em gel de agarose a 1% em tampão Tris Acetato EDTA (TAE) e corado com brometo de etídio a 0,5 μ g/ml. Para comparação e quantificação foi utilizado o marcador 1Kb (Ludwig Biotec) e em seguida o DNA foi visualizado em transluminador UV e documentado com um sistema digital (DigiDoc-It® Imaging System).

Tabela 1. Identificação das bactérias com capacidade para solubilização de fosfato isolados em meio NBRIP, pela sequencia parcial dos genes 16SrRNA

Nº dos Isolados	Gênero	Espécie	GenBank
1	-	-	-
2	-	-	-
3	-	-	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	-	-
7	<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i>	KT998648.1
8	<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i>	KT998651.1
9	<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i>	KT998649.1
10	<i>Bacillus</i>	<i>megaterium</i>	KT998652.1
11	-	-	-
12	<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>	KT998653.1
13	-	-	-
14	-	-	-
15	-	-	-
16	<i>Paenibacillus</i>	<i>lautus</i>	KT998650.1
17	<i>Pseudomonas</i>	sp.	KT998654.1
18	-	-	-
19	-	-	-
20	<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>	KT998655.1
21	-	-	-
22	-	-	-
23	<i>Bacillus</i>	<i>pumilus</i>	KT998656.1
24	-	-	-

- Não identificado

3.1. Solubilização de fosfatos inorgânicos ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)

3.1.1. Avaliação qualitativa

Os isolados foram submetidos a avaliação em meio NBRIP sólido suplementado com 1.5% de ágar (NAUTIYAL, 1999). Foram realizadas medições no 5º, 10º e 15º dia após a inoculação com repiques pontualmente equidistantes em triplicata nas placas de Petri. Este método é baseado na adição de fosfato inorgânico (PCA), produzindo um halo translúcido ao redor das colônias. Foi mensurado o diâmetro da colônia e do halo da colônia, através de paquímetro digital, sendo calculado o índice de solubilização (IS) por meio da razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia (BERRAQUEIRO et al. 1976).

A solubilização foi classificada de acordo com os índices obtidos (IS menor que 2 é igual a baixa solubilização; IS entre 2 e 3 é igual a média solubilização; IS maior que 3 é igual a uma alta solubilização) (SILVA FILHO; VIDOR, 2000).

3.1.2. Avaliação quantitativa

A análise quantitativa da solubilização de P-Ca foi realizada de acordo com Nautiyal (1999), tubos de ensaio contendo 10mL do meio líquido NBRIP e foram inoculados em triplicata com 100 μ L de inóculo bacteriano (10^8 UFC.mL⁻¹(DO₅₅₀ = 0,1)), sendo o pH ajustado para 7,0 antes da autoclavagem. O controle constituiu-se de tubos com 10mL de meio NBRIP sem inóculo. Todos os tubos foram incubados por 15 dias a 28°C em agitação a 180 rpm.

Decorrido o tempo de incubação, 1000 μ L de cada amostra foram transferidas para microtubos de 1,5 mL, que foram centrifugados a 10000 rpm por 5 minutos. Então, 145 μ L de cada amostra foram adicionados 570 μ L de água destilada e 285 μ L do reagente molibdato-vanadato de amônio (5% molibdato de amônio e 0.25% vanadato de amônio; 1:1, v/v)

Para obtenção da curva padrão, foi preparada uma solução estoque de KH₂PO₄ (0.0875%) (0.1 mg P.mL⁻¹), de onde foram retiradas alíquotas de 1 mL até 10 mL, que foram misturadas com 2.5mL do reagente molibdato-vanadato de amônio para um volume final de 50mL. Após 10 minutos da adição do reagente, as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 420nm (modelo UV-1601 PC, Shimadzu) (MALAVOLTA, 1989; SILVA, 1999). Para o controle negativo em espectrofotômetro, utilizou-se a solução sem inóculo, constituída de 145 μ L do meio NBRIP, adicionado de 570 μ L de água destilada e 285 μ L do reagente molibdato – vanadato de amônio.

O espectrofotômetro foi zerado utilizando-se o controle negativo constituído de 145 μ L do meio NBRIP sem inóculo, 570 μ L de água destilada e 285 μ L do reagente molibdato-vanadato de amônio.

Os experimentos foram realizados em triplicata e o resultado positivo foi evidenciado pela formação de uma coloração amarelada. Os resultados obtidos em absorvância (valores de x), foram convertidos em concentração de P (μ g.mL⁻¹) (y) por meio da equação $y = (0.3041x^2 + 0.2566x + 0.0213) * 1000$. Os isolados foram classificados de acordo com os seguintes índices: Ausência de solubilização (-); baixa solubilização (<50 μ g.mL⁻¹); média solubilização (50-100 μ g.mL⁻¹); alta solubilização (101 -500 μ g.mL⁻¹) e elevada solubilização (>501 μ g.mL⁻¹).

Em paralelo foi aferido o pH das soluções bacterianas, para isso uma alíquota de 10 mL foi retirado das mesmas. O meio líquido foi separado das células bacterianas por filtração em papel de filtro Whatman 42. O filtrado foi usado para determinação do pH (EMBRAPA, 1999). Foram utilizados frascos controle não inoculados, que tiveram o pH e conteúdo de P

solúvel em água determinados logo após autoclavagem e a cada intervalo posterior. Valores obtidos com os controles não inoculados foram subtraídos dos respectivos tratamentos inoculados.

3.1.3.pH

Foi retirada uma alíquota de 10 mL do meio de cada erlenmayer. O meio líquido foi separado das células bacterianas por filtração em papel de filtro whatman 42. O filtrado foi usado para determinação do pH (EMBRAPA, 1999). Foram utilizados frascos controle não inoculados, que tiveram o pH e conteúdo de P solúvel em água determinados logo após autoclavagem e a cada intervalo posterior. Valores obtidos com os controles não inoculados foram subtraídos dos respectivos tratamentos inoculados.

3.2. Crescimento em meio com reduzida atividade de água

Os 24 isolados bacterianos foram semeados em superfície, em placas de Petri de 150 mm de diâmetro em triplicata, contendo meio de cultura TSA (10%) suplementado com sorbitol (405 g^{-1}) a 28° C , produzindo valor de A_w correspondente a 0,919 (considerando que é atividade de água mínima para a maioria das bactérias).

3.2.1. Avaliação quantitativa de EPS

As avaliações de EPS foram realizadas de acordo com Paulo (2010), $5 \mu\text{L}$ dos isolados crescidos em meio Tryptone Soya Broth (TSB) (10%) ajustado para 10^9 células mL^{-1} ($\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,2$) foi inoculado em discos de papel de filtro esterilizados de 5 mm \varnothing , depositados sobre a superfície do meio de cultura modificado por Guimarães et al., (1999) (2% de extrato de levedura, 1,5 % de K_2HPO_4 , 0,02% de MgSO_4 , 0,0015% de MnSO_4 , 0,0015% de FeSO_4 , 0,003% de CaCl_2 , 0,0015% de NaCl , 1,5% de agar e 10% de sacarose), adicionado de 10% de frutose, glicose e sacarose em valores de pH de 5.5 e 7.5.

As culturas foram incubadas a 30° C durante 48 h em placas de petri em triplicata e a produção de EPS foi observada com base na formação de uma camada mucóide ao redor dos discos de papel de filtro inoculados com as bactérias. A produção de EPS foi caracterizada visualmente mediante medida de halo do EPS produzido, sendo atribuído + a pouca produção de EPS, halo $\leq 10\text{mm}\varnothing$, ++ média produção de EPS halo entre 10- 14mm \varnothing e +++ ótima produção de EPS, halo $\geq 14\text{mm}\varnothing$. A confirmação da produção de EPS foi realizada pelo método químico, a camada mucóide foi removida com uma alça de platina e

misturada em dois mL de etanol absoluto, a formação de um precipitado confirma a presença de EPS (PAULO 2010).

3.2.2. Avaliação qualitativa de EPS

A confirmação da produção de EPS foi realizada pelo método químico, adicionando-se a 8ml de solução contendo os isolados 2ml de álcool etílico.

3.3. Biofilme

3.3.1. Formação de biofilme em superfície abiótica

Foram inoculados 100µL dos isolados bacterianos crescidos em meio TSB (10%) (10^6 UFC.mL⁻¹) em microtubos de polipropileno com 900µL de meio TSB + 10% de sacarose, em triplicata. Todos os inócuos foram calibrados pela escala de Mac Farland. Após a incubação a 40°C por 96 horas, as células planctônicas foram removidas e cada tubo foi lavado duas vezes com água destilada, seguida da adição de 25µL de cristal violeta a 0.1% em cada microtubo. Após 15 minutos de incubação a temperatura ambiente, os microtubos foram lavados mais duas vezes com água destilada (adaptado de O'TOOLE e KOLTER, 1998).

3.3.2. Quantificação da formação de biofilme em superfície abiótica

A formação de biofilme foi quantificada mediante a adição de 400µL de álcool etílico (95%), acrescidos de 600µL de água destilada, formando um volume de 1000µL em cada microtubo para a solubilização do cristal violeta incorporado à parede. A densidade óptica (DO) do corante solubilizado foi determinada em espectrofotômetro (modelo SP-22) a 540nm.

3.4. Ácido Indolacético (AIA)

3.4.1. Avaliação qualitativa da produção de ácido indolacético

A análise foi realizada em triplicata de acordo com a metodologia de produção qualitativa de AIA na presença do precursor L-triptofano. Os isolados foram cultivados em meio de cultura Nutriente Agar (NA) e inoculados com o auxílio de uma alça de platina em placas de Petri contendo meio TSA enriquecido com 5mM de L-triptofano, e cobertas com uma membrana de nitrocelulose previamente esterilizada.

As culturas foram incubadas por 48h em temperatura ambiente. Após esse período, as membranas foram retiradas das placas com uma pinça estéril e transferidas para placas, onde foram saturadas com solução de Salkowski (7.9 mol. L⁻¹ de H₂SO₄ e 12g FeCl₃) e incubadas no escuro a temperatura ambiente por um período de 30 minutos a 2h, onde a estimativa colorimétrica foi verificada através da observação da halo róseo-avermelhado da membrana de nitrocelulose, logo após o tratamento.

3.4.2. Avaliação quantitativa da produção de ácido indolacético

Tubos de ensaio com 10mL do meio TSB (10%) suplementado com 5mM de L-triptofano foram inoculados em triplicata com 100µL de inóculo bacteriano (10⁸ UFC.mL⁻¹ (DO_{550nm} = 0,1)), método calorimétrico descrito por Gordon e Weber (1951). As culturas foram acondicionadas a 28°C no escuro, sob agitação constante durante 72 horas. Logo após, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm durante 10 minutos para obtenção do sobrenadante.

A quantidade de AIA por mL de cultura foi estimada por meio da mistura de 750µL do reagente de salkowski (7.9 mol. L⁻¹ de H₂SO₄ e 12g FeCl₃) com 750µL do sobrenadante, incubados por 30 minutos no escuro, seguido da leitura da densidade ótica a 530nm em espectrofotômetro (modelo SP – 22) (HARTMANN et al., 1983). O resultado positivo foi demonstrado pela formação da cor rósea. A concentração do AIA no meio de cultura (y) foi determinada pela comparação com uma curva padrão, utilizando-se AIA comercial, por meio da equação $y = 34.507x^2 + 43.802x + 0.843$, onde x equivale aos valores da absorbância obtidos.

Os isolados foram classificados de acordo com Hartmann et al. (1983) que estabelece os seguintes parâmetros para produção de AIA: baixa produção (<1µg.mL⁻¹); média produção (1-10µg.mL⁻¹); alta produção (11-50µg.mL⁻¹) e elevada produção (>51µg.mL⁻¹).

3.5. Produções de citocininas e giberelinas

Foi utilizado o método adaptado do bioensaio do cotilédone de rabanete para determinação de citocininas descrito por Letham (1971). O método permite a detecção de citocininas e giberelinas ao mesmo tempo.

Para a produção de giberelinas e citocininas foram utilizados cotilédones e hipocótilos de pepino. As sementes foram germinadas em placas de Petri contendo papel filtro previamente esterilizado e umedecido, incubadas no escuro à temperatura ambiente

por um período de 72h. Foram selecionados os cinco menores cotilédones e colocados em placas de Petri com papel filtro umedecido do inóculo de cada isolado com a parte das nervuras voltadas para baixo, junto com 5mm de hipocótilos. O inóculo constou de 1mL de cada isolado, crescidos em meio Caldo Nutriente durante 48h sob agitação constante a rotação 15000rpm. Para as testemunhas, foi utilizada caldo nutriente esterilizado. Os tratamentos foram incubados em temperatura ambiente sob luz fluorescente fraca contínua.

Após três dias, os cotilédones e hipocótilos foram secados com papel absorvente, pesados e medidos em balança analítica, onde o peso foi comparado com aquele da testemunha. Os isolados que produzem citocininas favorecem o ganho de peso dos cotilédones embora não favoreçam o crescimento dos hipocótilos, enquanto os isolados que produzem giberelinas tanto favorecem o ganho de peso dos cotilédones quanto o aumento do comprimento dos hipocótilos (CATTELAN, 1999).

3.6. Indução de enraizamento e brotação de gemas de cana-de-açúcar

Minitoletes de tamanho e diâmetro similares, contendo uma gema foram retirados do terço superior de colmos da variedade RB92579 com 12 meses de idade, fornecidos pela Usina Santa Clotilde, localizada no município de Rio Largo-AL. Esta variedade ocupa mais de 50 % da área plantada com cana-de-açúcar no nordeste do país e cerca de 10% da área plantada de cana-de-açúcar no Brasil. Apresenta as seguintes características: maturação média; alto teor de sacarose; boa brotação; alto perfilhamento em cana-planta e soca; bom fechamento de entrelinhas; alta produtividade agrícola e não apresenta restrição a ambiente de produção (BARBOSA et al., 2003).

Foram selecionados os minitoletes com as melhores gemas (mais jovens e vigorosas). Após a seleção, foi realizado um processo de assepsia, por imersão em álcool 70% por 15 minutos, hipoclorito de sódio 2% por 5 minutos e tríplice lavagem com água destilada esterilizada.

Os minitoletes gemas foram então postos em potes tipo *Babbyfood* contendo 100mL de meio Agar-Água semi-sólido (0,5%), na ausência de qualquer nutriente. Em seguida, 1mL de cada isolado, crescidos em meio Caldo Nutriente durante 48h sob agitação constante a rotação 15000 rpm, foram inoculados nas gemas, com quatro repetições e incubados a temperatura ambiente durante 15 dias sob 12h de luz e 12h na ausência de luz. O controle constou da adição ao minitolete de 1mL de caldo nutriente esterilizado.

A observação da colonização foi feita visualmente 15 dias após a semeadura, considerando-se que a presença de colônia turva de aspecto esbranquiçado ao longo e em volta da raiz, demonstra a formação de colônia. Foi considerado como positivo, o crescimento em três dos quatro potes, e como negativo a ausência do crescimento em três ou quatro. O registro como colonização parcial foi feito quando houve crescimento em dois potes. Após o período de incubação foram avaliadas a indução de enraizamento e emissão de folhas. Os dados obtidos foram transformados em $\arcsen \sqrt{\%x/100}$.

3.7. Análise Estatística

Para os ensaios de produção de biofilme, citocinina e giberelina e colonização de gema e emissão de raiz e folhas, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado. Para os ensaios de solubilização de fosfato (qualitativo e quantitativo), alteração de pH, produção de ácido indol-acético e produção de EPS foi empregado o delineamento inteiramente casualizado, organizados em arranjo fatorial. Foram verificadas as pressuposições para a realização de ANOVA, avaliando-se anormalidade e homogeneidade das variâncias pelos testes de Lilliefors e Cochran respectivamente. Os dados não homogêneos foram transformados e submetidos à análise de variância aplicando-se o teste F ($P < 0,05$) e as médias comparadas pelo teste aglomerativo de Scott-Knott ($P < 0,05$) que visa à separação de médias de tratamentos em grupos distintos, por meio da minimização da variação dentro e maximização da variação entre grupos, gerando resultados de maior objetividade e clareza. Quando necessário, foi aplicada a análise de regressão polinomial. Utilizou-se o software estatístico Assistat 7.6 beta (SILVA; AZEVEDO, 2002).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos vinte e quatro isolados com formação de um halo transparente ao redor da colônia cultivada em meio sólido, indicando atividade de metabolização de fontes de fosfato inorgânico adicionado ao meio de cultura.

4.1. Solubilização de fosfatos inorgânicos $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

As análises de variância detectaram diferenças significativas ($p < 0,01$) entre isolados bacterianos, tempo de incubação e para interação, indicando dependência entre os dois fatores: solubilização e o tempo.

Dos 24 isolados obtidos, 4,16% não apresentaram halo de solubilização (Tabela 2). Os demais isolados (95,84%) apresentaram formação de halo de solubilização. Destes, 4,34% apresentaram baixa solubilização com IS variando de 0,80 a 1,49; 73,9% obtiveram um índice médio de solubilização (IS 2,83 a 3,01), 21,73% obtiveram um alto índice de solubilização, destacando-se os isolados 13, 19 e 20 com IS de 8,30, 6,58 e 12,11 respectivamente. Com relação ao fator tempo os melhores resultados foram verificados aos 15 dias de incubação, exceto para os isolados 14,20 e 21 (Tabela 2).

Vários autores também verificaram a solubilização de fosfatos em meio sólido, Pedrinho et al. (2010) avaliaram 58 isolados de raízes de plantas de milho híbrido coletado com 153 dias, em Vargem Grande do Sul (SP) e somente em 27 deles demonstraram capacidade para solubilizar fosfato em meio sólido, da mesma forma Kishi et al. (2012) ao analisarem 60 isolados obtidos de três áreas de plantação de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo, e constataram que apenas 10 apresentaram elevada solubilização de fosfato 15 dias após a inoculação.

Segundo Nautiyal (1999), alguns isolados podem ser capazes de solubilizar fosfato, porém, muitas vezes não o fazem em meio sólido. O estado físico do meio de cultura e a agitação podem ser fatores que influenciam esses resultados. De acordo com Delvasto et al. (2006), o coeficiente de difusão em meio sólido dos ácidos produzidos pelas bactérias é diferente, de acordo com o ácido produzido e com meio de cultura, assim, em meio líquido este problema não existe, fazendo com que as medições sejam mais exatas. Desta forma, todos foram avaliados quantitativamente com relação à solubilização de fosfato em meio NBRIP líquido. Os solos do Nordeste tendem a ser levemente ácidos ou alcalinos sendo o P associado a Ca, por isso a escolha do meio NBRIP com $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

Tabela 2 Eficiência da solubilização de fosfato em meio NBRIP sólido indicada pelo índice de solubilização (IS) calculado pela razão entre a média do diâmetro dos halos e a média dos diâmetros das colônias de cada isolado após 5, 10 e 15 dias de incubação. Médias obtidas de três repetições.

Isolados	Tempo de Incubação (Dias)*		
	5	10	15
1	1.3652 cA	1.4526 dA	1.4904 eA
2	2.8383 bA	3.3393 cA	3.0892 dA
3	1.4344 cA	1.2250 dA	1.4871 eA
4	0.0000 dA	0.0000 dA	0.0000 fA
5	1.3227 cA	1.2500 dA	1.1545 eA
6	1.2897 cA	1.4960 dA	1.3833 eA
7	1.2579 cA	1.3063 dA	1.3877 eA
8	0.8750 cA	1.0560 dA	1.0583 eA
9	0.8043 cA	1.0676 dA	1.2484 eA
10	1.4066 cA	1.4322 dA	1.4632 eA
11	1.1309 cA	1.1174 dA	1.1065 eA
12	0.8286 cA	1.0914 dA	1.1201 eA
13	1.1742 cB	1.0604 dB	8.2983 bA
14	1.8206 cA	1.8471 dA	0.0000 fB
15	1.1310 cA	1.2333 dA	1.0897 eA
16	1.3076 cA	1.1481 dA	1.1196 eA
17	1.2556 cA	1.0912 dA	1.2540 eA
18	0.8148 cA	0.8360 dA	0.8519 eA
19	0.0000 dC	10.0556 aB	12.1111 aA
20	2.8153 bC	6.5790 bA	5.7041 cB
21	4.7047 aA	2.6013 cC	3.4749 dB
22	1.3504 cA	1.3598 dA	1.3167 eA
23	1.3301 cA	1.1656 dA	1.2163 eA
24	1.1802 cA	1.1501 dA	1.2241 eA

* As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, Teste de Scott-Knott ($p < .05$). Colunas - letras minúsculas; Linhas - letras maiúsculas

A presença de fósforo solúvel em meio NBRIP foi evidenciada pela formação de uma coloração amarelada (Figura 2). Os isolados bacterianos constituíram o único fator estatisticamente significativo ($P < 0,01$) na solubilização de fosfato inorgânico em meio NBRIP líquido, não foram detectados efeito do tempo de incubação ou da interação.

Na figura 3, estão apresentados os resultados da análise quantitativa em $\mu\text{g.mL}^{-1}$, a solubilização do P se manteve constante no período avaliado solubilização para todos os isolados. A quantidade média de fósforo solúvel ao final do ensaio, variou de zero a 992,32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As maiores concentrações de P solubilizado foram encontradas no isolado 20 e 19 (992,32 e 562,00 respectivamente).

Solubilizar grandes quantidades em pouco tempo no meio NBRIP, além de manter a capacidade de solubilização constante no período avaliado, é uma característica importante para seleção de isolados que possam ser utilizados na produção de inoculantes.

Comparando-se os resultados obtidos nos meios líquido (método quantitativo) e sólido (semi-quantitativo), observa-se sub-estimativa da solubilização real por este último em alguns casos. Os isolados 9 e 18, que apresentaram baixos índice de solubilização (Tabela 1) no meio sólido, demonstraram alta solubilização (IS 101 -500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) em meio líquido (Figura 3). Resultados semelhantes foram encontrados por Alikhani et al., (2006), os autores observaram que isolados com pouca capacidade de solubilização em meio sólido, foram capazes de apresentar ótimos significativos quando inoculados em meio líquido.

Os resultados obtidos para os 24 isolados demonstraram que 4.17% não solubilizaram fosfato tricalcico (Figura 4), em 4.16% a concentração de fósforo solúvel foi menor de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 66,66% dos isolados estiveram entre 50-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Para 16,66% dos isolados, verificou-se solubilização 101-500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ os demais (8,33%) apresentaram elevada capacidade de solubilização, com índice maior que 501 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

As bactérias solubilizadoras de fosfato são capazes de solubilizar formas insolúveis de fósforo, tornando-o disponível para o crescimento das culturas sendo uma característica exibida por muitos micro-organismos do solo ou em associação epifítica ou endofítica com plantas. A baixa fertilidade de solos ácidos é principalmente devido à transformação de formas solúveis de P em formas de baixa solubilidade, ou seja, o fósforo biodisponível encontrar-se em concentrações muito baixas ou liga-se facilmente a cátions como outros elementos.

Figura 2. Concentração de Fósforo solúvel $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em meio NBRIP líquido inoculado pelos isolados após 15 dias de cultivo.



1) ausência de solubilização (-); 2) $< 50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (+) (baixa solubilização); 3) $50-100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (++) (média solubilização); 4) $101-500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (+++) (alta solubilização); 5) $> 501 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (++++) (elevada solubilização) de P-Ca.

Essas bactérias mobilizam fosfatos inorgânicos insolúveis, a partir de uma matriz mineral do solo, de forma que possa ser absorvido pelas raízes da planta. As BSF solubilizam o fosfato insolúvel pela produção de ácidos orgânicos no meio em que o micro-organismo se desenvolve, cuja ação tem sido atribuída às suas propriedades quelantes, possibilitando a formação de complexos estáveis com os íons Ca^{+2} , Fe^{+3} e Al^{+3} (VENIERAKI et al., 2010). Com esta síntese, o pH do solo é reduzido, sendo posteriormente o fósforo orgânico mineralizado por meio de fosfatases ácidas (KHAN et al., 2009).

Vários autores relatam a produção de ácidos orgânicos como ácido cítrico, ácido glucônico, ácido succínico, ácido láctico e ácido propiônico por *Bacillus megaterium*, *Rhodococcus erythropolis*, *Arthrobacter* sp., *Arthrobacter ureafaciens*, *Serratia marcescens*, *Delftia* sp., *Chryseobacterium* sp., *Phyllobacterium myrsinacearum*, *Gordonia* sp. (CHEN et al. 2006; ZAIDI et al. 2009; WU et al., 2012). Os autores ainda citam outros mecanismos relacionados à solubilização de fosfato como produção de ácidos inorgânicos, produção de exopolissacarídeos, produção de H_2S , produção de fosfatases ácidas e fitases e

Figura 3. Solubilização de fosfato em meio NBRIP líquido, em quinze dias de cultivo por isolados de bactérias. Valor de cada ponto representa média de nove repetições subtraindo-se a média do P solubilizado do tratamento sem inoculação.

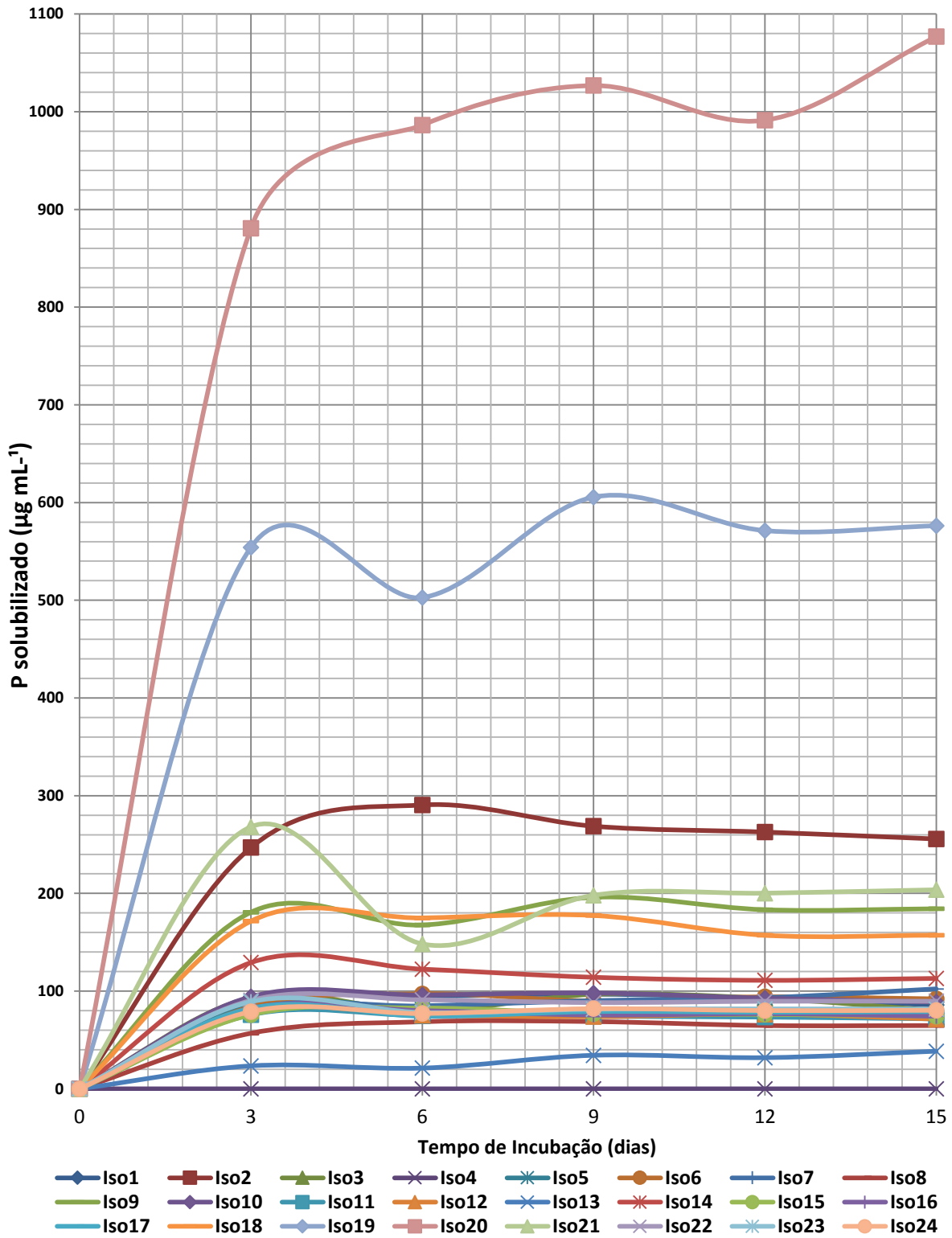
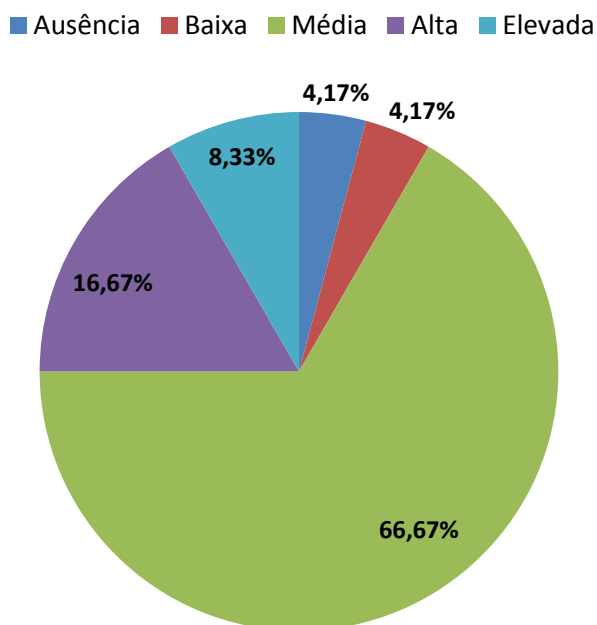


Figura 4. Frequência de isolados bacterianos quanto a solubilização de fosfato tricalcico em meio NBRIP líquido, sob cultivo por quinze dias, de acordo com a concentração de P solúvel detectado; baixa solubilização ($< 50 \mu\text{g.mL}^{-1}$); média solubilização ($50\text{-}100 \mu\text{g.mL}^{-1}$); alta solubilização ($101\text{-}500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e elevada solubilização ($> 501 \mu\text{g.mL}^{-1}$)

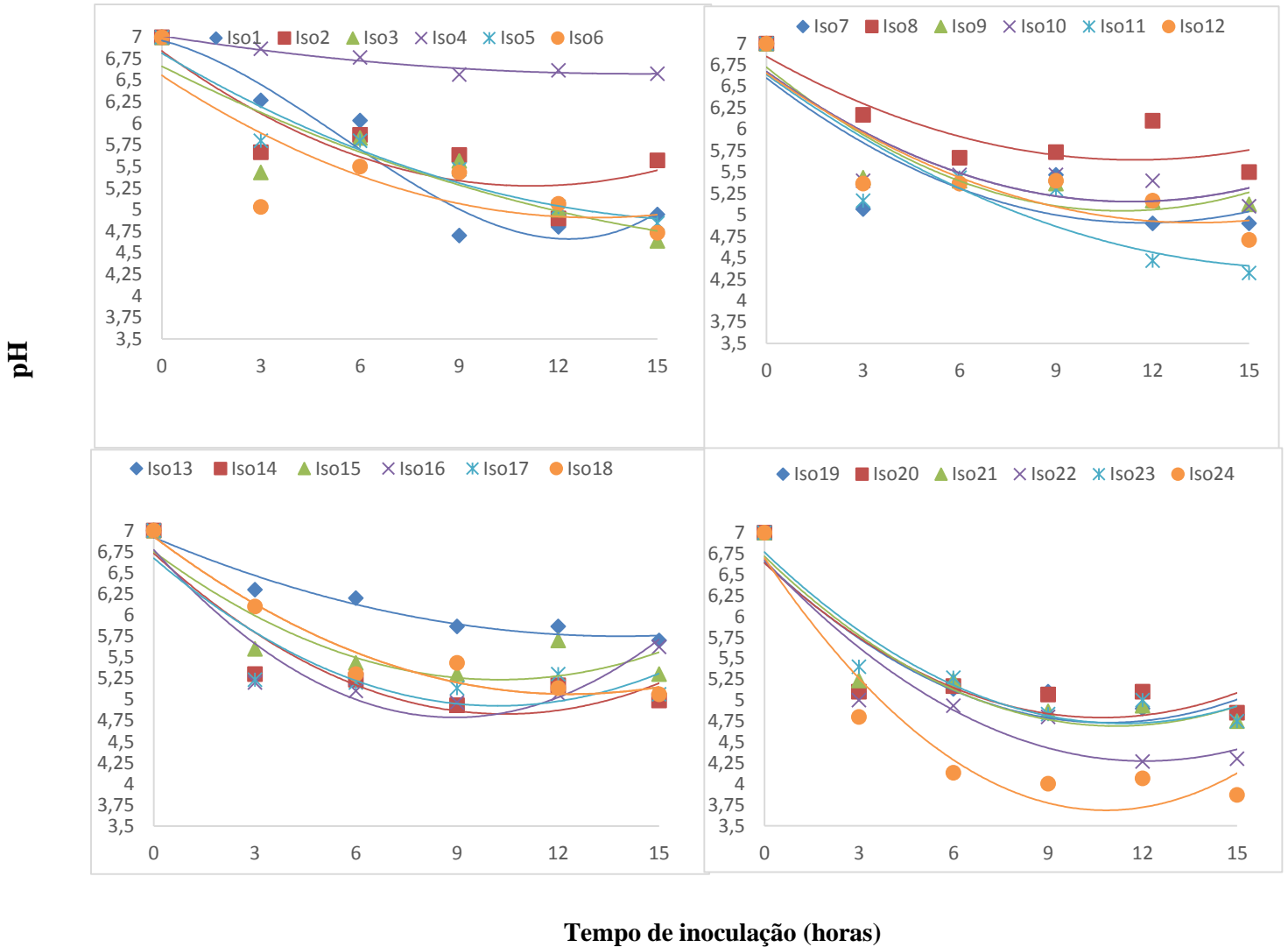


Os isolados testados apresentaram redução significativa de pH ao longo do período de avaliação, exceto para o isolado 4. A inoculação promoveu redução já aos 3 dias, uma vez que o pH do meio NBRIP no início do experimento era de 7,0. Apesar da variação nos valores de acidificação promovida por cada isolado ter sido distinta o comportamento geral foi semelhante (Figura 5).

Alguns isolados (2, 5, 8, 9, 10, 14, 16, 17, 19, 20) permaneceram com o pH em níveis estáveis o que provavelmente manteve o P solubilizado também em níveis constantes ao longo do tempo. Essa característica tem sido observada em estipes padrão, e tem sido ressaltada como desejável para utilização como inoculantes. Autores que avaliaram solubilização de fósforo por estirpes padrão demonstraram este comportamento constante dos níveis de pH (ALIKHANI et al., 2006; NARSIAN et al., 2009).

Alteração de pH no meio é um indicador da atividade metabólica da célula, a produção de ácidos orgânicos tem sido considerada um dos principais mecanismos, que atuam na solubilização de fosfato inorgânico. Pérez et al. (2007) verificaram que isolados de bactérias solubilizadoras de fosfato, que foram capazes de solubilizar quase completamente $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, em culturas líquidas acidificaram o meio. Os resultados corroboram com o trabalho de Yu et al. (2012), que encontrou forte correlação entre o pH e a concentração de P solúvel.

Figura 5. Evolução do pH do meio de cultura NBRIP durante 15 dias de incubação com isolados bacterianos. Valor de cada ponto representa média de três repetições subtraindo-se a média da redução do pH no tratamento sem inoculação.



Isolado	F	R2	Equação
Iso1	53.23**	0.999	$y=7.00000-1.38699x+0.70007x^2-0.13516x^3$
Iso2	16.50**	0.999	$y=7.0000-1.07203x+0.28786x^2-0.02895x^3$
Iso3	23.89**	0.990	$y=6.98865-1.14038x+0.28696x^2-0.02686x^3$
Iso4	15.10**	0.949	$y=7.01458-0.06078x+0.0020x^2$
Iso5	24.32**	0.996	$y=6.99341-0.77135x+0.17144x^2-0.01587x^3$
Iso6	36.07**	0.988	$y=6.98769-1.38404x +0.33140x^2+0.02933x^3$
Iso7	42.16**	0.999	$y=6.99894-1.42741x+0.34809x^2-0.03163x^3$
Iso8	17.58**	0.999	$y=6.99802-0.22165x-0.04113x^2+0.00907x^3$
Iso9	49.52**	0.999	$y=6.99652-0.98463x+0.20272x^2-0.01685x^3$
Iso10	312.72**	0.999	$y=7.00000-1.27481x+0.36512x^2-0.04727x^3$
Iso11	283.18**	0.999	$y=6.99797-1.37715x+0.34590x^2-0.03273x^3$
Iso12	24.25**	0.967	$y=6.93756-0.69254x+0.08844x^2-0.00349x^3$
Iso13	41.35**	0.951	$y=6.91904-0.16873x+0.0060x^2$
Iso14	116.44**	0.999	$y=7.0000-1.55537x+0.52968x^2-0.08283x^3$
Iso15	66.33**	0.999	$y=7.00000-1.18278x+0.38533x^2-0.06132x^3$
Iso16	178.50**	0.999	$y=7.00000-1.42555x+0.41965x^2-0.05886x^3$
Iso17	107.38**	0.999	$y=7.0000-1.43935x+0.43399x^2-0.06146x^3$
Iso18	30.88**	0.950	$y=6.92693-0.30152x+0.01219x^2$
Iso19	224.99**	0.997	$y=6.99401-1.20310x+0.251267x^2-0.02088x^3$
Iso20	57.94**	0.987	$y=6.98750-1.12314x+0.21802x^2-0.01679x^3$
Iso21	86.79**	0.999	$y=7.00000-1.65926x+0.57052x^2-0.08804x^3$
Iso22	186.20**	0.961	$y=7.00931-1.18005x+0.18991x^2-0.01033x^3$
Iso23	96.92**	0.999	$y=7.0000-1.50185x+0.52762x^2-0.08510x^3$
Iso24	431.29**	0.998	$y=6.97778-0.97919x+0.10282x^2-0.00342x^3$

No entanto, a solubilização nem sempre é correlacionada à redução do pH. Conforme se observa na Figura 5, os valores de pH de vários isolados, durante o período de incubação, coincide com os isolados 19 e 20, que apresentaram a maior quantidade de fósforo solúvel, este resultado indica que, outros fatores além da acidificação, estão associados ao processo de solubilização de fosfatos por bactérias, (BEHERA et al., 2014) e ainda, que diferentes isolados ou estirpes podem ter mecanismos geneticamente distintos que prevaleçam sobre outros no processo, pode ocorrer solubilização ainda sem a produção de ácidos, pela liberação de prótons resultantes da assimilação de NH_4^+ .

4.2. Crescimento em meio com reduzida atividade de água

Dos 24 isolados, 75% foram capazes de crescer em meio com atividade de água reduzida (0,919 A_w , a 30°C) (Tabela 3), o aparecimento de colônias foi observado cinco dias após a inoculação.

A água é um componente fundamental no metabolismo de todos os seres vivos e facilita muitas reações biológicas vitais por ser solvente, meio de transporte e agente de refrigeração (MUNDREE et al., 2002). O déficit hídrico, desidratação celular ou ainda estresse osmótico são termos usados na literatura para definir a falta de água que causa mudanças na turgescência da célula (HMIDA-SAYARI et al., 2005).

A melhoria dos cultivos em condições de estresse pode ocorrer com a utilização de tecnologias como a aplicação de bactérias capazes de promover crescimento vegetal ou alterações fisiológicas benéficas às plantas.

A presença de bactérias pode levar à produção de substâncias osmorreguladoras pela planta e assim atuar de forma sinérgica, colaborando na tolerância à seca (DIMKPA et al. 2009). Também, podem induzir ou ser mediadoras de tolerância a estresses abióticos como salinidade, seca, inundações, temperaturas muito altas ou baixas, deficiência de nutrientes e metais tóxicos (DIMKPA et al., 2009).

Bactérias podem ainda produzir substâncias osmotolerantes, como, por exemplo, glicina-betaína que pode atuar sinérgicamente com os outros compostos vegetais na redução do potencial hídrico das células, ajudando na tolerância à seca (DIMKPA et al. 2009). Ainda, bactérias osmotolerantes, capazes de sintetizar solutos ou osmólitos que aumentam a osmolaridade citoplasmática e conferem estabilidade osmótica às células, são usadas como inoculantes em plantas e parecem também influenciar positivamente as plantas em condições de estresse hídrico (YUWONO et al., 2005).

Tabela 3. Crescimento de isolados bacterianos em cinco dias de incubação, em meio em TSA (10%) suplementado com sorbitol, produzindo o valor de 0,919A_w a 28°C. Média de três repetições.

Isolados	Crescimento
1	POSITIVO
2	POSITIVO
3	POSITIVO
4	POSITIVO
5	POSITIVO
6	NEGATIVO
7	POSITIVO
8	NEGATIVO
9	NEGATIVO
10	POSITIVO
11	NEGATIVO
12	POSITIVO
13	POSITIVO
14	POSITIVO
15	POSITIVO
16	POSITIVO
17	NEGATIVO
18	POSITIVO
19	POSITIVO
20	POSITIVO
21	POSITIVO
22	POSITIVO
23	POSITIVO
24	POSITIVO

Essas bactérias são capazes de promover crescimento em massa de matéria seca de raiz e parte aérea em plantas de arroz submetidas a estresse hídrico com efeitos mais significativos entre plantas tratadas e controle em condições hídricas mais severas (YUWONO et al., 2005).

Trabalhos com inoculação de bactérias mostraram que plantas tratadas possuíam potencial hídrico mais elevado do que as plantas controle sob estresse hídrico (CREUS et al., 2004), garantindo assim vantagens na regulação do balanço hídrico. A inoculação dessas bactérias em plantas pode ainda aliviar os efeitos negativos causados por estresse, garantindo maior fotossíntese e abertura estomática (HAN; LEE, 2005).

CREUS et al. (2004), em trabalho com plantas de trigo inoculadas com *Azospirillum*, relataram que plantas tratadas possuem maior hidratação, potencial hídrico e fração de água apoplástica maiores do que plantas controle em condições de estresse, podendo ocorrer o

ABA, também relacionado a sinais antiestresses, principalmente estresse hídrico, estimula o fechamento dos estômatos.

A produção de prolina pode ser estimulada nas plantas em presença de bactérias em resposta a estresses bióticos e abióticos, pode mediar o ajuste osmótico, e proteger membranas e proteínas contra efeitos adversos do aumento da concentração de íons inorgânicos (GROVER et al., 2011).

Para Dimkpa et al. (2009), bactérias podem intermediar mudanças na elasticidade das paredes das células radiculares, o que seria um dos primeiros passos para melhorar a tolerância ao estresse hídrico. Bactérias também podem auxiliar na recuperação após o estresse hídrico, mesmo não evitando perda de água durante o estresse, podendo fazer com que os níveis de água na célula retornem mais rapidamente ao normal (MAYAK et al., 2004).

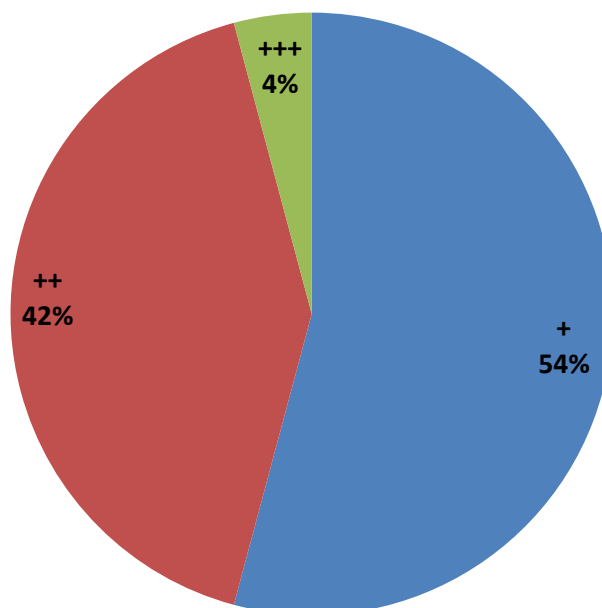
4.2.1. Produção de exopolissacarídeos (EPS)

Todos os isolados produziram EPS, com variação dependendo da fonte de carbono utilizada (Tabela 4). A maior produção de EPS foi observada no meio contendo sacarose, não sendo detectadas diferenças significativas entre frutose e glicose, também não sendo verificada interação significativa entre as fontes de carbono e o pH (indicando que não houve dependência entre os dois fatores). As menores produções de exopolissacarídeos foram verificadas para os isolados 6, 15 e 21. A frequência dos isolados quanto a produção de EPS no meio com sacarose esta apresentada na Figura 6.

A Figura 7 ilustra a confirmação da formação de EPS em álcool etílico onde isolados que não produzem EPS, ao serem misturadas em álcool etílico ficam em suspensão, deixando o meio turvo. Enquanto o EPS produzido ao ser misturado com o álcool etílico, é precipitado.

As fontes de carbono e a temperatura influenciam a síntese de EPS, Yuksekdağ; Aslım, (2008) estudando a produção de EPS por *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* em meios contendo várias fontes de carbono (glicose, frutose, sucrose e lactose), verificaram que a glicose foi a fonte mais eficiente, além de que as concentrações utilizadas também influenciaram, sendo a maior concentração. Kavamura (2012) estudando isolados de bactérias rizosféricas de *Cereus jamacaru*, também observou maior produção de EPS em meio contendo sacarose em pH de 7,5.

Figura 6. Frequência de produção de EPS a 28°C, em meio contendo sacarose em pH 7,5, pelos isolados bacterianos



+ pouca produção - halo de EPS ≤ 10 mmØ), ++ (média produção - halo de EPS de 10-14 mmØ) e +++ (ótima produção - halo de EPS ≥ 14 mmØ).

Os exopolissacarídeos (EPS) são polissacarídeos extracelulares, produzidos por micro-organismos, que podem ser encontrados, aderido às superfícies celulares ou externamente, excretado no meio (SEESURIYACHAN et al., 2012). Na maioria dos casos contribuem contra dessecação celular, estresse osmótico, fagocitose, presença de antibióticos ou 23 componentes tóxicos, ataques de fagos e predação por protozoários. Em organismos unicelulares os EPS proporcionam aderência intercelular e entre superfícies de células, constituindo-se um dos principais componentes do biofilme de colônias microbianas (SAVADOGO et al., 2004).

A produção de (EPS) pela interação micro-organismo-planta, pode formar um biofilme, que limita a difusão de compostos secretados pelas raízes e também pelas bactérias, o que possibilita uma melhor aderência e colonização às superfícies nos quais os nutrientes se acumulam, além de contribuir na fixação de nutrientes e minerais, retenção de água e proteção a planta contra estresses ambientais, tais como, dessecação, salinidade e variação de temperatura. Também tem sido verificado que o acúmulo ou a formação desta substância tende a aumentar a partir do momento em que o estresse salino ou outro tipo de estresse se expressa de forma mais pronunciada no ambiente (ESPOSITO, 2014; CERQUEIRA et al., 2015).

Tabela 4. Produção de EPS a 28°C em meio contendo três fontes de carbono e dois valores de pH caracterizada visualmente mediante medida do halo. Média de três repetições.

Isolados	Halo Ø (mm)					
	Frutose		Glicose		Sacarose	
	pH		pH		pH	
	5,5	7,5	5,5	7,5	5,5	7,5
1	13,400aA	4,3000 bB	9,3500 aA	6,7500 aB	12,5000bA	11,150 aA
2	11,6500aA	5,3000 bB	12,6000aA	7,0500 aB	10,0000bA	11,6500aA
3	8,5500 aA	4,2000 bA	8,9000 aA	9,7500aA	8,4000 cA	8,1000 aA
4	8,6500 aA	4,8000 bB	10,8000aA	4,9000 bB	10,5000bA	10,0000aA
5	13,0500 aA	4,2000 bB	14,2500aA	4,6000 bB	10,9500bA	11,8500aA
6	5,8500 bA	5,3500 bA	0,0000bB	0,0000 bB	6,7000cA	0,0000 bB
7	13,7000 aA	3,7500 bB	10,9500aA	8,1000 aB	12,2000bA	5,8500 bB
8	11,4000 aA	0,0000 bC	9,5000 aA	5,2000 bB	12,5000bA	10,6500aA
9	11,8500 aA	5,0500 bB	8,8500 aB	5,1500 bB	13,0500bA	15,6500aA
10	3,4000 bB	4,8000 bB	8,1000 aA	4,8500 bB	10,5000bA	12,6500aA
11	4,3000 bB	4,1000 bB	10,3000aA	4,7000 bB	11,8500bA	9,7500 aA
12	9,3500 aB	4,2500 bB	8,8500 aB	5,6500 bB	13,3000bA	13,2000aA
13	5,8500 bA	10,2000aA	8,5500 aA	11,2500aA	10,7500bA	12,0000aA
14	0,0000 bB	10,2500aA	7,9000 aA	9,4000 aA	9,2000 cA	9,9000 aA
15	0,0000 bC	9,7000 aA	5,8000 bB	4,9500 bB	8,7000cA	10,1500aA
16	11,9500 aA	12,5000aA	6,2500 bB	5,0000 bB	11,9000bA	10,1000aA
17	4,2000 bB	9,8000 aA	4,5500 bB	4,7000 bB	11,4000bA	10,6500aA
18	9,2500 aA	10,0000aA	8,0500 aA	9,0500 aA	3,9000 cA	9,4000 aA
19	11,1500 aA	7,8000 aB	8,5500 aB	4,9000 bB	13,9500bA	5,0500 bB
20	9,3500 aB	3,9500 bC	4,7500 bC	4,8500 bC	21,0000aA	9,9500 aB
21	4,2000 bA	9,0000 aA	5,0000 bA	5,1000 bA	4,3500 cA	5,7000 bA
22	10,9000 aA	10,3000aA	10,0000aA	9,5000 aA	11,0000bA	3,3500 bB
23	9,8000 aA	8,0500 aA	10,6000aA	4,4000 bB	12,8500bA	3,6500 bB
24	12,0000 aA	8,1000aA	4,0000 bB	0,0000 bC	13,7000A	6,4000 bB

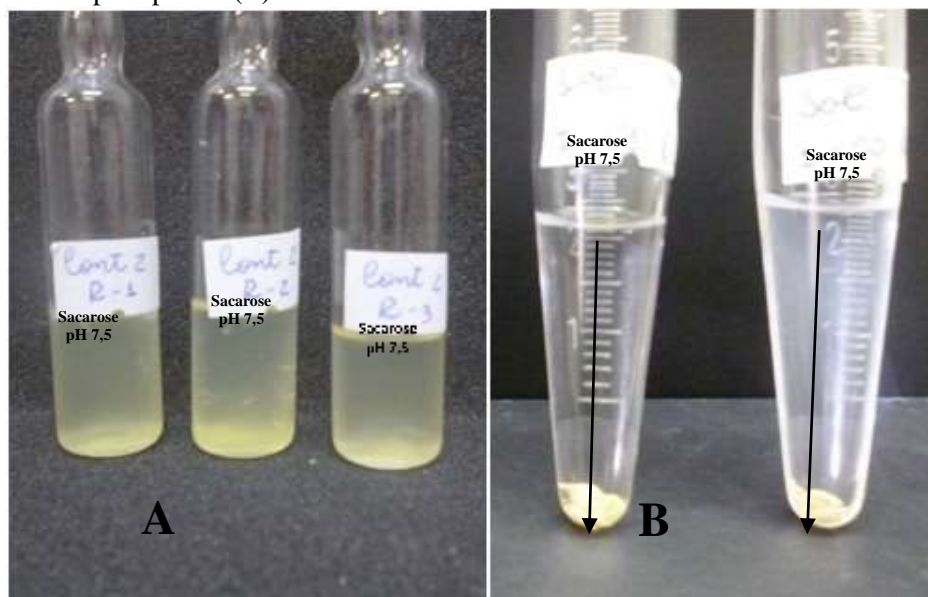
Colunas - letras minúsculas Linhas - letras maiúsculas

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott $p < .05$

Qurashi et al. (2012) ao estudarem esse mecanismo sob a influência de estresse salino, relataram que o aumento da produção de EPS em níveis mais elevados de salinidade, favorece a formação de biofilme e protege o vegetal por meio da manutenção de uma camada de água ao redor das células, contribuindo significativamente para a melhoria da fertilidade do solo e o crescimento vegetal.

Ashraf et al. (2005) avaliando bactérias produtoras de EPS, observaram aumento na agregação do solo ao redor das raízes das plantas de trigo inoculadas, cultivadas em solo salino, afetando positivamente suas características físico-químicas. Os autores perceberam ainda que para compensar o estresse imposto pela salinidade, a produção de exopolissacarídeos são estratégias significativas para auxiliar no metabolismo do sal nas bactérias tolerantes.

Figura 7. Confirmação do teste qualitativo da produção de EPS em álcool etílico, a ausência de EPS, com presença apenas de massa celular, torna o meio turvo (A) o EPS é precipitado (B).



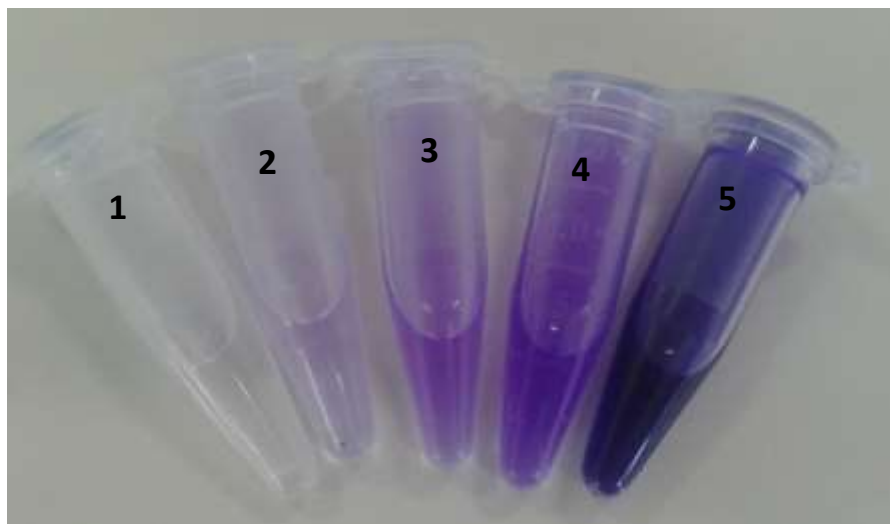
A proteção celular conferida por EPS contra condições ambientais adversas, também foi detectada em células de *Vibrio cholerae* contra os mesmos tipos de estresses anteriores como Ashraf et al. (2004) sugerem que a inoculação de bactérias (*Bacillus* sp., *Bacillus insolitus* e *Aeromonas hydrophila*) produtoras de EPS em plantas sensíveis à salinidade poderia aliviar o estresse salino. O EPS funcionaria para atração de cátions de Na^+ , o que reduziria o conteúdo de Na^+ disponível à absorção pelas plantas.

Alguns autores também associam os EPS à solubilização de fosfato (YI et al., 2008; NARSIAN et al., 2010); estudando quatro estirpes bacterianas de *Enterobacter* sp. (EnHy-401), *Arthrobacter* sp. (ArHy-505), *Azotobacter* sp. (AzHy-510) e *Enterobacter* sp. (EnHy-402), com capacidade para solubilizar o fosfato tricalcico produziram uma quantidade significativa de EPS e demonstraram uma forte capacidade de P-solubilização.

4.2.2. Formação de biofilme em superfície abiótica

A presença de biofilme em superfície abiótica foi evidenciada pela formação de uma coloração violeta (Figura 8). Os resultados estão apresentados na Figura 9, todos os isolados foram capazes de formar biofilme. O isolado 11 se destacou dos outros isolados, formando a maior quantidade de biofilme.

Figura 8. Formação de biofilme por isolados bacterianos em meioTSB Contendo sacarose, baseada nos valores de absorbância obtidos, $DO_{540\text{nm}}$.

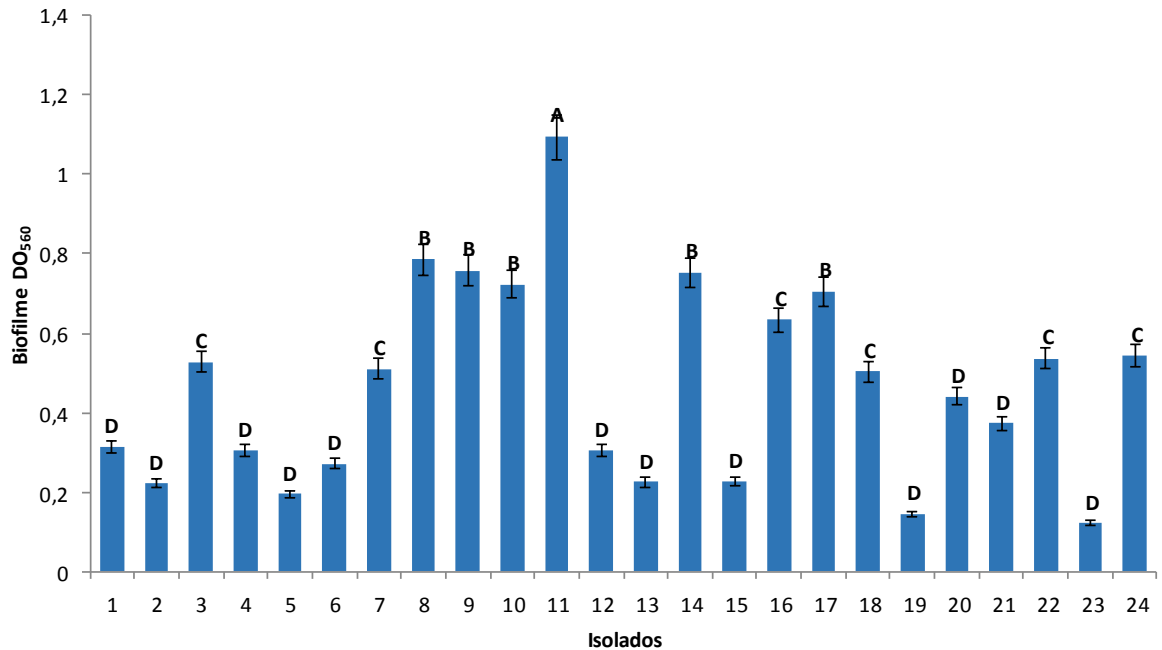


1) controle negativo; 2) $DO_{540\text{nm}} < 0,1$ (-) (ausência de formação); 3) $DO_{540\text{nm}} 0,1-0,2$ (+) (baixa formação); 4) $DO_{540\text{nm}} 0,2-1,0$ (++) (média formação) 5) $DO_{540\text{nm}} > 1,0$ (+++) (alta formação) de biofilme.

De acordo com Morris e Monier, (2003) as bactérias associadas às plantas são frequentemente visualizadas reunidas em comunidades denominadas agregados, microcolônias e biofilmes. Os biofilmes bacterianos são uma comunidade estruturada de células, aderidas a um substrato biótico ou não, inseridas em uma matriz polimérica produzida pelas próprias bactérias (COSTERTON, 1999). O processo de formação dos biofilmes envolve a adesão da bactéria ao substrato e a agregação das células umas às outras. Na adesão há a participação das fímbrias, adesinas (DAVEY; O'TOOLE, 2000) e de moléculas de DNA que são excretadas para o meio (WHITCHURCH et al., 2002). A agregação e maturação do biofilme envolvem o aumento do número de células e a deposição de grande quantidade de matriz extracelular (EPS, proteínas e outras substâncias) para formar o esqueleto do biofilme (DAVEY; O'TOOLE, 2000).

De acordo com Xavier e Foster (2007), a formação de biofilme microbiano ocorre no interior da plantas através da colonização vertical, no qual há aumento progressivo de bactérias, ocorrendo o crescimento e dispersão das células microbianas com subsequente aumento na produção do biofilme pelas inúmeras espécies bacterianas.

Figura 9. Formação de biofilme em superfície abiótica por isolados bacterianos em meio TSB suplementado com 10 % de sacarose.



Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, Teste de Scott- Knott ($p < .05$)

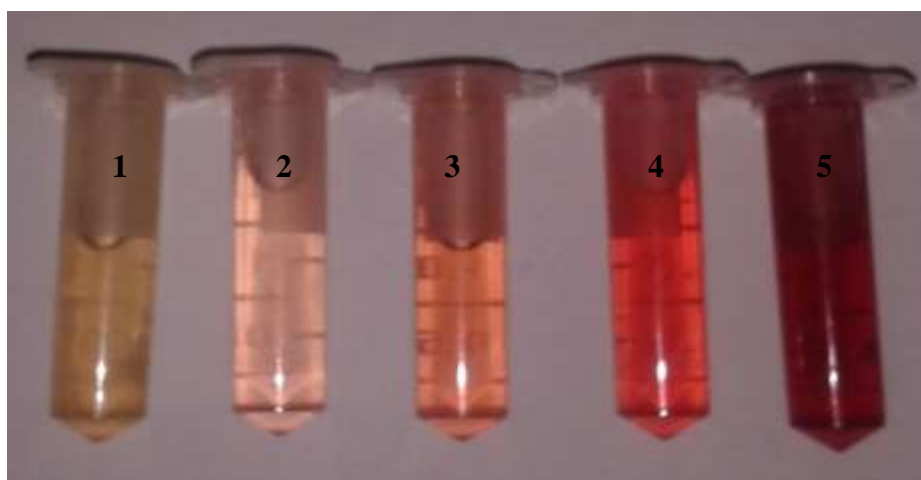
A formação de biofilme, parece ser uma característica amplamente disseminada entre as rizobactérias, visto que a grande maioria dos isolados foi positiva. O biofilme pode auxiliar na colonização radicular durante o crescimento vegetal (RAMEY et al., 2004) e também pode proteger as células da privação de nutrientes, alterações no pH, radicais livres de oxigênio, antibióticos, fagocitose (JEFFERSON, 2004) e condições limitantes de água (CHANG et al., 2007). Alguns exopolissacarídeos são altamente hidratados devido à incorporação de água em sua estrutura por meio pontes de hidrogênio, o que poderia prevenir a dessecação em alguns biofilmes (FLEMMING et al., 2000).

Os biofilmes bacterianos são encontrados em muitas plantas como estratégia de colonização da filosfera e da rizosfera (KNEE et al., 2001). A maioria dos estudos sobre biofilmes rizosféricos tem abordado *Pseudomonas fluorescens*, utilizada como agente de controle biológico e *Azospirillum brasilense*, bactéria promotora de crescimento vegetal (FUJISHIGE et al., 2006). Estas bactérias possuem características intrínsecas que favorecem a capacidade de atuarem como promotoras de crescimento, tais como, competitividade, eficiência saprofítica, produção de substâncias antibióticas, resposta do tipo “quorum sensing” e formação de biofilmes (ANDERSEN et al., 2003; RUMJANEK et al., 2004).

4.3. Produção de ácido indolacético (AIA)

A presença de AIA foi evidenciada pela formação de uma coloração vermelha (Figura 10). Todos os isolados foram capazes de sintetizar AIA na presença do precursor L-Triptofano (Tabela 5). As maiores quantidades ao final de 72 horas, foram verificadas para os isolados 7 e 10 ($51,62$ e $48,83 \mu\text{g mL}^{-1}$) que não diferiram significativamente entre si seguido pelo isolado 8 ($42,78 \mu\text{g mL}^{-1}$). Apesar das diferenças significativas, exceto o isolado 7 (elevado) os demais foram classificados altos produtores.

Figura 10. Presença de AIA por isolados bacterianos em meio TSB suplementado com triptofano, –após a adição do Reagente de Salkowski, baseada nos valores de absorbância obtidos, $\text{DO}_{560 \text{ nm}}$.



1) controle negativo; 2) $< 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (+) (baixa produção); 3) $1-10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (++) (média produção); 4) $11-50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (+++) (alta produção); 5) $> 51 \mu\text{g mL}^{-1}$ (++++) (elevada produção) de AIA.

Os níveis de AIA produzidos pelas bactérias dependem do crescimento bacteriano, da atividade metabólica e da expressão de genes que codificam enzimas para a biossíntese de AIA (LAMBRECHT et al., 2000), portanto, a carência nutricional pode inibir a produção deste fitormônio.

Os resultados estão em consonância com os obtidos por outros autores, Ashraf et al. (2011) observaram o potencial da produção de ácido indol acético em bactérias da rizosfera associada à cana-de-açúcar, obtendo produção máxima de AIA de $4,49 \mu\text{g mL}^{-1}$ com o isolado A17. Já Sgroy et al. (2009), estudando bactérias endofíticas associadas à halófito *Prosopis strombulifera*, obtiveram os maiores valores para a produção de AIA de $2,2 \mu\text{g mL}^{-1}$. Rocha et al. (2011) com valores de $0, 8-12 \mu\text{g mL}^{-1}$, Oliveira (2009) com valores de $13, 72-19, 62 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Pedraza et al. (2004) consideraram que as quantidades de AIA excretadas pelos isolados dependem da espécie ou até mesmo da estirpe em estudo, assim como das condições em que são cultivados os organismos, tais como: presença ou ausência do precursor do AIA no meio de cultura (triptofano), oxigenação, pH e fase de crescimento em que se encontram os isolados.

Tabela 5. Produção de AIA de isolados de bactérias, em TSA suplementado com 200µl de triptofano em DO 600 de 2.5 em intervalos de 12 horas (0-72) crescimento. Média de cinco repetições.

Isolados	Isolados µgmL ⁻¹	
1	20,79244	f
2	33,69231	c
3	25,98784	e
4	33,22284	c
5	34,11240	c
6	14,98113	g
7	51,62194	a
8	42,77904	b
9	35,49059	c
10	48,83149	a
11	29,51555	d
12	21,01790	f
13	29,06185	d
14	37,43968	c
15	30,44866	d
16	34,72942	c
17	30,59637	d
18	17,83867	g
19	21,04678	f
20	21,24697	f
21	20,17561	f
22	23,71083	e
23	17,92937	g
24	21,09667	f

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Pelo o Teste de Scott- Knott .01 =< p < .05

O AIA bacteriano é um metabólito secundário sendo produzido na fase estacionária do crescimento bacteriano, no entanto, a duração depende de cada espécie. Desse modo, é necessário conhecer o comportamento de cada isolado, para realizar a leitura da síntese de auxina em diferentes tempos do desenvolvimento bacteriano, possibilitando a determinação do período em que ocorre a síntese máxima do hormônio (CERIGIOLI, 2005). Além do conhecimento da fase estacionária para leitura da auxina, a curva de crescimento fornece a relação entre a densidade bacteriana e a produção do hormônio.

Conforme se verifica (Figura 11) todos os isolados iniciaram a produção com 12 horas de incubação, para os isolados 2, 4, 5, 9, 12 e 16, antes do crescimento bacteriano atingir a fase estacionária, esse efeito pode estar relacionado ao meio de cultura utilizado para o crescimento bacteriano (TSA) rico em aminoácidos, inclusive o triptofano. Para os isolados 7 e 10 que apresentaram melhores produção (Tabela 4) foi observado que as concentrações de AIA aumentaram a partir de 24 e 36 horas de incubação e densidade ótica entre 1.4 e 2.0 (Figura 10) respectivamente. Não foi observado queda de produção para o isolado 7, enquanto que para o 10 ocorreu queda na concentração até 60 horas.

Os níveis de AIA produzidos pelas bactérias dependem do crescimento bacteriano, da atividade metabólica e da expressão de genes que codificam enzimas para a biossíntese de AIA (LAMBRECHT et al., 2000), portanto, a carência nutricional pode inibir a produção deste fitormônio.

Figura 11. Produção de AIA de isolados de bactérias, em TSA suplementado com 200 de triptofano em DO 600nm de 2.0 em intervalos de 12 horas (0-72) crescimento. Média de cinco repetições.

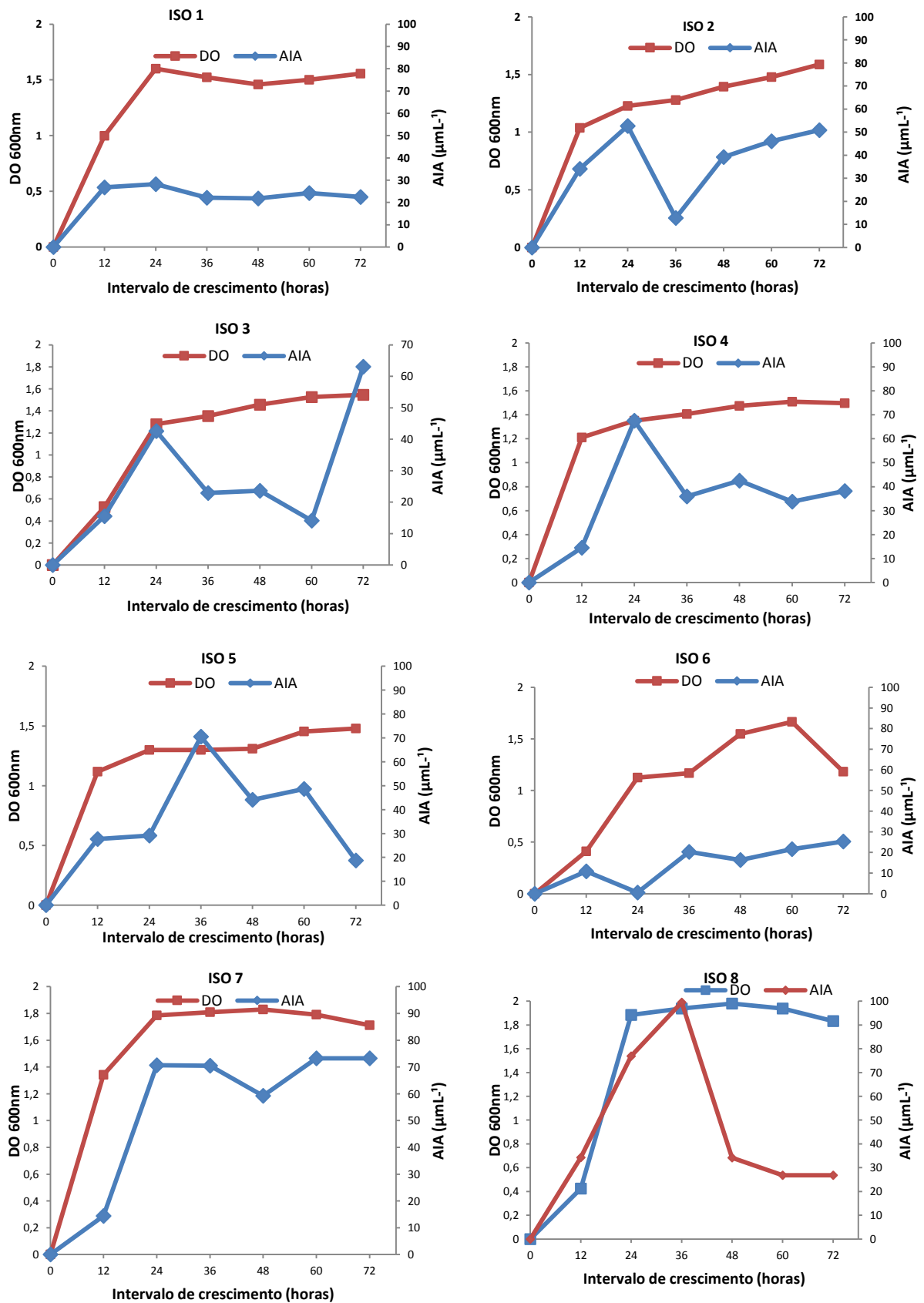


Figura 11. Cont.

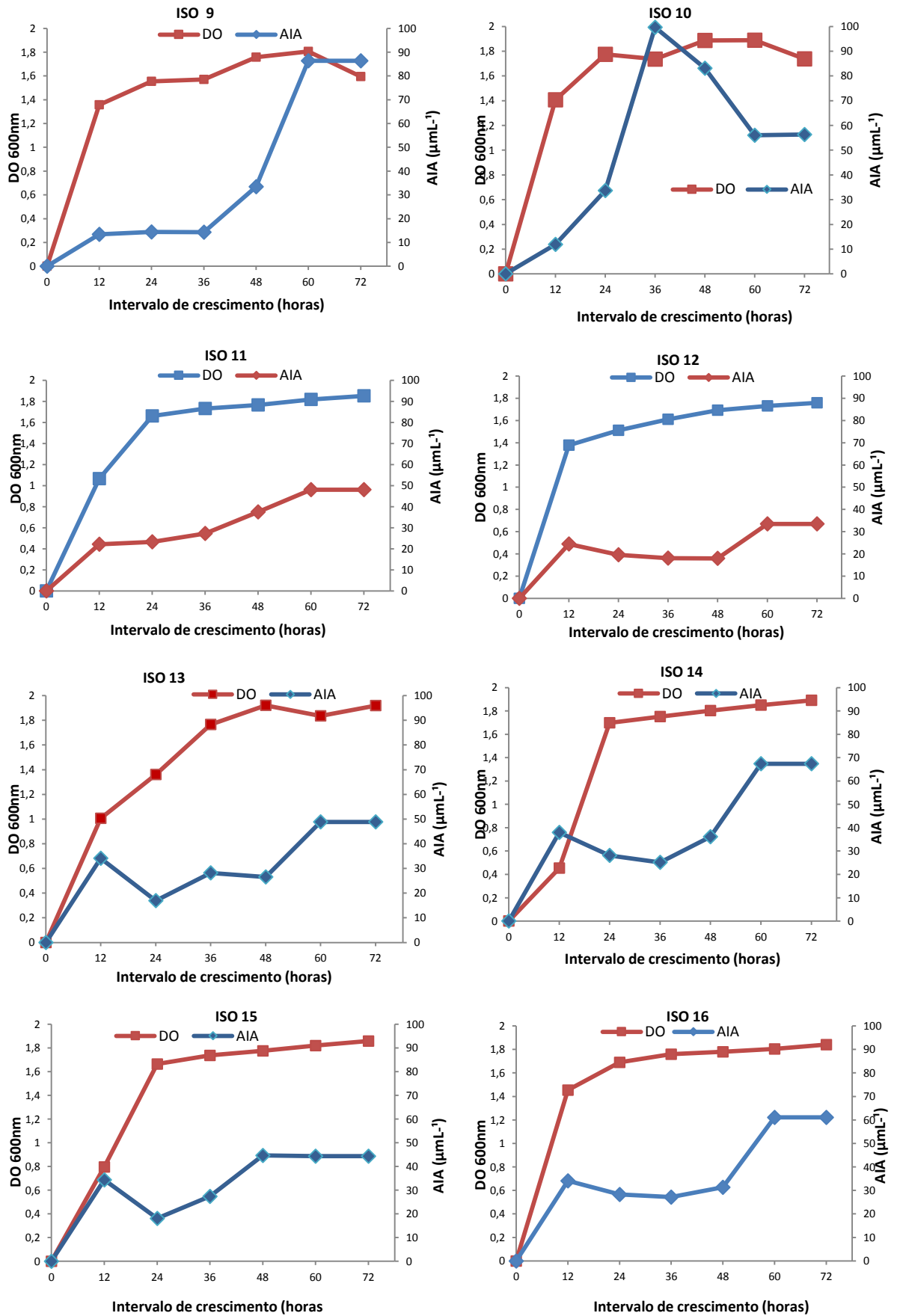
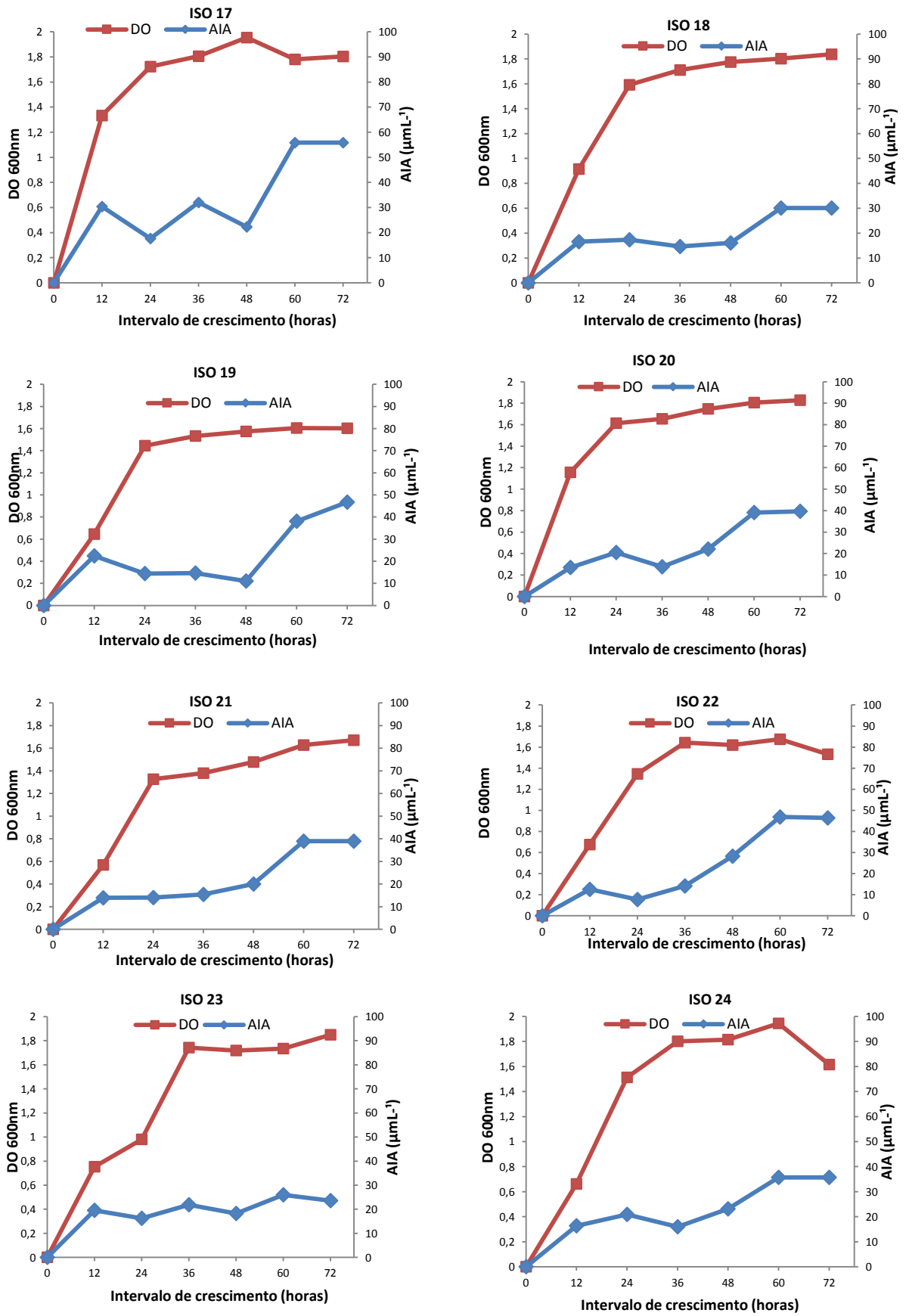


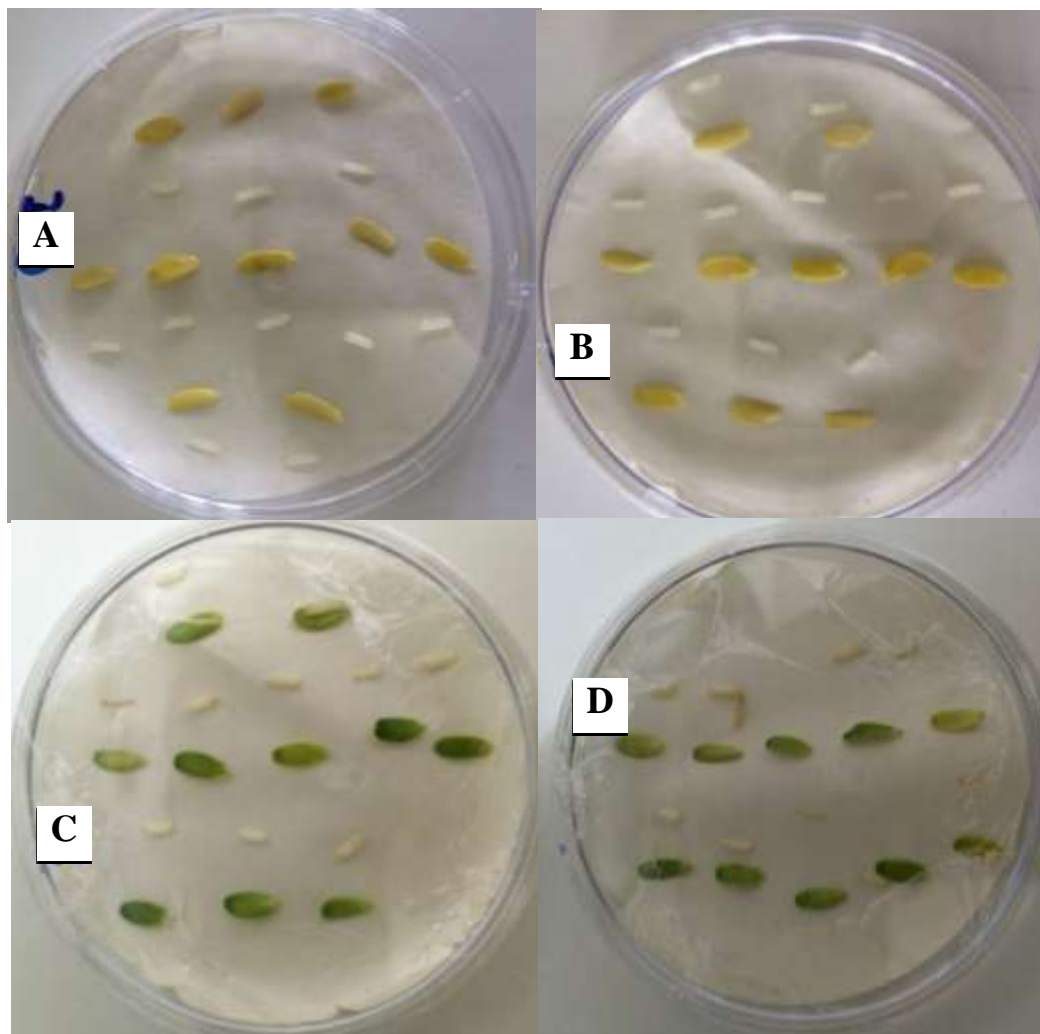
Figura 11. Cont...



4.4. Produção de citocininas e giberelinas

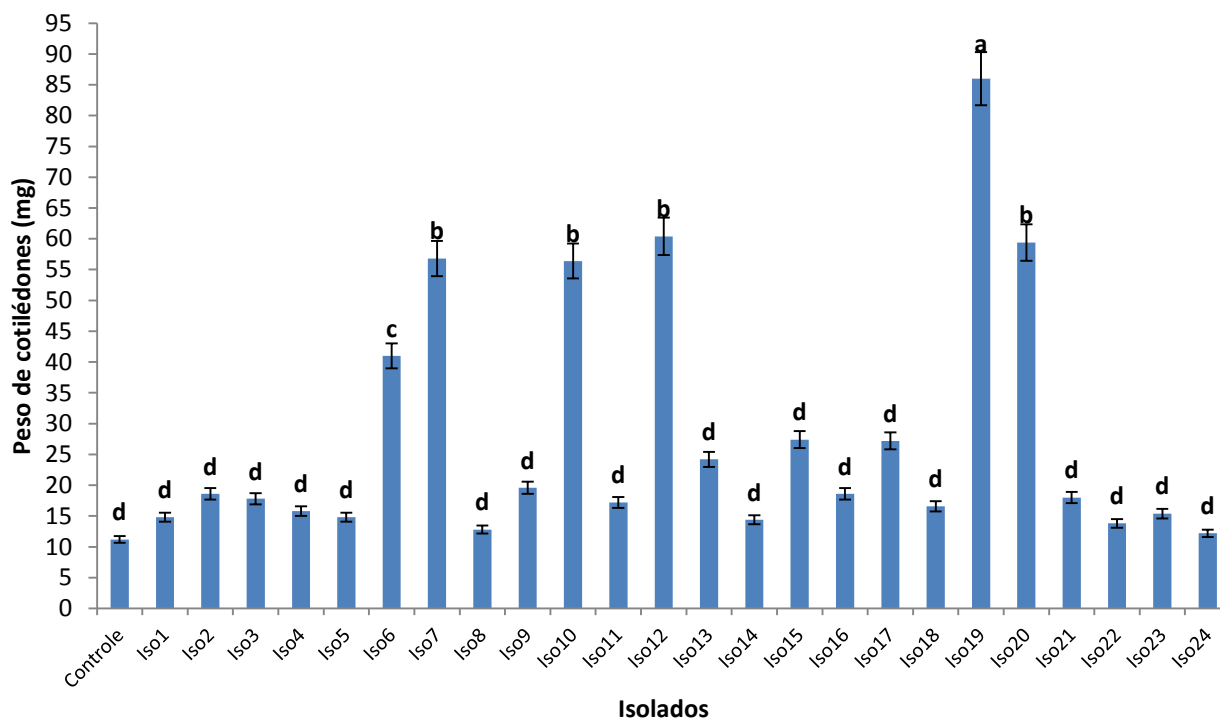
A presença dos hormônios citocininas e giberelinas foi evidenciada pelo ganho de peso dos cotilédones e aumento dos hipocótilos da planta teste (Figura 12). Os isolados 6, 7, 10, 12, 19 e 20 diferiram significativamente (Scott-Knott $p < .05$) do controle quanto a produção de citocinina (Figura 12).

Figura 12. Evidência da produção de citocinina (peso de cotilédones) por isolados de bactérias na planta teste (pepineiro *Cucumis sativus* L.).



B controle (papel de filtro umedecido com caldo nutriente) C e D papel de filtro umedecido com com suspensão bacteriana.

Figura 13. Produção de citocinina (peso de cotilédones) por isolados de bactérias da planta teste (pepino *Cucumis sativus* L.). Média de cinco repetições.



As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott-Knott $p < .05$

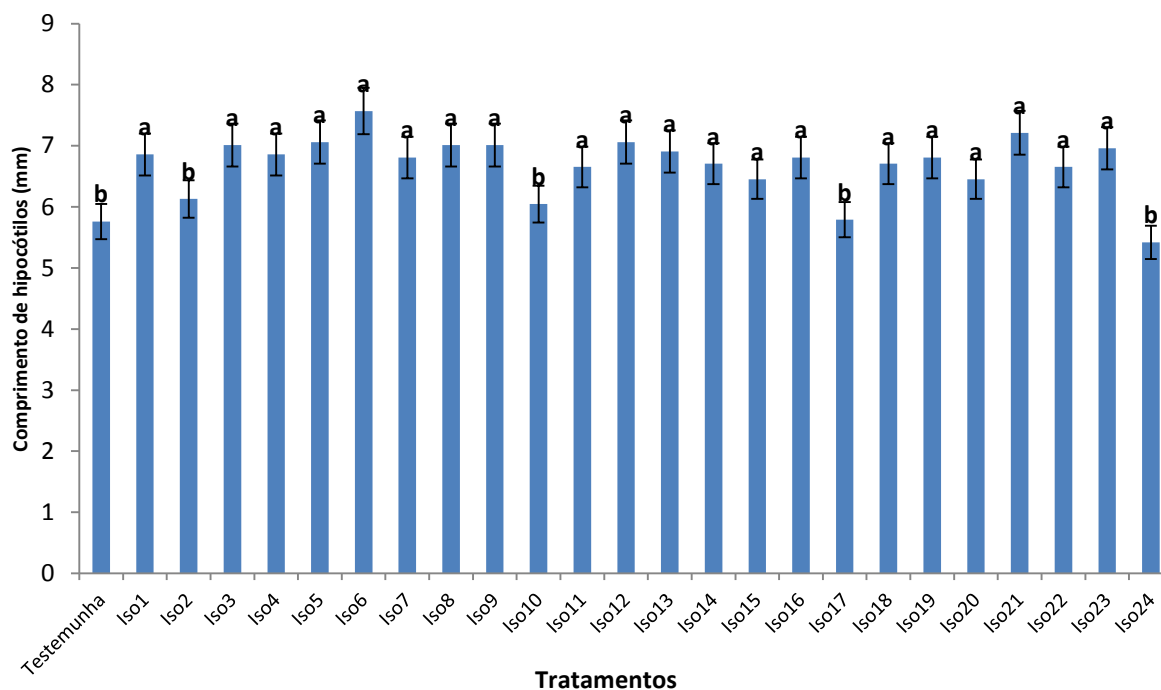
As citocininas são sintetizadas nas raízes, em embriões em desenvolvimento, folhas jovens e frutos. Também podem ser sintetizadas por bactérias, insetos e nematóides associados às plantas. As citocininas participam na regulação de muitos processos do vegetal, incluindo a divisão celular, senescência foliar, mobilização de nutrientes, dominância apical, formação e atividade dos meristemas apicais, desenvolvimento floral, germinação de sementes e a quebra da dormência de gemas. Parecem mediar também muitos aspectos do desenvolvimento regulado pela luz, incluindo a diferenciação dos cloroplastos, o desenvolvimento do metabolismo autotrófico e a expansão de folhas e cotilédones. A razão entre auxina e citocinina determina a divisão celular e a diferenciação em raiz ou gema de tecidos vegetais cultivados, sendo que uma alta relação auxina: citocinina estimula a formação de raízes (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Para o ensaio de produção de giberelinas por 83,33% dos isolados testados (Figura 14), diferiram significativamente da testemunha (Scott-Knott $p < .05$). A giberelina exerce uma importante influência na germinação e na quebra de dormência, podendo agir como bioestimulante celular provocando alongamento e estimulando a divisão celular.

As giberelinas são frequentemente associadas à promoção do crescimento do caule, e a sua aplicação às plantas intactas pode induzir à aumentos significativos nas suas alturas, principalmente nas plantas anãs e nas plantas da família *Poaceae*. Além disso, controlam vários aspectos da germinação de sementes, incluindo a quebra de dormência e a

mobilização das reservas do endosperma. Pode afetar a transição do estado juvenil para o maduro, bem como a indução da floração, a determinação do sexo e o estabelecimento do fruto, seu transporte é de natureza não polar, ocorrendo na maioria dos tecidos, incluindo xilema e floema (TAIZ; ZIEGER, 2004).

Figura 14. Produção de giberelina (comprimento de hipocótilos) por isolados de bactérias da planta teste (pepineiro *Cucumis sativus* L.). Média de cinco repetições.



Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott-Knott $p < .05$

O comprimento dos hipocótilos dos pepineiros também foi medido para constatar a ação dos dois hormônios. Todos os isolados, comparados a testemunha, aumentaram em tamanho, sugerindo a ação de um ou dos dois hormônios em questão.

Trabalhos conduzidos com *Oryza sativa* (arroz) e *Trifolium alexandrinum* (trevo alexandrino) relatam a produção de giberelina (BLOEMBERG; LUGTENBERG, 2001; YANNI et al., 2001). Bloemberg; Lugtenberg (2001) e Persello-Cartieaux et al. (2003) relatam a produção de citocininas por rizóbios associados à canola (*Brassica napus*). Hormônios do grupo das giberelinas e citocininas estão relacionados com o alongamento celular e, com isso, têm efeitos fisiológicos sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas (MACHADO et al. 2011)

A produção de reguladores de crescimento traz inúmeros benefícios à planta hospedeira, como a expansão do sistema radicular, que melhora a absorção de água e nutrientes, acentuando sua chance de sobrevivência no ambiente (SILVEIRA, 2008), sendo este um dos mecanismos responsáveis pela promoção do crescimento vegetal por meio de efeitos estimulatórios.

4.5. Brotação de gemas Colonização de raízes emissão de raízes e folhas

A Figura 15, apresenta a brotação da gemas inoculadas comparados ao controle sem inoculação da variedade RB72454 de cana-de-açúcar, ao final da avaliação, na presença dos isolados 4, 16, 21 e 24, apenas 25% das gemas haviam brotado e emitido raízes, não diferindo significativamente do controle (Figura 16). A inoculação aumentou significativamente a velocidade de brotação para 83,33% dos isolados, sendo os melhores resultados obtidos para 7, 12, 19 e 20 (94.5, 100, 95 e 94.5% respectivamente) tanto para o número de gemas brotadas como para velocidade de emissão de brotos e raízes.

As gemas são constituídas de células e tecidos em estado de latência e grande diferenciação celular, sob condições de umidade e temperaturas propícias à brotação, ocorre o intumescimento da gema e dos primórdios radiculares localizados na região do nó, sendo seu crescimento e desenvolvimento favorecido pela maior disponibilidade de reservas nutricionais e de fitorreguladores de crescimento (GÍRIO et al., 2015; SILVA et al., 2010). Portanto, como algumas bactérias promotoras de crescimento são capazes de sintetizar diferentes fitorreguladores (SANTI et al., 2013), elas podem favorecer a brotação.

Gemas dormentes podem ser induzidas a um estado responsivo quando se tornam receptivas a sinais; perda da dominância apical (corte da cepa) leva a uma rápida resposta não mediada por AIA, o fitormônio aumenta nas gemas responsivas, sendo exportado para o interior dos ramos, levando uma brotação a desenvolver um eficiente sistema vascular e drenar nutrientes para o crescimento.

Nos toletes de cana-de-açúcar, os órgãos da gema e primórdios radiculares, passam do estado latente para o estado ativo de crescimento e desenvolvimento em função das alterações das reservas nutritivas pela atividade de enzimas e reguladores de crescimento (CASAGRANDE; VASCONSELOS, 2010). Visto que, a brotação das gemas e emissão de raízes na cana é dependente da atuação de reguladores de crescimento, o fato dos minitoletes utilizados terem sido inoculados com bactérias que apresentaram alta produção de fitormônios, pode explicar os resultados obtidos.

Figura 15. Brotação das gemas de cana de açúcar promovido pela inoculação dos isolados bacterianos.

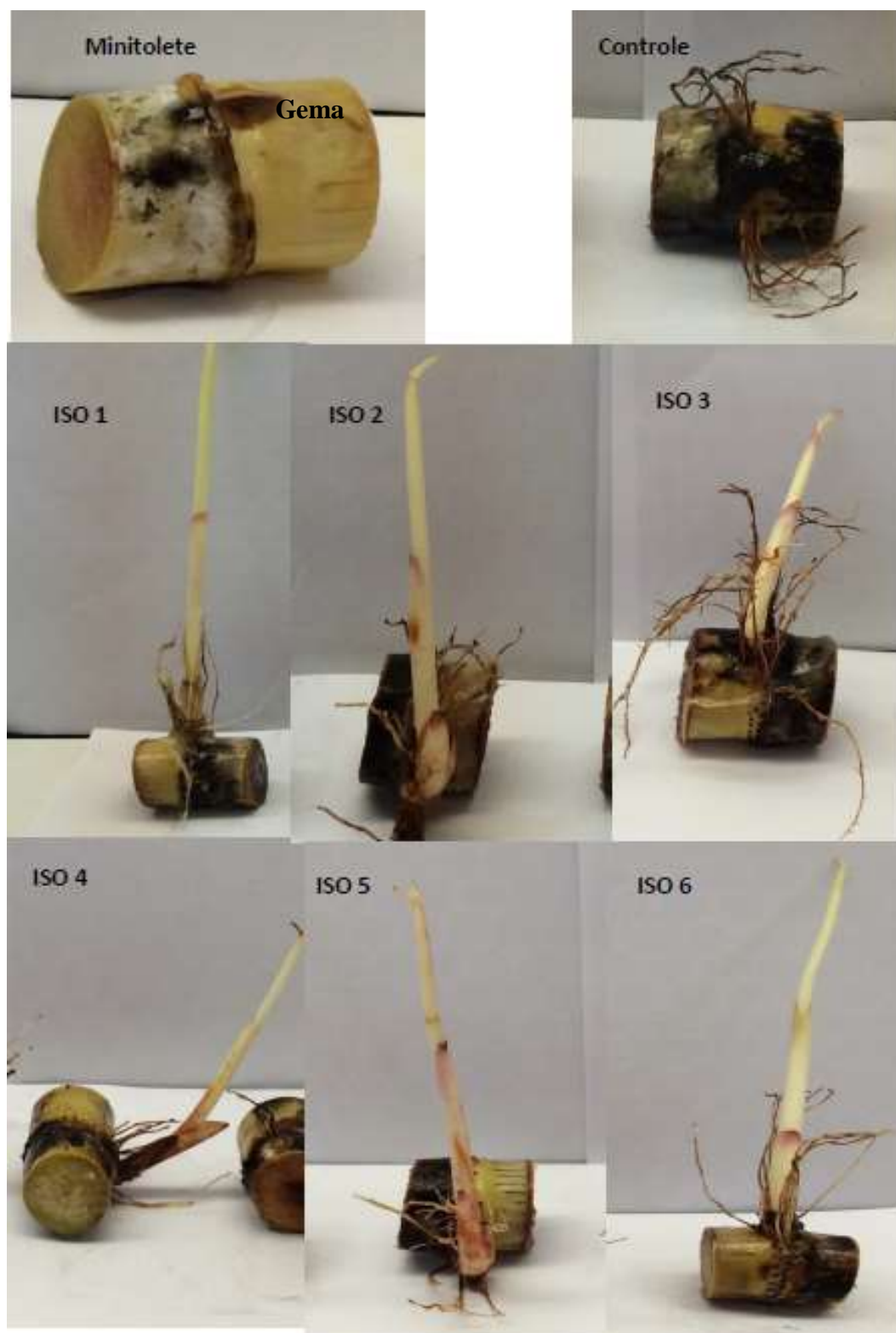


Fig. 15 cont.

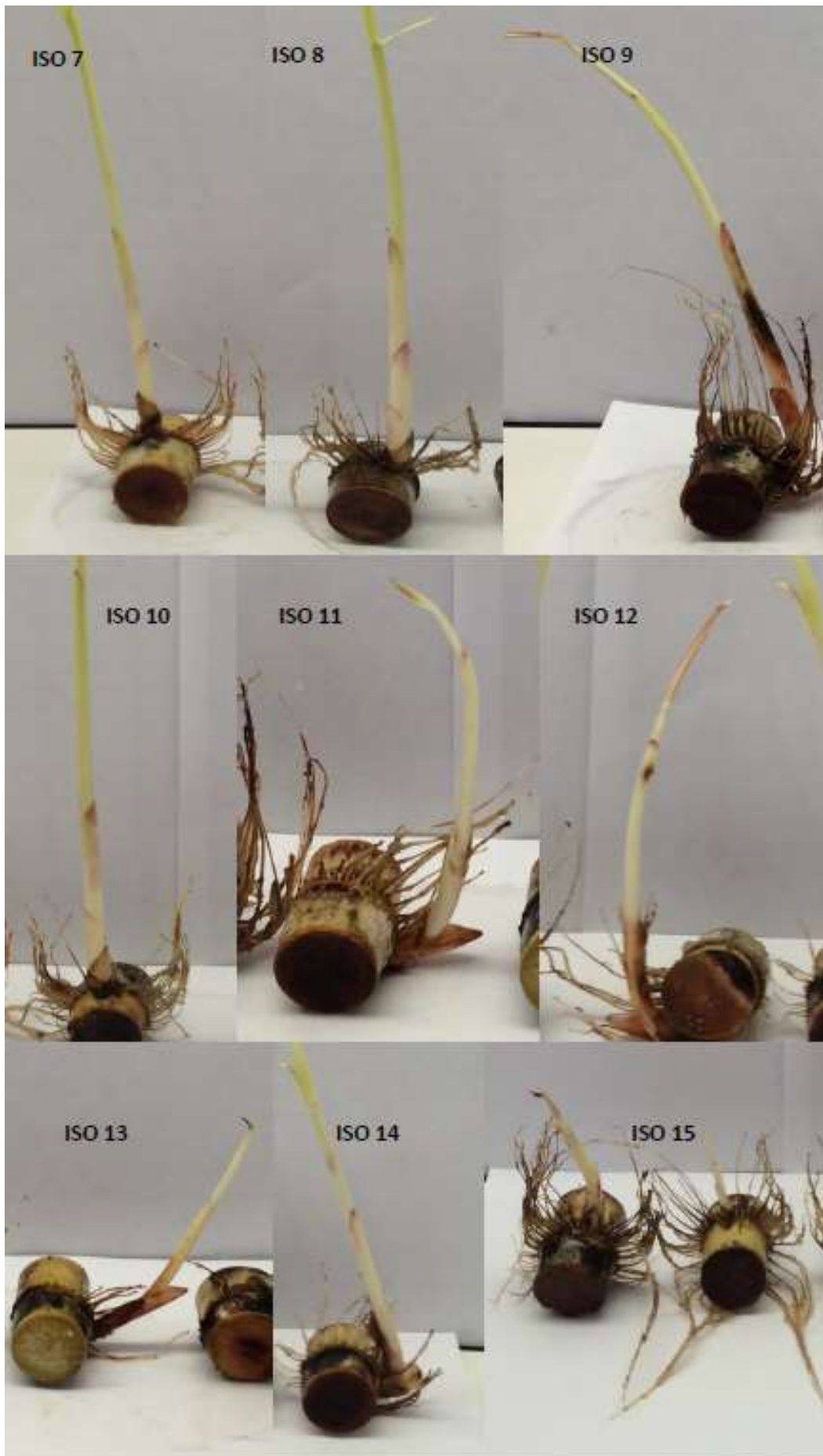
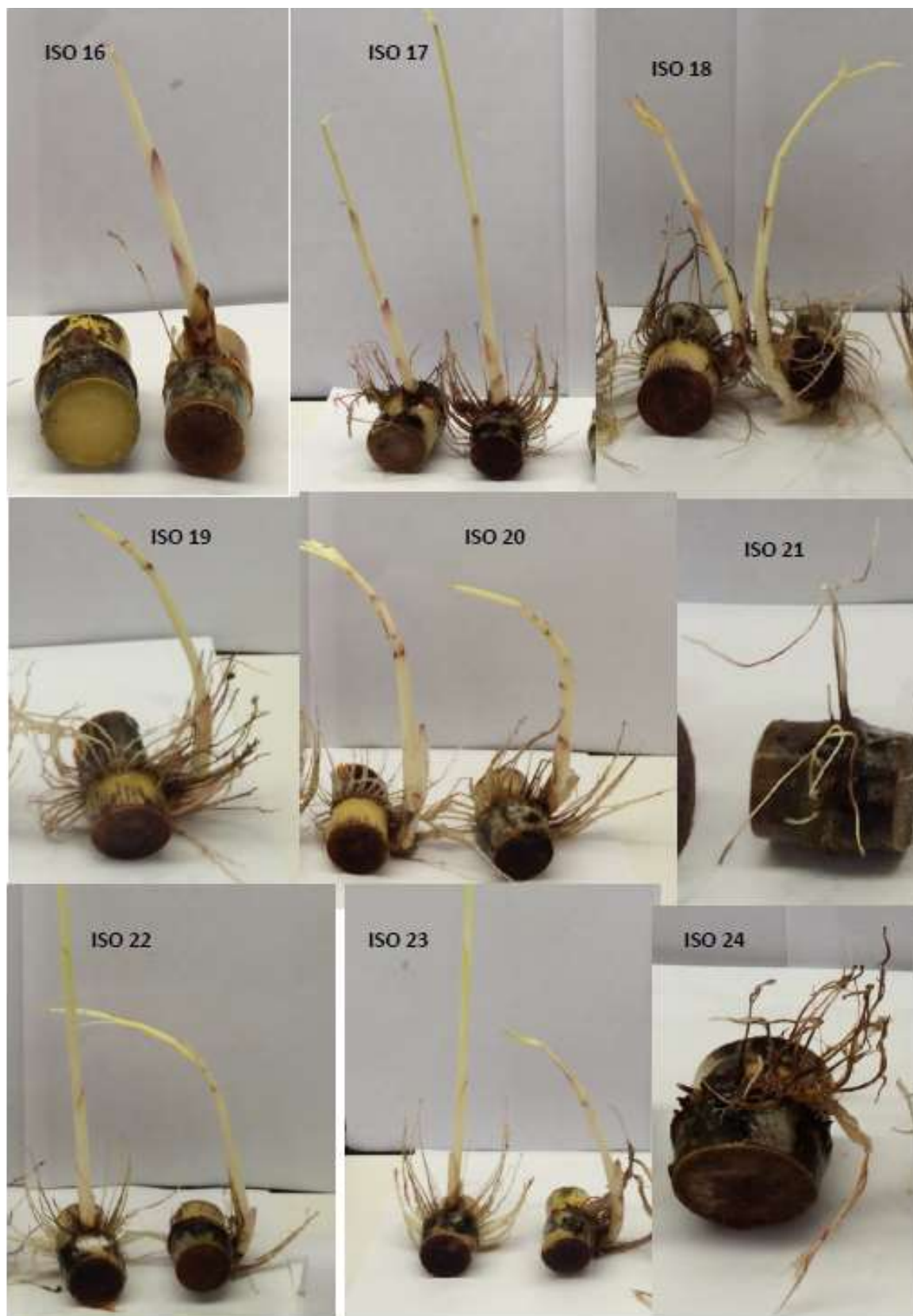


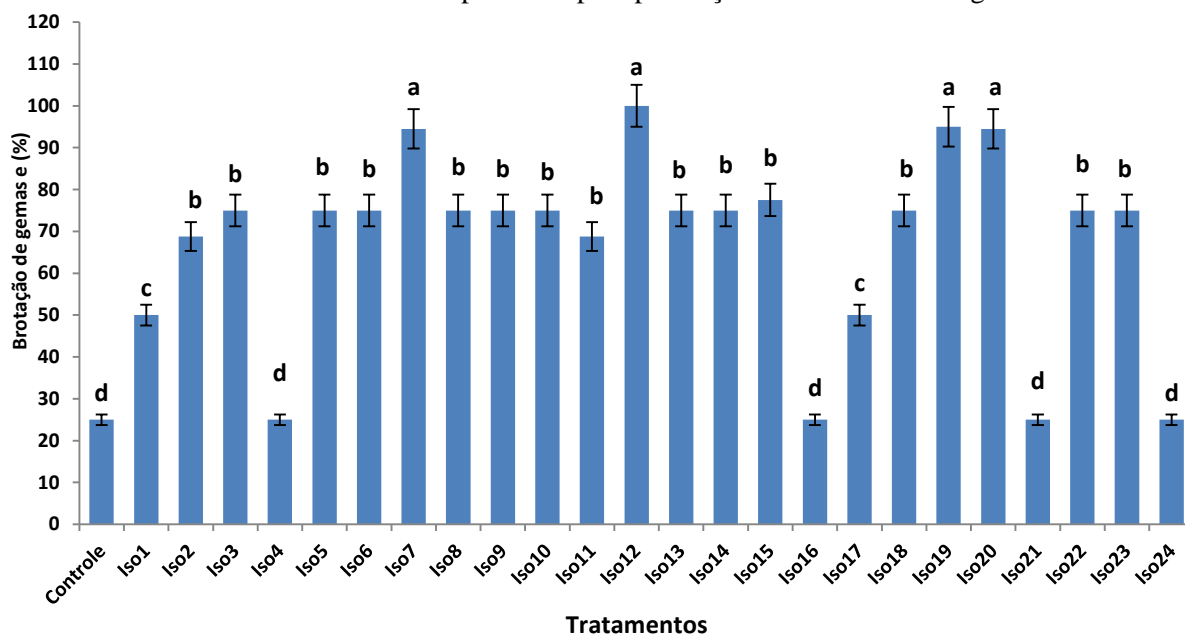
Figura 15. Cont.



A interação entre fitormônios microbianos e plantas pode ocorrer por meio de liberação de auxina observando-se entre os muitos efeitos de promoção de crescimento vegetal, estímulos ao desenvolvimento de raízes laterais e alongamento de raízes primárias,

como observado nas figuras anteriores. O desenvolvimento inicial de plantas de cana-de-açúcar foi observado por outros autores pela ação de micro-organismos promotores de crescimento, substâncias húmicas e reguladores de crescimento sintéticos (SILVA et al., 2009; SERNA-COCK et al., 2011).

Figura 16. Brotação de gemas de minitoletes da variedade de cana-de açúcar RB92579 inoculada com isolados de bactéria com potencial para promoção de crescimento vegetal.



Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Pelo o Teste de Scott-Knott $p < .05$. CV 7,18%.

Todos os isolados apresentaram colonização positiva indicado pela presença de uma região turva no entorno da raiz ao longo das raízes conforme ilustrado na Figura 17. O estabelecimento bacteriano na rizosfera é uma condição fundamental para que o micro-organismo possa interagir com a planta. A bactéria precisa se estabelecer na região em torno da raiz para não perder sua capacidade de sobreviver e multiplicar-se para continuar competitiva em relação à comunidade nativa.

Figura 17. Colonização de raízes da variedade de cana-de açúcar RB92579 inoculada com isolados de bactéria com potencial para promoção de crescimento vegetal indicado pela presença de uma região turva no entorno da raiz ao longo das raízes.



A verificação da colonização é importante, pois diversos autores citam que a inconsistência de resultados é um dos principais problemas nas pesquisas com bactérias promotoras de crescimento (CHANWAY et al. 2000; FREITAS et al., 2003). Segundo Suslow, 1982 um dos motivos seria a inabilidade dos micro-organismos introduzidos de se moverem do local de inoculação se estabelecendo efetivamente na rizosfera e na superfície da raiz dessas plantas.

A colonização radicular está sujeita a fatores bióticos e abióticos, como umidade do solo, luz, exsudação radicular etc. O crescimento das bactérias em meio ágar água com ausência de fonte de carbono no meio, receberam a fonte de carbono dos exsudatos radiculares liberados no meio, indicando que houve interação entre os micro-organismos e a planta. As bactérias rizosféricas conseguem sobreviver quando são capazes de utilizar os exsudatos das plantas ou quando são quimiostaticamente atraídas, e o estabelecimento do micro-organismo na rizosfera garante sua interação com a planta de forma benéfica ou prejudicial (HABE; UESUGI, 2000).

A formação de biofilmes desempenha um papel preponderante na associação de bactérias com plantas. Estas estruturas são importantes para formação de microcolônias com funções específicas para cada grupo bacteriano, as quais não seriam realizáveis fora do biofilme, e, portanto impediria a adaptação destas bactérias em novos habitats como à superfície ou o interior de novos hospedeiros (HU; KERPPOLA, 2003).

4.6. Análise de componentes principais para avaliação de parâmetros de crescimento da cana-de-açúcar

As correlações entre as características foram baixas (Tabela 6), com exceção da correlação entre BRO e GIB (0,77), CIT e PSOL (0,39). Isto indica que, a maioria delas apresenta comportamento independente.

Tabela 6. Coeficientes de correlação simples entre as características Ácido Indolacético (AIA), Fósforo Solúvel (PSO), Exopolissacarídeos (EPS), Biofilme (BIO), Giberelinas (GIB), Citocininas (CIT) e Brotagem da gema (BRO)

Características	AIA	PSO	EPS	BIO	GIB	CIT	BRO
AIA	1,0						
PSO	-0,05	1,0					
EPS	0,08	0,01	1,0				
BIO	0,22	-0,12	0,0	1,0			
IB	-0,03	-0,02	0,02	-0,15	1,0		
CIT	0,08	0,39	-0,00	0,06	-0,04	1,0	
BRO	0,10	-0,25	0,01	-0,14	0,77	0,02	1,0

AIA = Ácido Indolacético; PSO = Fósforo Solúvel; EPS = Exopolissacarídeos; BIO = Biofilme; GIB = Giberelinas; CIT = Citocininas; BRO = Brotagem de gemas

As análises de componentes principais são realizadas quando se tem um grande número de características correlacionadas entre si, havendo a necessidade de transformá-las em poucos componentes que permitam a tomadas de decisões importantes empregando-se esses componentes, que expressam o resultado conjunto de todas as variáveis. Entretanto, para o emprego dessa técnica, é fundamental a existência de correlações entre as características envolvidas. No presente estudo, após a realização das análises de ACP verificou-se que para explicar a variação dos dados seriam necessários quase todos os componentes principais encontrados, (Tabela 7). O ideal seria que fosse um número menor de componentes, o que facilitaria a interpretação e a tomada de decisão que atenda ao grupo de característica estudadas, sendo esse o objetivo do emprego das ACP. Esse resultado já era esperado, uma vez que a maioria das correlações entre as características foi baixa, (Tabela 6).

Tabela 7. Componentes principais (CP), autovalores (λ_i), porcentagem da variância explicada pelos componentes (% VCP) e porcentagem acumulada das características: Ácido Indolacético (AIA), Fósforo Solúvel (PSO), Exopolissacarídeos (EPS), Biofilme (BIO), Giberelinas (GIB), Citocininas (CIT) e Brotagem da gema (BRO)

Componente	λ_i	% VCP	% VCP (acumulada)
CP ₁	1,47	0,21	0,21
CP ₂	1,31	0,18	0,40
CP ₃	1,15	0,16	0,56
CP ₄	0,99	0,14	0,70
CP ₅	0,89	0,13	0,83
CP ₆	0,72	0,10	0,93
CP ₇	0,46	0,07	1,00

Portanto, com a realização de PCA não houve redução do espaço amostral e das sete variáveis originais, apenas uma pode ser eliminada de acordo com Jolife (1973). Portanto, a

variancia acumulada dos seis componentes principais explicou 93% da variação total das características (Tabela 8).

Tabela 8. Coeficientes de ponderação das características Ácido Indolacético (AIA), Fósforo Solúvel (PSO) e, Exopolissacarídeos (EPS), Biofilme (BIO), Giberelinas (GIB), Citocininas (CIT) e Brotação de gema (BRO) com os componentes principais descartados em ordem de menor importância

Características	CP ₁	CP ₂	CP ₃	CP ₄	CP ₅	CP ₆	CP ₇
AIA	-0,03	0,58	0,41	-0,03	0,22	-0,66	-0,09
PSO	0,69	-0,19	0,11	0,05	0,02	-0,22	0,65
EPS	-0,01	0,13	0,35	0,84	-0,34	0,17	-0,01
BIO	0,05	0,68	-0,22	0,01	0,30	0,52	0,35
GIB	-0,16	-0,37	0,36	0,19	0,80	0,17	0,02
CIT	0,58	0,08	0,42	-0,28	-0,03	0,38	-0,51
BRO	-0,39	-0,02	0,59	-0,41	-0,32	0,22	0,43

AIA = Ácido Indolacético; PSO = Fósforo Solúvel; EPS = Exopolissacarídeos; BIO = Biofilme; GIB = Giberelinas; CIT = Citocininas; BRO = Brotação da gema

5. CONCLUSÃO

Exceto o isolado 4, os demais apresentaram características significativas para a promoção do crescimento vegetal, portanto, sugerindo o potencial biotecnológico dos mesmos, devendo neste sentido serem considerados como candidatos para futuros testes de inoculação em plantas.

6 DESCRIÇÃO PATENTÁRIA



14:48

05/01/2016 87016000090



00.000.2.2.15.0858930.0

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2016 000130 7

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24464109000148

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Sociedade com intuito não econômico

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins

Cidade: Maceió

Estado: AL

CEP: 57072-970

País: Brasil

Telefone: 82-3214-1064

Fax: 82-3214-1035

Email: sbuchoa@gmail.com

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de BIOINOCULANTE CONTENDO BACILLUS MEGATERIUM EM Utilidade (54): COMPOSTO POLIMÉRICO

Resumo: A presente invenção compreende um inoculante em forma de gel, contendo a bactéria *B. megaterium* inserida em CMC e amido, para uso em solos agricultáveis, proporcionando a disponibilização do fósforo, contribuindo para promoção do crescimento do vegetal de interesse. Refere-se a um composto com a finalidade de induzir ao aumento da quantidade de fósforo disponível para absorção pelas plantas a partir do solo. A invenção permite a introdução de uma estirpe de *Bacillus megaterium* strain10 acessos GI:952025480 no solo, que tem o efeito de aumentar a solubilidade de fosfatos que podem ser nativos no solo ou adicionados a ele, na forma de fosfato de

rocha, de fosfato insolúvel ou fertilizante industrializado. A invenção é utilizada para aumentar as taxas de crescimento e o rendimento das culturas, e ao mesmo tempo eliminar ou reduzir a necessidade de fertilizantes químicos, preservando o ambiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, P. Fertilidade do solo após cinco anos de pastagem temporária e de monocultura de milho. 2014. Citado na página14.

ALAMI, Y. et al. Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflowers by an exopolysaccharide-producing *Rhizobium* sp. strain isolated from sunflower roots. *Applied and environmental microbiology*, Am Soc Microbiol, v. 66, n. 8, p. 3393 – 3398, 2000. Citado na página36.

ALIKHANI, H.; SALEH-RASTIN, N.; ANTOUN, H. Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. In: *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*. [S.l.]: Springer, 2007. p. 35 – 41. Citado 2 vezes nas páginas32e33.

ANDERSEN, J. B. et al. Surface motility in *Pseudomonas* sp. DSS73 is required for efficient biological containment of the root-pathogenic microfungi *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum*. *Microbiology*, Soc General Microbiol, v. 149, n. 1, p. 37 – 46, 2003. Citado na página37.

ARKHIPOVA, T. et al. Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant and Soil*, Springer, v. 272, n. 1-2, p. 201 – 209, 2005. Citado na página26.

ASGHAR, H. et al. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. *Biology and Fertility of Soils*, Springer, v. 35, n. 4, p. 231 – 237, 2002. Citado na página16.

ASHRAF, M. et al. Inoculating wheat seedlings with exopolysaccharide-producing bacteria restricts sodium uptake and stimulates plant growth under salt stress. *Biology and Fertility of soils*, Springer, v. 40, n. 3, p. 157 – 162, 2004. Citado 2 vezes nas páginas36e38.

AUDE, M. Estádios de desenvolvimento da cana-de-açúcar e suas relações com a produtividade. *Ciência Rural, Santa Maria*, v. 23, n. 2, p. 241 – 248, 1993. Citado na página23.

BARAZANI, O.; FRIEDMAN, J. Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria? *Journal of Chemical Ecology*, Springer, v. 25, n. 10, p. 2397 – 2406, 1999. Citado na página25.

BARRETO, M. do C. S. et al. Produção e Comportamento Reológico de Biopolímeros produzidos por rizóbios e caracterização genética. *Current Agricultural Science and Technology*, v. 17, n. 2, 2013. Citado na página 19.

BARRIUSO, J. et al. Screening for putative PGPR to improve establishment of the symbiosis *Lactarius deliciosus*-*Pinus* sp. *Microbial ecology*, Springer, v. 50, n. 1, p. 82 – 89, 2005. Citado na página 15.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biology and Biochemistry*, Pergamon, v. 30, n. 8, p. 1225 – 1228, 1998. Citado na página15.

BASHAN, Y.; SINGH, M.; LEVANONY, H. Contribution of *Azospirillum brasilense* Cd to growth of tomato seedlings is not through nitrogen fixation. *Canadian Journal of Botany*, NRC Research Press, v. 67, n. 8, p. 2429 – 2434, 1989. Citado na página28.

BEHERA, B. et al. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove—a review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, Elsevier, v. 3, n. 2, p. 97 – 110, 2014. Citado na página33.

BLOEMBERG, G. V.; LUGTENBERG, B. J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current opinion in plant biology*, Elsevier, v. 4, n. 4, p. 343 – 350, 2001. Citado na página39.

BODMAN, S. B. von; BAUER, W. D.; COPLIN, D. L. Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. *Annual review of phytopathology*, Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, v. 41, n. 1, p. 455 – 482, 2003. Citado na página22.

BRAGA, G. *Eficiência de fosfatos com solubilidade variável em água em solos com capacidade de fixação de fósforo induzida*. Tese (Doutorado) — Escola Superior de Agricultura âLuiz de Queiroz, 2006. Citado 3 vezes nas páginas16,17e18.

BURR, T.; SCHROTH, M.; SUSLOW, T. Increased potato yields by treatment of seedpieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* [Bacterization]. *Phytopathology*, 1978. Citado na página28.

CAPPELLI, G. et al. *Biofilm on artificial surfaces*. Karger Publishers, 2007. Citado na página21.

CARAVACA, F. et al. Assessing the effectiveness of mycorrhizal inoculation and soil compost addition for enhancing reforestation with *Olea europaea* subsp. *sylvestris* through changes in soil biological and physical parameters. *Applied Soil Ecology*, Elsevier, v. 20, n. 2, p. 107 – 118, 2002. Citado na página16.

CASAGRANDE, A.; VASCONCELOS, A. Fisiologia da parte aérea. *Cana-de-açúcar, eds LL Dinardo Miranda, ACM Vasconcelos, and MGA Landell*, 2008. Citado na página 40.

CASSAN, F. et al. Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. *European Journal of Soil Biology*, Elsevier, v. 45, n. 1, p. 12 – 19, 2009. Citado na página 15.

CASSÁN, F.D. et al. *Azospirillum* spp. metabolize [17, 17-2H2] gibberellin A20 to [17, 17-2H2] gibberellin A1 in vivo in dy rice mutant seedlings. *Plant and Cell Physiology*, Jpn Soc Plant Physiol, v. 42, n. 7, p. 763 – 767, 2001. Citado na página 26.

CERIGIOLI, M. M. Diversidade de bactérias endofíticas de raízes de milho (*Zea Mays L.*) e potencial para promoção de crescimento. *Diversidade de bactérias endofíticas de raízes de milho (Zea Mays L.) e potencial para promoção de crescimento*, 2006. Citado 3 vezes nas páginas 28, 29 e 38.

CERQUEIRA et al. Influência de bactérias do gênero bacillus sobre o crescimento de feijão comum (*Phaseolus vulgaris L.*). *Enciclopédia biosfera*. v.11, p.20, 2015.

CHABOT, R.; ANTOUN, H.; CESCAS, M. P. Stimulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique. *Can. J. Microbiol.* v. 39, p. 941-947, 1993.

CHANDLER, J. W. Local auxin production: a small contribution to a big field. *Bioessays*, Wiley Online Library, v. 31, n. 1, p. 60 – 70, 2009. Citado na página 25.

CHANG, W.-S. et al. Alginate production by *Pseudomonas putida* creates a hydrated microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance under water-limiting conditions. *Journal of bacteriology*, Am Soc Microbiol, v. 189, n. 22, p. 8290 – 8299, 2007. Citado na página 37.

CHAVES, M. M. et al. How plants cope with water stress in the field? Photosynthesis and growth. *Annals of botany*, Annals Botany Co, v. 89, n. 7, p. 907 – 916, 2002.

Citado na página 24.

CHEN, Y. et al. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied soil ecology*, Elsevier, v. 34, n. 1, p. 33 – 41, 2006. Citado na página 32.

CHOWDHURY, S. P. et al. Diversity of 16S-rRNA and nifH genes derived from rhizosphere soil and roots of an endemic drought tolerant grass, *Lasiurus indicus*. *European journal of soil biology*, Elsevier, v. 45, n. 1, p. 114 – 122, 2009. Citado na página 22.

COSTERTON, J. W. et al. Microbial biofilms. *Annual Reviews in Microbiology*, Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, v. 49, n. 1, p. 711 – 745, 1995. Citado 2 vezes nas páginas 19 e 21.

CREUS, C. M.; SUELDO, R. J.; BARASSI, C. A. Water relations and yield in Azospirillum-inoculated wheat exposed to drought in the field. *Canadian Journal of Botany*, NRC Research Press, v. 82, n. 2, p. 273 – 281, 2004. Citado na página34.

DANHORN, T.; FUQUA, C. Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, Annual Reviews, v. 61, p. 401 – 422, 2007. Citado 2 vezes nas páginas21 e22.

DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and molecular biology reviews*, Am Soc Microbiol, v. 64, n. 4, p. 847 – 867, 2000. Citado na página37.

DAVIES, D. G. et al. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, American Association for the Advancement of Science, v. 280, n. 5361, p. 295 – 298, 1998. Citado 2 vezes nas páginas19e37.

DECHO, A. W. Overview of biopolymer-induced mineralization: what goes on in biofilms? *Ecological Engineering*, Elsevier, v. 36, n. 2, p. 137 – 144, 2010. Citado na página22.

DELVASTO, P. et al. Characterization of brushite as a re-crystallization product formed during bacterial solubilization of hydroxyapatite in batch cultures. *Soil Biology and Biochemistry*, Elsevier, v. 38, n. 9, p. 2645 – 2654, 2006. Citado na página31.

DIMKPA, C.; WEINAND, T.; ASCH, F. Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant, cell environment*, Wiley Online Library, v. 32, n. 12, p. 1682 – 1694, 2009. Citado na página34.

DOBBELAERE, S. et al. Phytostimulatory effect of Azospirillum brasilense wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant and soil*, Springer, v. 212, n. 2, p. 153 – 162, 1999. Citado na página26.

DONLAN, R. M. et al. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*, v. 8, n. 9, 2002. Citado na página21.

FARIA, L.H.G.B.; GARCIA-CRUZ, C.H. Influência da taxa nitrogênio/carbono durante a produção de polissacarídeos por uma bactéria isolada do solo. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.145, p.1-10, 2006.

FLEMMING, H.-C. et al. Physico-chemical properties of biofilms. *Biofilms: recent advances in their study and control*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, p. 19 – 34, 2000. Citado na página37.

FUJISHIGE, N. A. et al. Investigations of Rhizobium biofilm formation. *FEMS microbiology ecology*, The Oxford University Press, v. 56, n. 2, p. 195 – 206, 2006. Citado na página37.

GIRI, B.; MUKERJI, K. Mycorrhizal inoculant alleviates salt stress in *Sesbania aegyptiaca* and *Sesbania grandiflora* under field conditions: evidence for reduced sodium and improved magnesium uptake. *Mycorrhiza*, Springer, v. 14, n. 5, p. 307 – 312, 2004. Citado na página16.

GÍRIO, L. A. da S. et al. Bactérias promotoras de crescimento e adubaç ao nitrogenada no crescimento inicial de cana-de-açúcar proveniente de mudas pré-brotadas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, SciELO Brasil, v. 50, n. 1, p. 33 – 43, 2015. Citado na página40.

GRAY, E.; SMITH, D. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry*, Elsevier, v. 37, n. 3, p. 395 – 412, 2005. Citado 4 vezes nas páginas14,15,24e27.

GROVER, M. et al. Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Springer, v. 27, n. 5, p. 1231 – 1240, 2011. Citado na página34.

GYANESHWAR, P. et al. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, Am Soc Microbiol, v. 183, n. 8, p. 2634 – 2645, 2001. Citado na página15.

GYANESHWAR, P. et al. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. In: *Food Security in Nutrient-Stressed Environments: Exploiting Plantsâ Genetic Capabilities*. [S.l.]: Springer, 2002. p. 133 – 143. Citado na página18.

HAN, H.; LEE, K. Plant growth promoting rhizobacteria effect on antioxidant status, photosynthesis, mineral uptake and growth of lettuce under soil salinity. *Res J Agric Biol Sci*, v. 1, n. 3, p. 210 – 215, 2005. Citado na página34.

HARDING, N. E. et al. Identification, genetic and biochemical analysis of genes involved in synthesis of sugar nucleotide precursors of xanthan gum. *Journal of general microbiology*, Soc General Microbiol, v. 139, n. 3, p. 447–457, 1993. Citado na página

19.

HARTMANN, A.; SINGH, M.; KLINGMÜLLER, W. Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indoleacetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*, NRC Research Press, v. 29, n. 8, p. 916 – 923, 1983. Citado na página

37.

HINTON, D. M.; BACON, C. W. *Enterobacter cloacae* is an endophytic symbiont of corn.

Mycopathologia, Springer, v. 129, n. 2, p. 117 – 125, 1995. Citado na página28.

HMIDA-SAYARI, A. et al. Overexpression of Δ 1 – *pyrroline* – 5 – *Carboxylatesynthetase* increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato *planT*–752, 2005. Citado na página33.

HUREK, T. et al. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. *Journal of bacteriology*, Am Soc Microbiol, v. 176, n. 7, p. 1913 – 1923, 1994. Citado na página28.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - Indicadores IBGE: Estatística da Produção Agrícola (Setembro de 2013). Acessado em Fevereiro de 2014 em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr_201309.pdf .

IGUAL, J. M. et al. Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. *Agronomie*, EDP Sciences, v. 21, n. 6-7, p. 561 – 568, 2001. Citado na página18.

INMAN-BAMBER, N.; SMITH, D. Water relations in sugarcane and response to water deficits. *Field crops research*, Elsevier, v. 92, n. 2, p. 185 – 202, 2005. Citado na página24.

INUI-KISHI, R. N. et al. Phosphorus solubilizing and IAA production activities in

plant growth promoting rhizobacteria from brazilian soils under sugarcane cultivation. *J. Eng. Appl. Sci*, v. 7, n. 11, p. 1446 – 1454, 2012. Citado na página [31](#).

JEFFERSON, K. K. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS microbiology letters*, The Oxford University Press, v. 236, n. 2, p. 163 – 173, 2004. Citado na página [37](#).

JOHNSON, D. Physiology and ecology of acidophilic microorganisms. *Physiology and biochemistry of extremophiles*, American Society for Microbiology, 2007. Citado na página [22](#).

JUHAS, M.; EBERL, L.; TÜMMLER, B. Quorum sensing: the power of cooperation in the world of Pseudomonas. *Environmental microbiology*, Wiley Online Library, v. 7, n. 4, p. 459 – 471, 2005. Citado na página [22](#).

JUNIOR, A. F. C.; OLIVEIRA, L. A. de; OLIVIERA, A. N. de. Produção de ácido indolacético por rizóbios isolados de caupi. *Ceres*, v. 56, n. 6, 2015. Citado 2 vezes nas páginas [26](#) e [38](#).

KAVAMURA, V. N. et al. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. *Microbiological research*, Elsevier, v. 168, n. 4, p. 183 – 191, 2013. Citado 4 vezes nas páginas [20](#), [23](#), [24](#) e [35](#).

KHALID, A.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology*, Wiley Online Library, v. 96, n. 3, p. 473 – 480, 2004. Citado 2 vezes nas páginas [25](#) e [26](#).

KHAN, A. A. et al. Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. *J Agric Biol Sci*, v. 1, n. 1, p. 48 – 58, 2009. Citado na página [32](#).

KLEIN, V. et al. Características agronômicas, químicas e bromatológicas de variedades de cana-de-açúcar para uso forrageiro. Universidade Federal de Goiás, 2010. Citado na página [13](#).

KLOEPPER, J. W.; SCHROTH, M. N. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. *Proceedings of the 4th international conference on plant pathogenic bacteria*, v. 2, p. 879 – 882, 1978. Citado 2 vezes nas páginas15e28.

KNEE, E. M. et al. Root mucilage from pea and its utilization by rhizosphere bacteria as a sole carbon source. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, Am Phytopath Society, v. 14, n. 6, p. 775 – 784, 2001. Citado na página37.

KOENIG, R. L.; MORRIS, R. O.; POLACCO, J. C. tRNA is the source of low-level trans-zeatin production in *Methylobacterium* spp. *Journal of bacteriology*, Am Soc Microbiol, v. 184, n. 7, p. 1832 – 1842, 2002. Citado na página26.

KOKALIS-BURELLE, N.; KLOEPPER, J.; REDDY, M. Plant growth-promoting rhizobacteria as transplant amendments and their effects on indigenous rhizosphere microorganisms. *Applied Soil Ecology*, Elsevier, v. 31, n. 1, p. 91 – 100, 2006. Citado na página15.

KOMLOS, J. et al. Interaction of *Klebsiella oxytoca* and *Burkholderia cepacia* in dual-species batch cultures and biofilms as a function of growth rate and substrate concentration. *Microbial ecology*, Springer, v. 49, n. 1, p. 114 – 125, 2005. Citado na página21.

KUMAR, A.; PRAKASH, A.; JOHRI, B. *Bacillus* as PGPR in crop ecosystem. In: *Bacteria in agrobiology: crop ecosystems*. [S.l.]: Springer, 2011. p. 37 – 59. Citado na página15.

LAMBRECHT, M. et al. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria–plant interactions. *Trends in microbiology*, Elsevier Current Trends, v. 8, n. 7, p. 298 – 300, 2000. Citado 3 vezes nas páginas26,38e39.

LATASA, C. et al. Biofilm-associated proteins. *Comptes rendus biologies*, Elsevier, v. 329, n. 11, p. 849 – 857, 2006. Citado na página22.

LIDDYCOAT, S. M.; GREENBERG, B. M.; WOLYN, D. J. The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on asparagus seedlings and germinating seeds subjected to water stress under greenhouse conditions. *Canadian journal of microbiology*, NRC Research Press, v. 55, n. 4, p. 388 – 394, 2009. Citado na página24.

LIU, S.-B. et al. Structure and ecological roles of a novel exopolysaccharide from the

Arctic sea ice bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain SM20310. *Applied and environmental microbiology*, Am Soc Microbiol, v. 79, n. 1, p. 224 – 230, 2013. Citado na página19.

MACHADO, R. G. Promoção de crescimento em gramíneas forrageiras por rizóbios isolados de *Lotus corniculatus*. 2011. Citado na página40.

MADI, N.; MCNEIL, B.; HARVEY, L. Effect of exogenous calcium on morphological development and biopolymer synthesis in the fungus *Aureobasidium pullulans*. *Enzyme and microbial technology*, Elsevier, v. 21, n. 2, p. 102 – 107, 1997. Citado na página20.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.; OLIVEIRA, S. Avaliação do estado nutricional das plantas: Princípios, métodos e técnicas de avaliação do estado nutricional. *Avaliação do estado nutricional das plantas: Princípios, métodos e técnicas de avaliação do estado nutricional*, Potafos Piracicaba, 1997. Citado na página17.

MAYAK, S.; TIROSH, T.; GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, Elsevier, v. 42, n. 6, p. 565 – 572, 2004. Citado 2 vezes nas páginas24e34.

MONDS, R. D.; O'ATOOLE, G. A. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends in microbiology*, Elsevier, v. 17, n. 2, p. 73 – 87, 2009. Citado 2 vezes nas páginas13e22.

MOREIRA, F.de S. *Microbiologia e bioquímica do solo*. [S.l.]: Ufla, 2006. Citado na página15.

MORRIS, C. E.; MONIER, J.-M. The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annual review of phytopathology*, Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, v. 41, n. 1, p. 429 – 453, 2003. Citado na página36.

MUNDREE, S. G. et al. Physiological and molecular insights into drought tolerance. *African Journal of Biotechnology*, Academic Journals (Kenya), v. 1, n. 2, p. 28 – 38, 2002. Citado na página33.

NAHAS, E.; CENTURION, J.; ASSIS, L. Efeito das características químicas dos solos sobre os microrganismos solubilizadores de fosfato e produtores de fosfatases. *Revista Brasileira de Ciência do solo*, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v. 18, n. 1, p. 49

– 53, 1994. Citado na página17.

NAMPOOTHIRI, K. M. et al. Fermentative production of gellan using *Sphingomonas paucimobilis*. *Process Biochemistry*, Elsevier, v. 38, n. 11, p. 1513 – 1519, 2003.

Citado na página20.

NARSIAN, V.; PATEL, H. Rock phosphate dissolution by specific yeast. *Indian journal of microbiology*, Springer, v. 50, n. 1, p. 57 – 62, 2010. Citado na página36.

NARSIAN, V. T.; PATEL, H. Relationship of physicochemical properties of rhizosphere soils with native population of mineral phosphate solubilizing fungi. *Indian journal of microbiology*, Springer, v. 49, n. 1, p. 60 – 67, 2009. Citado na página33.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS microbiology Letters*, The Oxford University Press, v. 170, n. 1, p. 265 – 270, 1999. Citado na página31.

NORMANLY, J. Approaching cellular and molecular resolution of auxin biosynthesis and metabolism. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, Cold Spring Harbor Lab, v. 2, n. 1, 2010. Citado na página25

OLIVEIRA, A. de; DINIZ, J.; ALMEIDA, J. Multiplicação e enraizamento in vitro do mandacaru (*Cereus jamacaru* P.DC.). *Plant Cell Culture Micropropagation*, p. 48 – 54, 2008. Citado na página27.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, v. 54, n. 1, p. 49 – 79, 2000. Citado na página22.

OUYANG, J.; SHAO, X.; LI, J. Indole-3-glycerol phosphate, branchpoint of indole-3-acetic acid biosynthesis from the tryptophan biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, Wiley Online Library, v. 24, n. 3, p. 327 – 334, 2000. Citado na página25.

PARIZZI, S. Ades ao bacteriana em superfície de serviços de alimentação ao hospitalar avaliada pela microscopia de epifluorescência. *Viçosa, MG: UFV*, 1998.

Citado na página21.

PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and environmental microbiology*, Am Soc Microbiol, v. 68, n. 8, p. 3795 – 3801, 2002. Citado na página26.

PEDRAZA, R. O. et al. Aromatic amino acid aminotransferase activity and indole-3-acetic acid production by associative nitrogen-fixing bacteria. *FEMS microbiology letters*, The Oxford University Press, v. 233, n. 1, p. 15 – 21, 2004. Citado na página38.

PEDRINHO, E. A. N. et al. Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho. *Bragantia*, SciELO Brasil, v. 69, n. 4, p.905 – 911, 2010. Citado 2 vezes nas páginas 25 e 31

PEDROSA, R. et al. Avaliação dos parâmetros dos colmos da cana-de-açúcar, segunda folha, submetida a níveis de irrigação e adubação. *R. Biol. Ci. Terra*, v. 5, n. 1, p. 1 – 5, 2005. Citado na página23.

PEER, R. van; SCHIPPERS, B. Plant growth responses to bacterization with selected *Pseudomonas* spp. strains and rhizosphere microbial development in hydroponic cultures. *Canadian Journal of Microbiology*, NRC Research Press, v. 35, n. 4, p. 456–463, 1989. Citado na página28.

PEIX, A. et al. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, Elsevier, v. 33, n. 1, p. 103 – 110, 2001. Citado na página18.

PEREZ, E. et al. Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. *Soil Biology and Biochemistry*, Elsevier, v. 39, n. 11, p. 2905 – 2914, 2007. Citado na página33.

PERSELLO-CARTIEAUX, F.; NUSSAUME, L.; ROBAGLIA, C. Tales from the underground: molecular. *Plant, Cell Environment*, Wiley Online Library, v. 26, n. 2, p. 189 – 199, 2003. Citado na página39.

PIMENTEL, C. A relação da planta com a água. *Seropédica: Edur*, 2004. Citado 2

vezes nas páginas23 e24.

POLLMANN, S.; MÜLLER, A.; WEILER, E. Many roads lead to âauxinâ: of nitrilases, synthases, and amidases. *Plant Biology*, Wiley Online Library, v. 8, n. 3, p. 326 – 333, 2006. Citado na página25.

QUEIROZ, B. P.de; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; MELO, I. S. Visualização in vitro da colonização de raízes por rizobactérias. *Summa Phytopathologica*, SciELO Brasil, v. 32, n. 1, p. 95 – 97, 2006. Citado na página28.

QURASHI, A. W.; SABRI, A. N. Bacterial exopolysaccharide and biofilm formation stimulate chickpea growth and soil aggregation under salt stress. *Brazilian Journal of Microbiology*, SciELO Brasil, v. 43, n. 3, p. 1183 – 1191, 2012. Citado na página35.

RAIJ, B. VAN. Fertilidade do solo e adubação. Fertilidade do solo e adubação, Ceres Potafos Piracicaba, 1991. Citado na página 16.

RAMEY, B. E. et al. Biofilm formation in plant–microbe associations. *Current opinion in microbiology*, Elsevier, v. 7, n. 6, p. 602 – 609, 2004. Citado na página37.

RAVEN, P.H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. *Biology of plants*. [S.l.]: Macmillan, 2005. Citado na página25.

ROCHA, F. R. et al. Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. *BMC genomics*, BioMed Central Ltd, v. 8, n. 1, 2007. Citado 2 vezes nas páginas16e38.

ROSS, J. J. et al. Auxin-gibberellin interactions and their role in plant growth. *Journal of plant growth regulation*, Springer, v. 20, n. 4, p. 336 – 353, 2001. Citado na página27.

ROSSOLINI, G. et al. Bacterial nonspecific acid phosphohydrolases: physiology, evolution and use as tools in microbial biotechnology. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, Springer, v. 54, n. 8, p. 833 – 850, 1998. Citado na página17.

RUMJANEK, N. G.; FONSECA, M.; XAVIER, G. Quorum sensing. *Revista Biotecnologia Ciência Desenvolvimento-Edição nº*, v. 33, 2004. Citado 2 vezes nas páginas22e37.

SAHARAN, B.; NEHRA, V. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sci Med Res*, v. 21, p. 1 – 30, 2011. Citado na página24.

SAKURAGI, Y.; KOLTER, R. Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (pel) of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, Am Soc Microbiol, v. 189, n. 14, p. 5383 – 5386, 2007. Citado na página22.

SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Annals of botany*, Annals Botany Co, v. 111, n. 5, p. 743 – 767, 2013. Citado na página40.

SANTOS, A. A. I. dos. *Movimento Negro e o Estado (1983-1987): o caso do Conselho de Participação e Desenvolvimento da Comunidade Negra no Governo de São Paulo*. Dissertação (Mestrado) — Universidade de Campinas, Campinas, 12 2001. Citado 2 vezes nas páginas13e14.

SARAF, M.; RAJKUMAR, S.; SAHA, T. Perspectives of PGPR in agri-ecosystems. In: *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems*. [S.l.]: Springer, 2011. p. 361 – 385. Citado na página15.

SAUER, K. et al. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of bacteriology*, Am Soc Microbiol, v. 184, n. 4, p. 1140 – 1154, 2002. Citado na página22.

SAVADOGO, A. et al. Identification of exopolysaccharides-producing lactic acid bacteria from Burkina Faso fermented milk samples. *African Journal of Biotechnology*, Academic Journals (Kenya), v. 3, n. 3, p. 189 – 194, 2004. Citado na página35.

SCHROEDER, J. I.; KWAK, J. M.; ALLEN, G. J. Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. *Nature*, Nature Publishing Group, v. 410, n. 6826, p. 327 – 330, 2001. Citado na página23.

SEESURIYACHAN, P. et al. Optimization of exopolysaccharide overproduction by *Lactobacillus confusus* in solid state fermentation under high salinity stress. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, Taylor Francis, v. 76, n. 5, p. 912 – 917, 2012. Citado 2 vezes nas páginas18e35.

SERNA-COCK, L.; ARIAS-GARCÍA, C.; HERNANDEZ, L. J. V. EFFECT OF

BIOFERTILIZATION ON THE GROWTH OF POTTED SUGARCANE PLANTS (*Saccharum officinarum*). *Bioteconología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, Universidad del Cauca, Vicerrectoria de Investigaciones, v. 9, n. 2, p. 85 – 95, 2011. Citado na página41.

SGROY, V. et al. Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. *Applied microbiology and Biotechnology*, Springer, v. 85, n. 2, p. 371 – 381, 2009. Citado na página38.

SILVA, V. de P.D. et al. Risco climático da cana-de-açúcar cultivada na região Nordeste do Brasil. *R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental*, SciELO Brasil, v. 17, n. 2, p. 180– 189, 2013. Citado 3 vezes nas páginas13,18e20.

SILVEIRA, A. B. da. Isolamento e caracterização de linhagens de *Bacillus* e *Paenibacillus* promotores de crescimento vegetal em lavouras de arroz e trigo do Rio Grande do Sul. 2008. Citado na página40.

SIMOES, L. C.; SIMOES, M.; VIEIRA, M. J. Biofilm interactions between distinct bacterial genera isolated from drinking water. *Applied and environmental microbiology*, Am Soc Microbiol, v. 73, n. 19, p. 6192 – 6200, 2007. Citado na página21.,

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting actions of rhizobacteria. *Advances in botanical research*, Elsevier, v. 51, p. 283 – 320, 2009. Citado na página24.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS microbiology reviews*, The Oxford University Press, v. 31, n. 4, p. 425 – 448, 2007. Citado na página25.

STOCK, J. B. Two-component signal transduction systems: structure-function relationships and mechanisms of catalysis. *Two-component signal transduction*, ASM Press, p. 25 – 51, 1995. Citado na página17.

STOODLEY, P. et al. Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Reviews in Microbiology*, Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto,

CA 94303-0139, USA, v. 56, n. 1, p. 187 – 209, 2002. Citado na página22.

STURZ, A. The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization. *Plant and soil*, Springer, v. 175, n. 2, p. 257 – 263, 1995. Citado na página 28.

SUTHERLAND, I. W. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. *International Dairy Journal*, Elsevier, v. 11, n. 9, p. 663 – 674, 2001. Citado na página19.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal 3 ed. *Porto Alegre: Artmed*, 2004. Citado 2 vezes nas páginas25e39.

TEALE, W. D.; PAPONOV, I. A.; PALME, K. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Nature Publishing Group, v. 7, n. 11, p. 847 – 859, 2006. Citado na página25.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR (UNICA). Estudos mostram melhorias no mercado de trabalho do setor sucroalcooleiro e desafios a mecanização, 2008. Disponível em <<http://www.unica.com.br/noticia/508488792036979688/estudos-mostram-melhorias-no-mercado-de-trabalho-do-setor-sucroalcooleiro-e-desafios-da-mecanizacao/>> Acesso em 06 de abril de 2015.

UNICA – União da Indústria de Cana-de-açúcar – Levantamento da safra 2012/2013 – Acessado em Fevereiro de 2014 em: <http://www.unica.com.br/>

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA) - Relatórios. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov>>. Acesso em 2012

VENIERAKI, A. et al. The genetic diversity of culturable nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere of wheat. *Microbial ecology*, Springer, v. 61, n. 2, p. 277 – 285, 2011.

Citado na página32.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *Journal of Biotechnology*, Elsevier, v. 91, n. 2, p. 127 – 141, 2001. Citado 2 vezes nas páginas26 e29.

- VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil*, Springer, v. 255, n. 2, p. 571 – 586, 2003. Citado na página18.
- VIEIRA, E.; MONTEIRO, C. Hormônios vegetais. *Introdução à fisiologia do desenvolvimento vegetal*. Maringá: Eduem, p. 79 – 104, 2002. Citado na página27.
- VUYST, L. D. et al. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, Elsevier, v. 11, n. 9, p. 687 – 707, 2001. Citado na página18.
- WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of experimental Botany*, Soc Experiment Biol, v. 52, n. suppl 1, p. 487 – 511, 2001. Citado na página28.
- WHITCHURCH, C. B. et al. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*, American Association for the Advancement of Science, v. 295, n. 5559, p. 1487 – 1487, 2002. Citado na página37.
- WIMPENNY, J.; MANZ, W.; SZEWZYK, U. Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiology Reviews*, The Oxford University Press, v. 24, n. 5, p. 661 – 671, 2000. Citado na página21.
- WOODWARD, A. W.; BARTEL, B. The Arabidopsis peroxisomal targeting signal type 2 receptor PEX7 is necessary for peroxisome function and dependent on PEX5. *Molecular biology of the cell*, Am Soc Cell Biol, v. 16, n. 2, p. 573 – 583, 2005. Citado na página25.
- XAVIER, J. B.; FOSTER, K. R. Cooperation and conflict in microbial biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, National Acad Sciences, v. 104, n. 3, p. 876 – 881, 2007. Citado 2 vezes nas páginas19e37.
- YANNI, Y.G. et al. The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with rice roots. *Functional Plant Biology*, CSIRO, v. 28, n. 9, p. 845 – 870, 2001. Citado na página39.
- YI, Y.; HUANG, W.; GE, Y. Exopolysaccharide: a novel important factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Springer, v. 24, n. 7, p. 1059 – 1065, 2008. Citado na página36.

YUKSEKDAG, Z. N.; ASLIM, B. Influence of Different Carbon Sources on Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (B3, G12) and *Streptococcus thermophilus* (W22). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, SciELO Brasil, v. 51, n. 3, p. 581 – 585, 2008. Citado na página35.

YUWONO, T.; HANDAYANI, D.; SOEDARSONO, J. The role of osmotolerant rhizobacteria in rice growth under different drought conditions. *Crop and Pasture Science*, CSIRO, v. 56, n. 7, p. 715 – 721, 2005. Citado na página34.

ZAIDI, A. et al. Recent advances in plant growth promotion by phosphate-solubilizing microbes. In: *Microbial Strategies for Crop Improvement*. [S.l.]: Springer, 2009. p. 23 –. Citado na página32.

ZHANG, R. et al. Arabidopsis Indole Synthase, a Homolog of Tryptophan Synthase Alpha, is an Enzyme Involved in the Trp-independent Indole-containing Metabolite Biosynthesis. *Journal of integrative plant biology*, Wiley Online Library, v. 50, n. 9, p. 1070 – 1077, 2008. Citado na página25.

ZHAO, J.-L.; ZHOU, L.-G.; WU, J.-Y. Promotion of *Salvia miltiorrhiza* hairy root growth and tanshinone production by polysaccharide–protein fractions of plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus cereus*. *Process Biochemistry*, Elsevier, v. 45, n. 9, p. 1517 – 1522, 2010. Citado 2 vezes nas páginas25e32.

ANEXO 1

Identificação das sequencias 16S rRNA dos isolados bacterianos

Enterobacter cloacae strain 07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: KT998648.1

[GenBank Graphics](#)

>gi|952025476|gb|KT998648.1| Enterobacter cloacae strain 07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

ATTGGAATTCCCCTCCTTAAGCTTGACTCCCAGGATCGAACGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGA
 AGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAG
 CTAATACCGCATAATGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCCTTTGCCATCAGATGTGCCCAGA
 TGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACC
 AGCCCACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGG
 CGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGA
 GGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCAGGCTAACTCCGTGC
 CAGCAGCCCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCGGGCG
 GTCTGTCAAGTCCGATGTGAAAAATCCCCCGGGCTCAACCTGGGAAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTG
 GGAGTCTTTGTAGAGGGGGGGTAGATTTCCAGGGTGTAAAGCGTGAAAATGCGTAGAGATCTGGGAGGA
 ATACTCGGGGGCGAAGGGCGGTCTCCCTGGACAAAGACTGAACGGTTCAGGTGCGAAAAGCGTGGCGGAG
 CAAATAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGAAACGATGTTTCAATTTGGAGGGTTGTGCCCTTA
 GAGGCGTGGCTTTCGGAGCTTAACCCGGTTAAATCGACCGCCCTTGGGGGAGGTAACGGCCGGCAGGGT
 ATAAAACTCAAAAAG

Enterobacter cloacae strain 08 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: KT998651.1

[GenBank Graphics](#)

>gi|952025479|gb|KT998651.1| Enterobacter cloacae strain 08 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GTCGAACGGTAGCACAAAAGAGCTTGCTCTCGGGAGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAAC
 TGCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAATGTCGCAAGACCAAAGAGGG
 GGACCTTCGGGCCCTTTGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCAC
 TAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCC
 TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAA
 GAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGC
 GTTACCCGCAAAAAGAAGCACCAGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCACGCGTTA
 ATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGCTCAAC
 CTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGTTGGAGTCTTGTACAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTG
 AAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTG
 CGAAAAGCGTGGGGAGCAAAAAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACCATGTGATTTGGAGGT
 TGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAATCGACCCCTTGGGGAGTACGGCCGCAAGGT
 TAA

Enterobacter cloacae strain 09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: KT998649.1

[GenBank Graphics](#)

>gi|952025477|gb|KT998649.1| Enterobacter cloacae strain 09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

```
TTGGAATCACCGTCTTAGCTTGGATCCCGCGGATCGAACGGTAGCACAGGAGAGCTTGCTCTCGTGGA
GAAGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGT
AGCTAATACCGCATAATGTTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCCTCTTGCCATCAGATGTGCCCA
GATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGA
CCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATG
GGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGG
GAGGAAGGTGTTGAGGTTAATAACCACAACAATTGACGTTACCCGCAAAGAAGCACCGGCTAACTCCGT
GCCAGCAGCCCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGC
GGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAAATCCCCGGGCTCAACCCTGGGAAGTGCATTTGAAAACGGCAGGCT
GGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTTCCAGGGGTTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGGAGGAATCC
CCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAAGCGTGCAGGAGCAAACGG
ATTAGAATACCCCTGGTAGTTCCACGCCCCTAAACGATGTCCATTTGGGAAGGTTGCGCCCCCTGAAGCCG
TGGCTTTCGGAAGCTTACCGCGGTAAAAATCGACCGCCCTGGGGGAGAAACGCCCGCAAGGTTAAAACC
TCAAATGAAATTGAC
```

Bacillus megaterium strain 10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: KT998652.1

[GenBank Graphics](#)

>gi|952025480|gb|KT998652.1| Bacillus megaterium strain 10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

```
GTCGAGCGAACTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAAC
CTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTTCATGGGA
GATGATTGAAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTA
ACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCG
CGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAATAATCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACAAGAGTAACTGCT
TGTACCTTGACGGTACCTAACCGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT
GGCAAGCGTTATCCGGAATTATTTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCC
CCCGGTTCAACCGTGGAGGGTCATTGAAAACGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCA
CGTGTAGCGATGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGCGCAAGGCGGCTTTTTTGGTCTGTATG
ACGCTGAGGCGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACCCGTAACCGATGA
```

GTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCCGCCCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGA
GTA

Bacillus subtilis strain 12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: KT998653.1

[GenBank Graphics](#)

>gi|952025481|gb|KT998653.1| Bacillus subtilis strain 12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

TCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTG
CCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAA
ACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATG
GCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCTACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC
AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGT
GAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACC GTTCGAATAGGGCGG
TACCTTGACGGTACCTAACAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGAAAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAAGCC
CCCCGGCTCAACCGGGGGAGGGTTCATTGGAAAACCTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATT
CCACGTGTAGCGGTGAAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGT
AACTGACGCTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGAGTCCACGCCGTAAAC
GATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTTAAGCACTCCGCC
TGGGG

Paenibacillus lautus strain 16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: KT998650.1

[GenBank Graphics](#)

>gi|952025478|gb|KT998650.1| Paenibacillus lautus strain 16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

TCAGGGTTTCATGTCCGTTAAGCTTGATACATGGGCGTCGAGCGGACCTGATGGAGTGCTTGCGCTCTTG
AAGGGTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCCTCAAGACTGGGATAACTACCGGAAAC
GGTAGCTAATACCGGATAATTTATTTTGCAGCATTGTGGAATAATGAAAGGCGGAGCAATCTGTCACTTG
AGGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGAC
CTGAGAGGGTGAACGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCACCAGTAGGGAA
TCTTCCCGCATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCCCCGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGGAAAGC
TCTGTTGCCAAGAAAAGACGTCTTCTAAAGTAACTGCTAGGAGAGTGACGGTACTTGAGAAGAAGCCCGG
CTAACTAAGGTGCCAGCAGCCGCGGAAAAACGTAGGGGGCAAGCGTTGCCCGGAAATTTATTGGGCGTAA
AGCGCGCGCAGGCGGTTCTTTAAAGTCTGGTGTTTAAACCCGAGGGCTCAATTTCCGGTTCGACTGGAAAC
TGGGGGAATTTGAGTGCAGAAGAGGGAGTGGAATTCCTCCGTTGGTGGCGGAGAAAATGCGTAAAATATGT
GGAAGAACCACCAGTGGCGAAGGCCACCTCCTCTGGGCTGATAACTGACCCTGAGGCGCGAAAGCCGTGG
GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCGGGTAGTCCAACGCCCGCAAACGAATGAATGCTAGGGTTTTAAG

GGGTTTTCGACTACTCTTTGGCGCCCGAAGTTAACACATTAAAGCTTTTCCCGCCGGGAGAAGAAAACGC
GTCGCCAAAACCTGAA

Pseudomonas sp. 17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: KT998654.1

[GenBank Graphics](#)

>gi|952025482|gb|KT998654.1| Pseudomonas sp. 17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

TCGAGCGGTAGAGAGAAGCTTGCTTCTCTTGAGAGCGGCGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCT
GGTAGTGGGGGATAACGTTTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACC
TTCGGGCCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGC
GACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGG
GAGGCAGCAGTGGGGAAATATTGGACAATGGGGCAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGG
TCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTTACCTAATACGTGATTGTTTTGACGTTA
CCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCG
GAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTTGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGG
GAACTGCATTCAAAACCTGACTGACTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCCCTGTGTAGCGGTGAAAT
GCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTAATACTGACACTGAGGTGCGAA
AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGG
AGCCTTGAGCTTTTAGTGGCGCAGCTCACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAA
AACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGT

Bacillus subtilis strain 20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: KT998655.1

[GenBank Graphics](#)

>gi|952025483|gb|KT998655.1| Bacillus subtilis strain 20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

TAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGG
CTAATACCGGATGCTTGTGTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCCTTACAGAT
GGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAG
AGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCC
GCAATGGACGAAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTT
GTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCAAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCAGGCTAC
TACGTGCCAGCAGCCGAATACGTAGGGCAAGGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTTCGAGGGGTT
TCTTAAGTCTGATGTAAAGCCCCGCTCAACCCGGGGGGGGTTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCA
GAAGAGGAGAGTGGAAATTTCCACCTGTAGCGGTGGAATGCGTAGAGATGTGGGGAACACCAGGGCGAAGG
CGACTCTCTGGTCTGTAAC

Bacillus pumilus strain 23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: KT998656.1

[GenBank Graphics](#)

>gi|952025484|gb|KT998656.1| Bacillus pumilus strain 23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

```
CATGCAAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGG
GTAACCTGCCTGTAGAACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCA
TGGTTCAAGGATGAAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTG
GGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGA
CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCGCTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTCACGGAGCAA
CGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTATAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCAGAGAGTAA
CTGCTCGCACCTTGACGCTACATAACCAGAAAGCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT
AGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGTGCGTAAAGGGCTCGCAGGGGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAG
AGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAAACTCCG
```