

***Métodos Qualitativos para
Determinação de Características
Bioquímicas e Fisiológicas
Associadas com Bactérias
Promotoras do Crescimento
Vegetal***



comitê de publicações

CLARA BEATRIZ HOFFMANN-CAMPO
presidente

ALEXANDRE JOSÉ CATTELAN
ALEXANDRE LIMA NEPOMUCENO
FLÁVIO MOSCARDI
IVANIA APARECIDA LIBERATTI
LÉO PIRES FERREIRA
MILTON KASTER
NORMAN NEUMAIER
ODILON FERREIRA SARAIVA

tiragem

500 exemplares
Dezembro/1999

579.334

C368m Cattelan, Alexandre José

1999 Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal / Alexandre José Cattelan. - Londrina: Embrapa Soja, 1999.

36p. - (Embrapa Soja. Documentos, 139)

ISSN 1516-781X

1. Rizobactéria. 2. *Rhizobium*. 3. Planta-Crescimento. 4. Planta-Fisiologia. 5. Soja-Inoculação. I. Título. II. Série.

ã Embrapa 1999

Conforme Lei 5.988 de 14.12.73

Apresentação

A busca de técnicas que proporcionem a prática da agricultura limpa é uma das prioridades da Embrapa Soja e da Embrapa como um todo. Muitas dessas técnicas envolvem o uso de organismos e microrganismos benéficos às plantas. Um dos exemplos clássicos é a inoculação com rizóbio para fixação biológica do nitrogênio em soja e outras leguminosas.

A diversidade microbiana dos solos, especialmente em regiões tropicais, é muito grande. Muitos desses microrganismos são patogênicos ou nocivos às plantas, mas também há aqueles que são benéficos. A seleção destes, para os diversos aspectos desejáveis do crescimento das culturas, no entanto, é um processo laborioso e caro, na maioria das vezes. Técnicas simples e rápidas são necessárias para poder ampliar a capacidade dessa seleção. A uniformização dessas técnicas também é um aspecto desejado pois facilita a comparação de resultados entre laboratórios. Nesse contexto situa-se esse manual, onde são apresentados métodos qualitativos para a seleção inicial de bactérias promotoras do crescimento vegetal.

José Renato Bouças Farias

*Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento
Embrapa Soja*

Sumário

<i>Introdução.....</i>	<i>7</i>
<i>Metodologia para as análises em laboratório</i>	<i>11</i>
1. Produção de Sideróforos	12
2. Produção de ácido indol acético (AIA)	14
3. Produção de citocininas e giberelinas	15
4. Fixação assimbiótica de N ₂	17
5. Produção de quitinase	20
6. Produção de b-1,3-glucanase	21
7. Produção de 1-aminociclopropano-1-carboxylato deaminase	22
8. Produção de ácido cianídrico	23
9. Solubilização de Fosfatos	24
10. Produção de pectinase	26
11. Produção de celulase	27
12. Antagonismo direto a fungos	28
13. Antagonismo indireto a fungos (compostos volatéis)	29
14. Antagonismo entre bactérias	30
<i>Agradecimentos</i>	<i>31</i>
<i>Referências Bibliográficas</i>	<i>31</i>

Métodos Qualitativos para Determinação de Características Bioquímicas e Fisiológicas Associadas com Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal

Alexandre José Cattelan¹

Introdução

Bactérias que crescem próximo às raízes e que são estimuladas pelos exsudatos radiculares são chamadas rizobactérias. Algumas dessas rizobactérias têm a capacidade de promover o crescimento vegetal através de diferentes mecanismos quando inoculadas nas sementes ou no solo e são, por isso, conhecidas como RPCP (rizobactérias promotoras do crescimento de plantas). Geralmente, o crescimento vegetal é aumentado porque as RPCP solubilizam fosfatos minerais ou outros nutrientes do solo e produzem ou alteram a concentração de hormônios vegetais como ácido indol acético, ácido giberélico, citocininas e etileno ou fixam nitrogênio associativamente. As RPCP também podem apresentar efeito sinérgico com a fixação simbiótica do nitrogênio, no caso das leguminosas. Além de promover o crescimento vegetal, algumas RPCP também controlam organismos fitopatogênicos provenientes do solo ou de sementes, especialmente fungos, através da produção de sideróforos, *b*-1,3-glucanase, quitinases, antibióticos e ácido cianídrico.

Os principais mecanismos envolvidos na solubilização de fosfatos por microrganismos são produção de CO₂ e ácidos orgânicos, redução de compostos de Fe³⁺ para compostos de Fe²⁺ e produção de H₂S sob baixas concentrações de O₂ (Mulder *et al.*, 1969). Jiang & Sato (1994) estudaram bactérias rizosféricas de trigo

¹ Engenheiro Agrônomo, Ph.D., Pesquisador da Embrapa Soja.

(*Triticum aestivum* L.) com 26 a 68 dias de crescimento e observaram que havia correlação linear positiva entre o crescimento das plantas e o número das bactérias solubilizadoras de P ($r=0,73$), *Pseudomonas* fluorescentes ($r=0,68$) e bactérias celulolíticas ($r=0,72$). Em outro estudo, também com trigo, quando esse foi inoculado com um isolado de *Penicillium radicum*, com capacidade para solubilizar fosfato *in vitro*, houve aumento de 14% na produção de grãos, no experimento de campo, e aumentos na absorção de P (10%) e na produção de grãos (9%), no experimento em casa de vegetação (Whitelaw *et al.*, 1997). Em outro estudo, a inoculação com nove bactérias ou o tratamento de sementes de duas cultivares de soja, Bragg e EMBRAPA 4, com os metabólitos dessas bactérias, proporcionou aumentos nas concentrações de N, P, Fe, Ca e Cu, na parte aérea, por alguns desses tratamentos (Cattelan, 1995a).

Muitas RPCP aumentam o comprimento das raízes e o número dos pêlos radiculares. Esse efeito é atribuído à produção bacteriana de hormônios vegetais ou reguladores do crescimento vegetal. Tien *et al.* (1979) observaram que o número de raízes laterais em milheto (*Pennisetum americanum* L.), crescido em condições axênicas, aumentou e ficaram altamente cobertas por pêlos radiculares com a inoculação com *Azospirillum brasilense*. Os autores observaram que as substâncias produzidas por essa bactéria, responsáveis por esses efeitos, eram ácido indol acético (AIA), giberelinas e citocininas. Efeitos semelhantes foram observados em tomate (*Lycopersicon esculentum* L.; Hadas & Okon, 1987), inoculado com *A. brasilense*, e em soja (*Glycine max* (L.) Merr.), inoculada com diferentes isolados de *Pseudomonas* spp. (Cattelan, 1993 e 1995b). Em 1995, Glick e Glick *et al.* propuseram um novo método para seleção de RPCP baseado na utilização bacteriana do composto 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) como única fonte de nitrogênio, através da ação da enzima ACC deaminase. ACC é o precursor imediato do hormônio etileno. Segundo os autores, essa enzima pode estimular o crescimento vegetal e o comprimento das raízes, em particular, seqüestrando e hidrolizando ACC das semen-

tes em germinação, diminuindo, conseqüentemente, a concentração de etileno nas sementes. Para a maioria das espécies vegetais, o etileno estimula a germinação e quebra a dormência das sementes (Esashi, 1991) mas se a concentração desse hormônio, após a germinação, for muito alta, o alongamento das raízes assim como a fixação simbiótica do nitrogênio, em plantas leguminosas, é inibido (Jackson, 1991). O maior desenvolvimento do sistema radicular possibilita a exploração de um maior volume de solo. Com isso, as plantas ficam menos suscetíveis ao déficit hídrico e à escassez de nutrientes.

Um número reduzido de bactérias possui a capacidade de fixar nitrogênio simbioticamente, como *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* spp., ou assimbioticamente, como *Azospirillum* e *Azotobacter* spp. Teoricamente, essas bactérias podem fornecer parte do nitrogênio que as plantas necessitam para seu desenvolvimento. Algumas rizobactérias podem inibir ou estimular a fixação simbiótica. Fuhrmann & Wollum (1989a) isolaram 115 bactérias da rizosfera de soja e observaram que 23 delas apresentavam antagonismo *in vitro* contra uma ou mais entre cinco estirpes de *B. japonicum* testadas. Quando esses isolados foram testados em soja cultivada em meio artificial com baixa concentração de Fe, para a habilidade de afetar a competição entre três estirpes de *B. japonicum*, três deles alteraram a competição pela ocupação nodular entre essas estirpes (Fuhrmann & Wollum, 1989b). Em estudo semelhante, porém em solo não estéril, Cattelan (1998) observou que, de nove isolados de rizobactérias, um foi capaz de alterar a competição pela ocupação nodular entre cinco sorogrupos de *Bradyrhizobium* spp. testados. Esses resultados demonstram o potencial que a coinoculação de *Bradyrhizobium* spp. e certas RPCP têm, no sentido de aumentar a ocupação nodular com as estirpes de *Bradyrhizobium* spp. desejadas (mais eficientes) em soja.

Os microrganismos do solo, normalmente, têm que competir por nutrientes de baixa disponibilidade. Um mecanismo que provavelmente confere vantagem nessa competição é a produção de

sideróforos, que são substâncias capazes de complexar Fe^{3+} com grande afinidade produzidas por alguns microrganismos. Uma rizobactéria que produz sideróforos pode suprimir um organismo deletério, diminuindo a disponibilidade de Fe. É importante ressaltar que sideróforos só são produzidos quando os níveis de Fe disponível no solo são baixos (Scher & Baker, 1982; Neilands & Leong, 1986). Quando sementes de *Cicer arietinum* L. e soja foram inoculadas com uma *Pseudomonas* sp. fluorescente produtora de sideróforos, resultou em aumento na germinação das sementes e no crescimento e na produção das plantas (Kumar & Dube, 1992). A incidência de murcha em plantas de *Cicer arietinum*, em um solo suscetível a essa doença, foi reduzida em 52%.

Outra forma de controle de organismos deletérios é a produção de antibióticos. Kloepper & Schroth (1981) observaram que cinco isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescente aumentaram o crescimento de batata (*Solanum tuberosum* L.) e que isso se deveu, em parte, à produção de antibióticos na rizosfera. Em outro estudo semelhante, um isolado de *Pseudomonas* sp., proveniente da rizosfera de beterraba açucareira, inibiu uma série de fungos fitopatogênicos através da produção do antibiótico 2,4-diacetil-floroglucinol (Shanahan *et al.*, 1992). Quando metabólitos oriundos do crescimento em meio de cultura de 33 diferentes bactérias foram usados para tratar sementes de soja altamente infectadas com fungos, os metabólitos oriundos de uma das bactérias aumentou a emergência das sementes em 17% (Cattelan, 1994).

Outro mecanismo de possível envolvimento no antagonismo a patógenos é a produção de metabólicos voláteis como o ácido cianídrico (HCN) (Nehl *et al.*, 1996). Um isolado com alta produção de HCN, mutante construído a partir de *Pseudomonas putida* BK8661, resultou num pequeno, mas significativo, aumento na supressão de sintomas causados por *Septoria tritici* e *Puccinia recondita* f.sp. *tritici* em trigo sob condições axênicas. Cattelan (1998) observou que compostos voláteis produzidos por isolados

de rizobactérias foram responsáveis pela inibição *in vitro* do crescimento dos fungos fitopatogênicos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum* e *Sclerotium rolfsii*.

Enzimas produzidas por bactérias, tais como quitinase e *b*-1,3-glucanase, podem ser importantes no controle de fungos fitopatogênicos devido à sua habilidade em degradar quitina e *b*-1,3-glucan, respectivamente, componentes da parede celular dos fungos (Potgieter & Alexander, 1966; Schroth & Hancock, 1981). Fridlender *et al.* (1993) observaram que um isolado de *Pseudomonas cepacia* controlou *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* e *Pythium ultimum*, fato esse relacionado à produção de *b*-1,3-glucanase. Quando 14 isolados de bactérias rizosféricas, apresentando um ou mais dos diferentes mecanismos de controle de fungos discutidos, foram inoculados em sementes de soja cultivada em solo contendo inóculo de *Fusarium oxysporum*, um dos isolados conseguiu proteger a soja (Cattelan, 1998). Esse isolado possuía a capacidade de produzir *b*-1,3-glucanase, embora outros três isolados, com a mesma capacidade, não produziram o mesmo efeito.

Metodologia para as análises em laboratório

Vários métodos para a determinação quantitativa da maioria das características bioquímicas e fisiológicas discutidas acima podem ser encontrados na literatura. Embora esses métodos sejam, normalmente, muito precisos, geralmente requerem testes individuais dos isolados, além do emprego de instrumentos sofisticados. Quando o objetivo é fazer uma seleção inicial de bactérias com potencial para promoção do crescimento vegetal, necessita-se de métodos ágeis, que possam testar vários isolados ao mesmo tempo, além de baratos e simples, na medida do possível. Com esse intuito, elaborou-se este manual, onde são apresentados métodos simplificados, qualitativos e semi-quantitativos, para a determinação dessas características.

As condições de crescimento aqui apresentadas, especialmente no tocante à temperatura e aos meios de cultura, são adequadas a uma ampla gama de bactérias e alguns fungos provenientes do solo. No entanto, essas condições poderão variar e, portanto, deverão ser ajustadas, dependendo do tipo de microrganismo a ser estudado. Recomendam-se, pelo menos, três repetições por teste.

1. Produção de Sideróforos

Material e reagentes

- a) Incubadora (28°-30°C)
- b) Centrífuga
- c) Placas de Petri
- d) Frascos Erlenmeyer de 50 mL
- e) Balão volumétrico de 100 mL
- f) Balão volumétrico de 1000 mL
- g) Tubos de ensaio
- h) Tubos para centrifugação
- i) Meio líquido de tripticaseína de soja
- j) Cromo azurol S (CAS)
- k) Brometo hexadeciltrimetilamonio (HDTMA)
- l) Piperazina anidra
- m) Cloreto de ferro ($\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)
- n) Ácido clorídrico (HCl)

Meios e soluções

- a) Meio líquido de tripticaseína de soja ('tryptic soy') diluído 10 vezes (1/10 TSL): diluir 3 a 4 g do meio, dependendo do fabricante, em 1 L de água destilada (H_2O_d). A diluição do meio original propicia o crescimento de uma gama maior de microrganismos pois diminui a concentração dos sais em relação ao meio concentrado. Além

disso, diminui o teor de Fe, especialmente importante na determinação de sideróforos.

- b) Solução indicadora de cromo azurol S (CAS): Em um balão volumétrico de 100 mL, adicionar 6 mL da solução de HDTMA 10 mM e um pouco de H_2O . Adicionar, lentamente, sob agitação, 1,5 mL da solução férrica ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mM e HCl 0,01 N) e 7,5 mL de uma solução aquosa de cromo azurol S 2 mM. Dissolver, separadamente, 4,307 g de piperazina anidra em, aproximadamente, 20 mL de H_2O e adicionar 6,25 mL de HCl_{conc} com cuidado. Essa solução tampão ($\text{pH} = 5,6$) é, então, transferida para o balão volumétrico e o volume é completado para 100 mL com H_2O . Essa solução tem validade de alguns meses, desde que acondicionada em frascos de polietileno.
- b.1. Solução de HDTMA 10 mM: em um balão volumétrico de 1000 mL dissolver 3,645 g de HDTMA em um pouco de H_2O , agitar e completar o volume.
- b.2. Solução de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mM: em um balão volumétrico de 1000 mL, dissolver 0,270 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em um pouco de H_2O , agitar e completar o volume.
- b.3. Solução de HCl 0,01 N: em um balão volumétrico de 1000 mL, adicionar um pouco de H_2O , em seguida, adicionar 0,82 mL de HCl_{conc} (36,5% a 38%), agitar e completar o volume com H_2O .

Procedimento

Neste método, adaptado de Schwyn & Neilands (1987), é utilizado um complexo corante-ferro altamente colorido. Quando um ligante forte sequestra e complexa o Fe, o corante é liberado, o que causa mudança de cor. No

caso, o corante é o cromoazurol S (CAS) e o ligante é um ou mais sideróforos produzidos pelas bactérias.

Cultivar as bactérias em frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 10 mL de 1/10 TSL (ou outro meio líquido com baixo teor de Fe). Incubar a 28°-30°C por 24h ou mais, sob agitação constante ou periódica. Centrifugar a suspensão de células a 12.000 *g* por 10 min. Transferir 1 mL do sobrenadante para um tubo de ensaio. Adicionar 1 mL da solução de CAS.

Os isolados que convertem a cor azul da solução CAS para amarelo, dentro de 15 min, são considerados produtores de sideróforos. O tempo de transformação e a intensidade do amarelo são indicativos de maior ou menor produção de sideróforos. Dessa forma, essa técnica qualitativa pode ser transformada em quantitativa fazendo as leituras em espectrofotômetro e comparando-as com as de padrões de EDTA (seqüestrante de Fe) com concentração conhecida e utilizados da mesma forma que os sobrenadantes.

2. Produção de ácido indol acético (AIA)

Material e reagentes

- a) Incubadora (28°-30°C)
- b) Membranas de nitrocelulose de ~9 cm de diâmetro.
- c) Placas de Petri
- d) Balão volumétrico de 1000 mL
- e) L-triptofano.
- f) Ácido perclórico (HClO_4)
- g) Cloreto de ferro ($\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)
- h) Meio de tripticaseína de soja
- i) Agar bacteriológico

Meios e soluções

- a) Meio de tripticaseína de soja diluído 10 vezes, acrescido de 15 g de agar por L de H₂O_d (1/10 TSA).
- b) Solução de Salkowski: diluir 1 mL da solução de FeCl₃·6H₂O 0,5 M, em 50 mL de HClO₄ 35%.
 - b.1. Solução de FeCl₃·6H₂O 0,5 M: em um balão volumétrico de 1000 mL, dissolver 135,1 g de FeCl₃·6H₂O em um pouco de H₂O_d, agitar e completar o volume.

Procedimento

Este método colorimétrico foi adaptado de Bric *et al.* (1991). Transferir as bactérias para placas contendo 1/10 TSA enriquecido com 5 mM de L-triptofano (1,021 g por L). O triptofano é o precursor do AIA. Até 25 isolados podem ser testados por placa. Após a transferência, cobrir o meio com membrana de nitrocelulose e incubar a 28°-30°C por 24h. Remover a membrana para outra placa e saturá-la com a solução de Salkowski (Gordon & Weber, 1951) e incubar à temperatura ambiente.

Os isolados que formam halo avermelhado na membrana, no período entre 30 min e 2 h, são produtores de AIA. A membrana deve ser marcada de tal forma que se possa voltar à placa e identificar o(s) isolado(s) positivo(s).

3. Produção de citocininas e giberelinas

Este método ainda não foi totalmente comprovado neste laboratório e está aqui apenas como sugestão para teste.

Material e reagentes

- a) Incubadora (24°-30°C) com lâmpada fluorescente fraca (540 a 2000 lux)

- b) Centrífuga
- c) Sementes de rabanete (*Raphanus sativus* L.)
- d) Peneira de 1,7 mm de abertura (10 mesh)
- e) Papel filtro (Whatman N° 1) em folhas e em círculos de 9 cm de diâmetro
- f) Filtros bacteriológicos (0,2 mm)
- g) Placas de Petri
- h) Pinça
- i) Balão volumétrico de 1000 mL
- j) Tubos de centrifugação
- k) Meio de tripticaseína de soja agar
- l) Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4)

Meios e soluções

- a) Obtenção do sobrenadante: cultivar os isolados em 1/10 TSA a 28°-30°C, por 24h. Com o auxílio de uma alça de platina, transferir e suspender as células em 5mL da solução tampão fosfato (por repetição). A quantidade de células deve ser suficiente para tornar o meio turvo. Centrifugar a 12.000 *g* por 10 min. Separar o sobrenadante das células através de filtração em filtro bacteriológico. Caso não haja disponibilidade de ultracentrífuga, fazer apenas a filtração.
- b) Solução tampão fosfato (KH_2PO_4 2 mM): em um balão volumétrico de 1000 mL, dissolver 0,272 g de KH_2PO_4 em um pouco de H_2O , agitar e completar o volume. Ajustar o pH para 5,8-6,0.

Procedimento

Esse método foi adaptado do bioensaio do cotilédono de rabanete para determinação de citocininas descrito por Letham (1971). O método permite a detecção de citocininas e de giberelinas ao mesmo tempo.

Passar as sementes de rabanete em peneira de 1,7 mm de abertura para homogeneizar o tamanho (e consequentemente, o peso). Germinar as sementes sobre folhas de papel filtro umedecidas, em placas de Petri. Incubar no escuro, a 25°-26°C. Após 35 h, destacar o cotilédone menor (descartar o maior). Separar os hipocótilos dos cotilédones. Colocar de 8 a 10 cotilédones de tamanho uniforme em placas de Petri com papel filtro umedecido com 3 mL de sobrenadante de cada isolado. Os cotilédones são colocados com a superfície superior em contato com o papel. Os hipocótilos, uniformizados para 3 mm de comprimento, são colocados logo abaixo dos cotilédones. Incubar a 24°C sob luz fluorescente fraca contínua. Após três dias, secar os cotilédones com papel absorvente ('blotted dry') e pesá-los. Comparar os pesos dos cotilédones e o comprimento dos hipocótilos com aqueles do controle (apenas com a solução tampão). O sobrenadante de isolados produtores de citocininas aumentam o peso dos cotilédones mas não o crescimento dos hipocótilos. Aqueles de isolados produtores de giberelinas aumentam tanto o peso dos cotilédones (não tanto quanto os produtores de citocininas) quanto o comprimento dos hipocótilos.

4. Fixação assimbiótica de N_2

Material e reagentes

- a) Incubadora (28°-30°C)
- b) Placas de Petri
- c) Tubos de cultura
- d) Filtros bacteriológicos (0,2 mm)
- e) Sacarose
- f) Manitol
- g) Lactato de sódio (60%, p/p)

- h) Fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4)
- i) Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4)
- j) Sulfato de magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)
- k) Cloreto de cálcio ($CaCl_2$)
- l) Cloreto de sódio (NaCl)
- m) Molibdato de sódio ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)
- n) Sulfato de zinco ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)
- o) Sulfato de cobre ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)
- p) Sulfato de cobalto ($CoSO_4 \cdot 7H_2O$)
- q) Sulfato de manganês ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$)
- r) Etilenodiaminotetracético sódico-férrico ($Na_2FeEDTA$)
- s) Ácido bórico (H_3BO_3)
- t) Biotina
- u) Ácido *p*-aminobenzóico
- v) Agar bacteriológico

Meios e soluções

- a) Meio semi-sólido livre de nitrogênio (MLN). Composição:
 - ♦ fontes de C ($g\ L^{-1}$): sacarose, 5,0; manitol, 5,0; lactato de sódio (60%, p/p), 0,5 mL;
 - ♦ tampão ($g\ L^{-1}$): K_2HPO_4 , 0,80 e KH_2PO_4 , 0,20;
 - ♦ macronutrientes ($g\ L^{-1}$): $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,20; $CaCl_2$, 0,06; NaCl, 0,10;
 - ♦ micronutrientes ($mg\ L^{-1}$): $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 2,00; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,24; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,04; $CoSO_4 \cdot 7H_2O$, 10,00; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 3,00; $Na_2FeEDTA$, 28,00; H_3BO_3 , 5,00;
 - ♦ fatores de crescimento: biotina, 5,00 $mg\ L^{-1}$; ácido *p*-aminobenzóico, 10,00 $mg\ L^{-1}$;
 - ♦ agar, 1,75 $g\ L^{-1}$.

Obs.: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e CaCl_2 devem ser autoclavados separadamente. Biotina e ácido *p*-aminobenzóico devem ser esterilizados por filtração em filtro bacteriológico e adicionados ao meio já autoclavado.

Procedimento

A seleção inicial de bactérias diazotróficas (aquelas que fixam nitrogênio atmosférico assimbioticamente) pode ser feita em meio livre de nitrogênio. O meio descrito foi adaptado de Rennie (1981) para possibilitar o crescimento de organismos com exigências nutricionais variadas. O extrato de levedura, presente em muitos meios, não foi incluído pois apresenta teor de N suficiente para muitos microrganismos não fixadores crescerem. Ele foi substituído pelos fatores de crescimento biotina e ácido *p*-aminobenzóico. A consistência semi-sólida do meio possibilita um ambiente microaeróbio, favorável tanto ao crescimento das células quanto à atividade da nitrogênase (Day & Döbereiner, 1976).

Cada isolado deve ser transferido para um tubo contendo 5 mL de MLN e incubado a 28°-30°C, por até 10 dias. Os isolados que crescerem devem ser transferidos pelo menos mais três vezes para o mesmo meio para garantir que o crescimento não está ocorrendo às custas de reservas de N das células e, também, para constatar a estabilidade dessa característica.

Para confirmar que os isolados que cresceram nessas condições realmente fixam N, já que alguns organismos não fixadores crescem na presença de traços de N, eles devem ser submetidos ao teste de redução do acetileno (Dart *et al.*, 1972). Informações mais detalhadas podem ser obtidas em Embrapa Agrobiologia (1995).

5. Produção de quitinase

Material e reagentes

- a) Incubadora (28°-30°C)
- b) Estufa (50°C)
- c) Geladeira (4°C)
- d) Moinho de bolas
- e) Liquidificador
- f) Centrífuga
- g) Placas de Petri
- h) Balão volumétrico de 1000 mL
- i) Peneiras de 0,150 mm (100 mesh) e 0,075 mm (200 mesh)
- j) Quitina
- k) Reagentes necessários para o MLN (menos as fontes de C)
- l) Hidróxido de sódio (NaOH)
- m) Ácido fosfórico (H_3PO_4)

Meios e soluções

- a) Quitina coloidal: Como a quitina pura é muito mais cara do que a quitina não purificada, aconselha-se a obtenção dessa, fazendo a purificação no próprio laboratório. Com esse método de purificação, descrito por Reid & Ogrydziak (1981), obtém-se quitina coloidal. Pulverizar 25 g de quitina em moinho de bolas e utilizar a fração que ficar retida entre as peneiras de 0,150 e 0,075 mm. Suspender essa fração em 250 mL de H_3PO_4 85% e armazenar em refrigerador (4°C) por 24 h. Diluir a suspensão com 2 L de H_2O e homogeneizar em liquidificador. Lavar a quitina seguidas vezes com H_2O até que o pH atinja 5,0 a 5,5. Adicionar então a solução de NaOH 1N até elevar o pH para 7,0. Centrifugar a mistura a 8.000 g por 10 min e suspender em 1L de H_2O . Centrifugar

novamente. A quitina peletizada é então armazenada em refrigerador até sua utilização. O pelet contém, geralmente, de 7% a 10% de quitina coloidal. A concentração correta deve ser determinada através de secagem de uma amostra em estufa, a 50°C, até peso constante.

Solução de NaOH 1N: em um balão volumétrico de 1000 mL, adicionar ~500 mL de H₂O, em seguida, adicionar 40 g de NaOH, agitar e completar o volume.

Procedimento

Este método baseia-se no fato de que a adição de quitina torna o meio turvo. Os organismos que são capazes de degradar a quitina produzem um halo claro ao redor de suas colônias.

Adicionar 8 g de quitina coloidal (base seca; Renwick *et al.*, 1991), como única fonte de C, por litro de MLN, complementado com 0,78 g de NH₄NO₃ e 15 g de agar (no lugar de 1,75 g). Transferir até 25 isolados por placa com esse meio e incubar a 28°-30°C, por até 10 dias. Os isolados que formam halo claro são considerados produtores de quitinase e são chamados quitinolíticos.

6. Produção de *b*-1,3-glucanase

Material e reagentes

- a) Incubadora (28°-30°C)
- b) Placas de Petri
- c) Balão volumétrico de 1000 mL
- d) *b*-1,3-glucano (laminarina)
- e) Vermelho Congo
- f) Reagentes necessários para o MLN (menos as fontes de C)

Meios e soluções

Solução de vermelho Congo: em um balão volumétrico de 1000 mL, diluir 0,6 g de vermelho Congo em um pouco de H₂O_d, agitar e completar o volume.

Procedimento

Este método, adaptado de Renwick *et al.* (1991), baseia-se na detecção da hidrólise do *b*-1,3-glucano através da reação colorimétrica com o corante vermelho Congo.

Adicionar 5 g de *b*-1,3-glucano, como única fonte de C, por litro de MLN complementado com 0,78 g de NH₄NO₃ e 15 g de agar. Transferir até 25 isolados por placa com esse meio e incubar a 28°-30°C, por três dias. Adicionar solução de vermelho Congo até cobrir o meio completamente. Deixar à temperatura ambiente por 90 min e, após, drenar o excesso do corante. A formação de zona amarelo-alaranjada ao redor das colônias indica a hidrólise do *b*-1,3-glucano e, portanto, que as colônias são produtoras de *b*-1,3-glucanase.

7. Produção de 1-aminociclopropano-1-carboxylato deaminase

Material e reagentes

- a) Incubadora (28°-30°C)
- b) Placas de Petri
- c) 1-aminociclopropano-1-carboxylato (ACC)
- d) Reagentes necessários para o MLN
- e) Agar bacteriológico

Procedimento

Este método, adaptado de Glick *et al.* (1995), baseia-se no fato de que alguns isolados conseguem crescer

com ACC como única fonte de N no meio, pelo fato de possuírem a enzima ACC deaminase.

Esterilizar por filtração, em filtro bacteriológico, uma solução aquosa de ACC (aproximadamente 10%) e adicionar o equivalente a 5 g, como única fonte de N, em 1 litro de MLN complementado com 15 g de agar, previamente autoclavado. Preparar o mesmo meio sem ACC e nenhuma outra fonte de N. Transferir até 25 isolados por placa, para cada um dos dois meios, e incubar a 28°-30°C, por dois dias. Transferir os isolados que cresceram no meio com ACC para nova placa e incubar novamente.

Os isolados que crescerem bem na segunda transferência no meio com ACC, mas que não tenham crescido bem no meio sem ACC, são capazes de utilizar ACC como fonte de N e, portanto, são produtores de ACC deaminase.

8. Produção de ácido cianídrico

Material e reagentes

- a) Incubadora (26°C)
- b) Placas de Petri
- c) Balão volumétrico de 100 mL
- d) Papel de filtro, 9 cm de diâmetro
- e) Parafilme
- f) Meio de tripticaseína de soja agar
- g) Glicina
- h) Cloreto de ferro ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
- i) Ácido pícrico ($\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_7$)
- j) Carbonato de sódio (Na_2CO_3)

Meios e soluções

- a) Solução de ácido pícrico a 5% e NaCO_3 a 2%: em um balão volumétrico de 100 mL, adicionar ~50 mL de H_2O . Adicionar um volume da suspensão de ácido pícrico equivalente a 5 g do composto seguido da adição de 2 g de NaCO_3 . Agitar e completar o volume com H_2O .

Obs.: Ácido pícrico é altamente explosivo, especialmente quando seco. Geralmente é comercializado em suspensão aquosa ou etílica. Nunca deixar a quantidade de água ser menor que 30%.

Procedimento

Este método colorimétrico foi adaptado de Bakker & Schippers (1987). Transferir um isolado por placa contendo 1/10 TSA suplementado com 4,4 g de glicina L^{-1} e 0,3 mM de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,081 g L^{-1}) (Castric, 1975). Tanto a glicina quanto o Fe estimulam a produção de HCN. Inverter a placa e colocar papel de filtro impregnado com a solução de ácido pícrico a 5% (amarelo) e NaCO_3 a 2% na tampa da placa. Selar a placa com parafilme e incubar a 26°C por 48 h. A mudança da coloração do papel de filtro de amarelo para marrom-alaranjado indica produção de HCN. Como essa descoloração também pode ocorrer devido à reação com compostos outros que não o HCN, como ácido sulfídrico e aldeídos, recomenda-se submeter os isolados positivos a testes mais específicos como o teste do azul-da-Prússia (Lorck, 1948) ou o teste isonicotínico ácido-barbitúrico (Nagashima & Ozawa, 1981).

9. Solubilização de Fosfatos

Material e reagentes

- a) Incubadora (28°-30°C)

- b) Placas de Petri
- c) Balão volumétrico de 1000 mL
- d) Meio de tripticaseína de soja agar
- e) Fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4)
- f) Cloreto de cálcio ($CaCl_2$)
- g) Hidróxido de sódio (NaOH)

Meios e soluções

- a) Solução de K_2HPO_4 0,57 M: em um balão volumétrico de 1000 mL, adicionar um pouco de H_2O_d , em seguida, adicionar 100 g de K_2HPO_4 , agitar e completar o volume.
- b) Solução de $CaCl_2$ 0,90 M: em um balão volumétrico de 1000 mL, adicionar um pouco de H_2O_d , em seguida, adicionar 100 g de $CaCl_2$, agitar e completar o volume.
- c) Solução de NaOH 1 N: em um balão volumétrico de 1000 mL, adicionar ~500 mL de H_2O_d , em seguida, adicionar 40 g de NaOH, agitar e completar o volume.

Procedimento

Este método, adaptado de Katznelson & Bose (1959), baseia-se no fato de que a adição de fosfato insolúvel torna o meio turvo. Os organismos capazes de solubilizar esse fosfato produzem halo claro ao redor de suas colônias.

Utilizar o meio 1/10 TSA acrescido de $CaHPO_4$. O precipitado fino de $CaHPO_4$ resulta da reação de 50 mL da solução de K_2HPO_4 0,57 M e de 100 mL da solução de $CaCl_2$ 0,90 M adicionados a 850 mL de 1/10 TSA. As soluções e o meio devem ser autoclavados separadamente. Ajustar o pH do meio para 7,0 com NaOH 1 N, estéril. Transferir até 25 isolados por placa e incubar a 28°-30°C, por sete dias. As colônias que formam halo claro ao seu redor são consideradas solubilizadoras de fosfatos.

10. Produção de pectinase

Material e reagentes

- a) Incubadora (28°-30°C)
- b) Placas de Petri
- c) Balão volumétrico de 1000 mL
- d) Bucha de algodão
- e) Sacarose
- f) Fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4)
- g) Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4)
- h) Cloreto de sódio (NaCl)
- i) Cloreto de amônio (NH_4Cl)
- j) Cloreto de cálcio (CaCl_2)
- k) Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- l) Extrato de levedura
- m) Pectina
- n) Ácido clorídrico (HCl)

Meios e soluções

- a) meio M9: Composição(g L^{-1}): sacarose, 2,0; Na_2HPO_4 , 6,0; KH_2PO_4 , 3,0; NaCl , 0,5; NH_4Cl , 1,0 e agar, 15. Adicionar 10 mL da solução de CaCl_2 0,01 M e 1 mL da solução de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 M, autoclavadas separadamente.
- b) Solução de CaCl_2 0,01 M: em um balão volumétrico de 1000 mL, adicionar um pouco de H_2O , em seguida, adicionar 1,11 g de CaCl_2 , agitar e completar o volume.
- c) Solução de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 M: em um balão volumétrico de 1000 mL, adicionar um pouco de H_2O , em seguida, adicionar 246,4 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, agitar e completar o volume.
- d) Solução de HCl 2 N: em balão volumétrico de 1000 mL, adicionar um pouco de H_2O , em seguida, adicionar 164

mL de HCl_{conc} (36,5% a 38%), agitar e completar o volume com H_2O .

Procedimento

Transferir até 25 isolados por placas contendo o meio M9 (Miller, 1974) complementado com 1,2 g de extrato de levedura e 4 g de pectina por litro. Após dois dias de incubação a 28°-30°C, retirar as colônias com uma bucha de algodão e adicionar a solução de HCl 2 N até cobrir completamente o meio (modificado de Andro *et al.*, 1984 pelo Dr. T. Denny, Universidade da Georgia, Athens, EUA, comunicação pessoal). Colônias que formam halo claro após a reação ácida são consideradas produtoras de pectinase(s). Como este método é destrutivo, recomenda-se fazer a transferência simultânea para duas placas ('replica plate'); onde uma delas não recebe o tratamento ácido, servindo assim para recuperar os isolados positivos.

11. Produção de celulase

Material e reagentes

- a) Incubadora (28°-30°C)
- b) Placas de Petri
- c) Celulose
- d) Meio de tripticaseína de soja agar

Procedimento

Transferir até 25 isolados por placa contendo 1/10 TSA complementado com 10 g de celulose em pó L^{-1} (Samanta *et al.*, 1989). A celulose produz turbidez no meio. Colônias que formam halo claro em torno de si após oito dias de incubação a 28°-30°C são consideradas solubilizadoras de celulose ou produtoras de celulase(s).

12. Antagonismo direto a fungos

Material e reagentes

- a) Incubadora (28°-30°C)
- b) Placas de Petri
- c) Meio líquido de tripticaseína de soja
- d) Batata (*Solanum tuberosum* L.)
- e) Dextrose (glicose)
- f) Agar

Meios e soluções

Meio batata-dextrose-agar (BDA): fazer infusão de 200 g de batata fatiada em 1 L de H₂O_d (cozinhar pelo tempo necessário para que as batatas amoleçam). Peneirar ou filtrar para reter as fatias de batata. Ao filtrado, adicionar 20 g de dextrose e 15 g de agar. O pH deve estar ao redor de 5,6.

Procedimento

Aconselha-se a utilização do método do círculo (Da Luz, 1990) por ter boa reprodutibilidade e, também, por ser semiquantitativo. Isolados crescidos em um meio líquido, como 1/10 TSL, são semeados em placas na forma de um círculo com 5,0 cm de diâmetro utilizando uma alça especial, ou com a boca de um tubo com abertura desse diâmetro. As placas são preparadas com BDA (Shadwick, 1938). Após o crescimento das bactérias incubadas a 28°-30°C, adicionar um disco de cultura com 7 mm de diâmetro com crescimento ativo do fungo. Placas contendo apenas o fungo são usadas como controle. As placas são incubadas à temperatura ideal para o crescimento de cada fungo. Quando o fungo atingir o crescimento máximo na placa controle, proceder à leitura do crescimento radial do micélio em todas as placas. Dependendo do objetivo e dos organismos tes-

tados, pode-se substituir o BDA por 1/10 TSA. Como o BDA é mais propício ao crescimento dos fungos e o 1/10 TSA, ao das bactérias, normalmente observa-se maior antagonismo neste.

Caso seja necessário evitar a produção de sideróforos, adicionar 0,027 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ por litro de meio (a concentração final do $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ será de 0,1 mM) (Scher & Baker, 1982; Fuhrmann & Wollum, 1989a).

13. Antagonismo indireto a fungos (compostos volatéis)

Material e reagentes

- a) Incubadora (28°-30°C)
- b) Placas de Petri
- c) Placas bicompartimentalizadas
- d) Reagentes para meio BDA

Procedimento

Este teste é semelhante ao anterior. A principal diferença é que são usadas placas com uma divisão (septo) central. Dessa forma, não há contato direto entre os organismos em estudo. Caso ocorra inibição do crescimento dos fungos, será devido à produção de compostos volatéis pelas bactérias. Num dos compartimentos, semeia-se a bactéria de forma a produzir uma camada de células em toda a superfície do meio (Gagné *et al.*, 1991). Após o crescimento das bactérias a 28°-30°C, o fungo é inoculado no outro compartimento da placa, através de um disco de cultura com 7 mm de diâmetro e crescimento ativo do fungo. Placas contendo apenas o fungo são usadas como controle. Incubar as placas à temperatura ideal para o crescimento de cada fungo. Quando o fungo apresentar cresci-

mento máximo na placa controle, proceder à leitura do crescimento radial do micélio em todas as placas.

14. Antagonismo entre bactérias

Material e reagentes

- a) Incubadora (28°-30°C)
- b) Espectrofotômetro
- c) Placas de Petri
- d) Meio de tripticaseína de soja agar

Procedimento

Placas de Petri, contendo 1/10 TSA, são inoculadas em metade da área com uma camada de células da bactéria candidata a antagonista. A(s) bactéria(s) a ser(em) antagonizada(s) é(são) riscada(s) em linhas perpendiculares à camada de células a partir de um espaço de 2mm. A bactéria a ser antagonizada é inoculada a partir de uma suspensão de células diluídas (absorbância de 0,03 a um comprimento de onda de 600 nm). Para que não haja contato entre as bactérias no momento da repicagem, traçar uma linha divisória, como guia, exatamente no centro da placa. Semear a bactéria antagonista em toda a superfície de uma das metades, até a linha traçada. A bactéria a ser antagonizada é então semeada a 2 mm dessa linha. Incubar as placas a 28°-30°C. No caso de se testar o antagonismo a mais de uma bactéria por placa, a distribuição dessas deve ser casualizada entre repetições para se confundir a interação entre elas. Placas sem a bactéria antagonista são usadas como controle. Após o crescimento das bactérias na placa controle, medir a inibição linear sobre cada bactéria (faixa de não crescimento).

Agradecimentos

Esse trabalho foi parcialmente financiado pelo Programa de Modernização Agropecuária (PROMOAGRO), programa conjunto da Embrapa com o Banco Interamericano de Desenvolvimento (BID). O autor agradece o apoio técnico de Leny M. Miura, Anízia F. F. Betti e Émerson Santos Cioffi.

Referências Bibliográficas

- ANDRO, T.; CHAMBOST, J.P.; KOTOUJANSKY, A.; CATTANEO, J.; BERTHEAU, Y.; BARRAS, F.; GIJSEGEM, F. Van; COLENO, A. Mutants of *Erwinia chrysanthemi* defective in secretion of pectinase and cellulase. *Journal of Bacteriology*, Washington, v.160, p.1199-1203, 1984.
- BAKKER, A.W.; SCHIPPERS, B. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp-mediated plant growth-stimulation. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.19, p.451-457, 1987.
- BRIC, J.M.; BOSTOCK, R.M.; SILVERSTONE, S.E. Rapid *in situ* assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.57, p.535-538, 1991.
- CASTRIC, P.A. Hydrogen cyanide, a secondary metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.21, p.613-618, 1975.
- CATTELAN, A.J. Aumento no desenvolvimento de plantas de soja, através da inoculação com bactérias promotoras do crescimento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 24., 1993, Goiânia. *Cerrados: fronteira agrícola no século XXI - resumos...* Goiânia: SBCS, 1993. p.341-342.

- CATTELAN, A.J. Antagonismo de *Pseudomonas* do grupo fluorescente a fungos fitopatogênicos de solo e de sementes de soja. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v.18, p.37-42, 1994.
- CATTELAN, A.J. Desenvolvimento e absorção de nutrientes em plantas de soja inoculadas com bactérias promotoras do crescimento, em casa-de-vegetação. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 3.; REUNIÃO DE LABORATÓRIOS PARA RECOMENDAÇÃO DE ESTIRPES DE *RHIZOBIUM* E *BRADYRHIZOBIUM*, 6., 1994, Londrina. *Microbiologia do Solo: desafios para o século XXI - anais*. Londrina: IAPAR/EMBRAPA-CNPSO, 1995a. p.387-392.
- CATTELAN, A.J. Aumento no número de pêlos radiculares em plântulas de soja inoculadas com bactérias promotoras do crescimento. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 3.; REUNIÃO DE LABORATÓRIOS PARA RECOMENDAÇÃO DE ESTIRPES DE *RHIZOBIUM* E *BRADYRHIZOBIUM*, 6., 1994, Londrina. *Microbiologia do Solo: desafios para o século XXI - anais*. Londrina: IAPAR / EMBRAPA-CNPSO, 1995b. p.393-397.
- CATTELAN, A.J. Screening and characterization of soil and rhizosphere bacteria for traits that promote early soybean growth. Georgia: Universtiy of Georgia, 1988. 82p. Tese Doutorado.
- Da LUZ, W.C. Microbiological control of *Bipolaris sorokiniana* *in vitro*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.15, p.246-247, 1990.
- DART, P.J.; DAY, J.M.; HARRIS, D. Assay of nitrogenase activity by acetylene reduction. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (Vienna). *Use of isotopes for study of fertilizer utilization by legume crops*. Vienna, 1972. p. 85-100. (IAEA. Technical Report, 149).
- DAY, J.M.; DÖBEREINER, J. Physiological aspects of N₂-fixation by a *Spirillum* from *Digitaria* roots. *Soil and Biology Biochemistry*, Oxford, v.8, p.45-50, 1976.

- EMBRAPA AGROBIOLOGIA (Rio de Janeiro, RJ). *Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas*. Itaguaí, 1995. 60p.
- ESASHI, Y. Ethylene and seed germination. In: MATOO, A.K.; SUTTLE, J.C. (ed.) *The plant hormone ethylene*. Boca Raton: CRC Press, 1991. p.133-157.
- FRIDLENDER, M.; INBAR, J.; CHET, I. Biological control of soilborne plant pathogens by a *b*-1,3-glucanase-producing *Pseudomonas cepacia*. *Soil and Biology Biochemistry*, Oxford, v.25, p.1211-1221, 1993.
- FUHRMANN, J.; WOLLUM, A.G. II. *In vitro* growth responses of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean rhizosphere bacteria. *Soil and Biology Biochemistry*, Oxford, v.21, p.131-135, 1989a.
- FUHRMANN, J.; WOLLUM, A.G. II. Nodulation competition among *Bradyrhizobium japonicum* strains as influenced by rhizosphere bacteria and iron availability. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, v.7, p.108-112, 1989b.
- GAGNÉ, S.; Le QUÉRE, D.; ALIPHAT, S.; LEMAY, R.; FOURNIER, N. Inhibition of plant pathogenic fungi by volatile compounds produced by some PGPR strains. (Abstr.) *Canadian Journal of Plant Pathology*, Ottawa, v.13, p.277, 1991.
- GLICK, B.R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.41, p.109-117, 1995.
- GLICK, B.R.; KARATUROVÍČ, D.M.; NEWELL, P.C. A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting pseudomonads. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.41, p.533-536, 1995.
- GORDON, S.A.; WEBER, R.P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology*, Bethesda, v.26, p.192-195, 1951.
- HADAS, R.; OKON, Y. Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation of root morphology and respiration in tomato seedlings. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, v.5, p.241-247, 1987.

- JACKSON, M.B. Ethylene in root growth and development. In: MATOO, A.K.; SUTTLE, J.C. (ed.) *The plant hormone ethylene*. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 159-181.
- JIANG, H-Y; SATO, K. Interrelationships between bacterial populations on the root surface of wheat and growth of plant. *Soil Science and Plant Nutrition*, Tokyo, v.40, p.683-689, 1994.
- KATZNELSON, H.; BOSE, B. Metabolic activity and phosphate-dissolving capability of bacterial isolates from wheat roots, rhizosphere, and non-rhizosphere soil. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.5, p.79-85, 1959.
- KLOEPPER, J.W.; SCHROTH, M.N. Relationship of *in vitro* antibiosis of plant growth- promoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. *Phytopathology*, St. Paul, v.71, p.1020-1024, 1981.
- KUMAR, B.S.D.; DUBE, H.C. Seed bacterization with a fluorescent pseudomonas for enhanced plant growth, yield and disease control. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.24, p.539-542, 1992.
- LETHAM, D.S. Regulators of cell division in plant tissues - XII. A cytokinin bioassay using excised radish cotyledons. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.25, p.391-396, 1971.
- LORCK, H. Production of hydrocyanic acid by bacteria. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.1, p.142-146, 1948.
- MILLER, J.H. *Experiments in molecular genetics*. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Lab., 1974. 468p.
- MULDER, E.G.; LIE, T.A.; WOLDENDORP, J.W. Biology and soil fertility. In: Unesco (Roma, Italia) *Soil biology, reviews of research*. Belgium, 1969. p.163-208.
- NAGASHIMA, S.; OZAWA, T. Spectrophotometric determination of cyanide with isonicotinic acid and barbituric acid. *International Journal of Environmental and Analytical Chemistry*, London, v.10, p.99-106, 1981.

- NEHL, D.B.; ALLEN, S.J.; BROWN, J.F. 1996. Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. *Applied Soil Ecology*, Amsterdam, v.5, p.1-20, 1996.
- NEILANDS, J.B.; LEONG, S.A. Siderophores in relation to plant growth and disease. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, v.37, p.187-208, 1986.
- POTGIETER, H.; ALEXANDER, M. Susceptibility and resistance of several fungi to microbial lysis. *Journal of Bacteriology*, Washington, v.91, p.1526-1532, 1966.
- REID, J.D.; OGRYDZIAK, D.M. Chitinase-overproducing mutant of *Serratia marcescens*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.41, p.664-669, 1981.
- RENNIE, R.J. A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.27, p.8-14, 1981.
- RENWICK, A.; CAMPBELL, R.; COE, S. Assessment of *in vivo* screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. *Plant Pathology*, London, v.40, p.524- 532, 1991.
- SAMANTA, R.; PAL, D.; SEM, S.P. 1989. Production of hydrolases by N₂-fixing microorganisms. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, Fena, v.185, p.75-81, 1989.
- SCHER, F.M.; BAKER, R. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. *Phytopathology*, St.Paul, v.72, p.1567-1573, 1982.
- SCHROTH, M.N.; HANCOCK, J.G. Selected topics in biological control. *Annual Review of Microbiology*, Palo Alto, v.35, p.453-476, 1981.
- SCHWYN, B.; NEILANDS, J.B. Universal assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, New York, v.160, p.47-56, 1987.

SHADWICK. *Food Research*, Champaign, v.3, p.287, 1938.

SHANAHAN, P.; O'SULLIVAN, D.J.; SIMPSON, P.; GLENNON, J.D.; O'GARA, F. Isolation of 2,4-Diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.58, p.353-358, 1992.

TIEN, T.M.; GASKINS, M.H.; HUBBELL, D.H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.37, p.1016-1024, 1979.

WHITELAW, M.A.; HARDEN, T.J.; BENDER, G.L. Plant growth promotion of wheat inoculated with *Penicillium radicum* sp. nov. *Australian Journal of Soil Research*, Collingwood, v.35, p.291-300, 1997.