

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE AGRONOMIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**  
**CIÊNCIA DO SOLO**

**DISSERTAÇÃO**

**“Quorum Sensing” e Biofilme como Estratégias  
para a Seleção de Pseudomonas sp. Promotoras  
de Crescimento**

**Rachel Pinton**

**2007**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE AGRONOMIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
CIÊNCIA DO SOLO**

**“QUORUM SENSING” E BIOFILME COMO ESTRATÉGIAS PARA A  
SELEÇÃO DE *PSEUDOMONAS SP.* PROMOTORAS DE  
CRESCIMENTO**

**RACHEL PINTON**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Gustavo Ribeiro Xavier**

*e Co-orientação da Pesquisadora*  
**Norma Gouvêa Rumjanek**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo

Seropédica, RJ  
Março de 2007

571.82  
P659q  
T

Pinton, Rachel, 1972-  
“Quorum sensing” e biofilme como estratégias  
para a seleção de pseudomonas sp. promotoras de  
crescimento / Rachel Pinton. – 2007.  
55 f. : il.

Orientador: Gustavo Ribeiro Xavier.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia.

Bibliografia: f. 35-39.

1. Crescimento (Plantas) – Microbiologia –  
Teses. 2. Pseudomonas - Seleção – Teses. 3.  
Bactérias gram-negativas – Teses. I. Xavier,  
Gustavo Ribeiro, 1973- II. Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Agronomia.  
III. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta Dissertação, desde que seja citada a fonte.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE AGRONOMIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – CIÊNCIA DO SOLO**

**RACHEL PINTON**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Ciência do Solo.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 30/03/2007

---

Gustavo Ribeiro Xavier. Dr. Embrapa Agrobiologia  
(Orientador)

---

Enderson Petrônio de Brito Ferreira. Dr. Embrapa Arroz e Feijão

---

Sonia Regina de Souza. Dr. UFRRJ

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, irmãos, sobrinhos, gatos e cachorros, enfim, à minha família, por todo carinho e apoio emocional sempre que precisei.

Aos meus colegas, em especial, a Anelise, por sua enorme ajuda em todos os momentos, sem a qual não teria sido possível a conclusão deste trabalho; à Terezinha, pelas várias vezes em que ficamos trabalhando após o expediente e ao Luc pela ajuda nos ensaios com o sistema repórter.

Aos funcionários da Embrapa Agrobiologia: João Luiz e Mazinho, pelo apoio no laboratório e Claudinho e Nando, pela ajuda nos trabalhos em casa de vegetação.

Aos meus orientadores, Gustavo e Norma, por compartilharem seus conhecimentos e experiência e pelo apoio e compreensão.

À professora Lúcia Helena Anjos, pela dedicação, pelos conselhos e pela disponibilidade em qualquer situação.

À Luciene e Roberto, da Secretaria do Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo, pela competência, atenção e boa vontade em solucionar todos os problemas.

A UFRRJ, à Embrapa Agrobiologia e ao CNPq, pelo suporte técnico, científico e financeiro.

## RESUMO

PINTON, Rachel. “**Quorum sensing**” e **biofilme** como **estratégias para a seleção de *Pseudomonas sp.* promotoras de crescimento**. 2007. 47f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

Devido à necessidade de se desenvolver metodologias de manejo de sistemas agrícolas que venham a gerar menor impacto negativo ao ambiente, a pesquisa vem buscando utilizar componentes biológicos dos agroecossistemas para a obtenção de maior produtividade e sustentabilidade. Neste sentido, desenvolveu-se o presente trabalho, que objetivou prospectar rizobactérias com possibilidade de promover crescimento em plantas, bem como parâmetros para sua seleção. Foram obtidos 127 isolados do rizoplane de plantas de alface, couve, rúcula e salsa, cultivados em meio King B modificado para *Pseudomonas* e foi realizada sua caracterização morfológica. Foram realizados ensaios para verificar a produção de AHL (acil homoserina lactona), auto-indutor presente em sistemas de “quorum sensing” de bactérias gram-negativas, com *Agrobacterium tumefaciens* repórter. De 112 isolados testados, 14 (12,5%) foram positivos para produção de AHL. De 91 isolados avaliados, 87 (95,5%) foram capazes de formar biofilme. Para verificar capacidade das rizobactérias em promover crescimento de plantas foram conduzidos três experimentos com plantas de couve. No experimento I foram testados: 2 isolados, 5 doses de inoculo e quatro formas de inoculação. A coleta ocorreu aos 30 dias após a montagem do experimento e foram avaliados os seguintes parâmetros: massa fresca da parte aérea; massa seca da parte aérea e massa seca das raízes. Não houve diferença entre os isolados, entretanto houve diferença na forma de inoculação, sendo a inoculação nas plântulas mais eficiente do que nas sementes. No experimento II foram utilizados 7 isolados, 2 concentrações de inoculo e 1 época de inoculação (aos 10 dias após o plantio). As parcelas constituíram-se de vasos plásticos com 1 kg de substrato (horizonte A de Planossolo), assim como no experimento I. A coleta foi realizada aos 55 dias após o plantio e os parâmetros avaliados foram: massa fresca da parte aérea, massa seca da parte aérea e massa seca das raízes. A estirpe R142 promoveu 40% de aumento na massa seca da parte aérea e 55% de aumento na massa seca das raízes. No experimento III, foram utilizados os mesmos 7 isolados do II, 2 concentrações de inoculo e 2 épocas de inoculação. As parcelas foram estabelecidas em bandejas de isopor e o substrato PLANTMAX (EUCATEX). A coleta foi aos 24 dias após o plantio e não houve diferença entre as bactérias, entretanto houve entre doses e época, sendo a dose 10 9 melhor do que 10 7, e a inoculação aos 6 dias após o plantio foi melhor do que aos 12 dias após o plantio. Com os resultados obtidos, pode-se concluir que o isolado R142 foi eficiente em promover crescimento em couve, a dose de inoculo mais apropriada foi 10 9 e a inoculação deve ser realizada nas plântulas.

**Palavras - chave:** Rizobactérias. AHL. RPCPs. Promoção de crescimento. Couve.

## ABSTRACT

PINTON, Rachel. “**Quorum sensing**” and **biofilm** as strategies for selecting growth promoters *Pseudomonas sp.* 2007. 47p. Dissertation (Master Science in Agronomy, Soil Science) Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

Due to the need of developing agricultural management practices that could bring lower environmental negative impacts, researches have been investigating biological components of agro ecosystems in order to reach higher productivity and sustainability. Therefore, the present study was conducted with the purpose of prospecting plant growth promotion rhizobacteria and parameters for their selection. There were isolated 127 strains of rhizobacteria from rhizoplane of lettuce, kale, arugula and parsley. The plants were cultivated in King B media, modified for *Pseudomonas*, and its morphological characterization was made. There were set assays to detect ALH (acyl homoserine lactone) production, an auto inducer present in “quorum sensing” systems of gram-negative bacteria, with *Agrobacterium tumefaciens*. Among the 112 strains evaluated, 14 (12.5%) resulted positive for AHL production. From the 91 strains evaluated for biofilm formation, 87 (95.5%) showed positive. Three experiments were conducted using kale to verify the rhizobacteria capacity in promoting plant growth. In the first experiment, there were tested: 2 isolated strains, 5 inoculate doses, and 4 inoculation methods. After 30 days, the material was collected and the following parameters were evaluated: shoot fresh weight; shoot dry weight, and root dry weight. There was no difference between strains; however, there was difference among the inoculation methods, with better results when seedlings received inoculate than in the seeds. In the second experiment, 7 strains were used; with 2 inoculate concentrations, and one moment of inoculation, at the 10th day after planting. The treatments for both experiments were placed in vases with 1kg of substrate (soil from A horizon of a Fragiudult). After 55 days the plants were collected and the following parameters evaluated: shoot fresh weight, shoot dry weight, and root dry weight. The plants inoculated with R142 strain showed increment of 40% in shoot fresh weight, and 55% in root dry weight. In the third experiment, the same 7 strains used in the second assay were inoculated; with 2 inoculate concentrations, and 2 inoculation periods. The parcels were set in Styrofoam containers for plants with the substrate PLANTMAX (EUCATEX). The plants were collected 24 days after planting and there was no difference between strains, but there were differences among inoculate concentration (10<sup>9</sup> was better than 10<sup>7</sup>), and the results were better when inoculated at the 6th day than at the 12th. The obtained data allow us to conclude that the R142 strain was efficient in promoting growth in kale, the inoculate dosage 10<sup>9</sup> was most appropriated, and the inoculation must be performed on seedlings.

**Key words:** Rhizobacteria;. AHL. PGPR. Growth promotion. Kale.

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	3
2.1	Sistemas Agrícolas: Mudança de Paradigma Rumo à Agricultura Sustentável.....	3
2.2	Rizobactérias Promotoras de Crescimento em Plantas .....	4
2.3	Sistema de Comunicação entre Microrganismos: A Percepção do Quorum.....	5
2.4	Produção de Biofilmes .....	9
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	10
3.1.	Caracterização Morfológica dos Isolados de Rizobactérias .....	10
3.2.	Ensaio com o Sistema Repórter <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	11
3.3.	Ensaio para Verificar a Capacidade de Formação de Biofilmes .....	11
3.4	Experimentos em Casa de Vegetação: Teste da Capacidade de Promoção de Crescimento em Couve .....	12
3.4.1	Experimento I .....	12
3.4.2	Experimento II .....	13
3.4.3	Experimento III.....	14
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	16
4.1	Caracterização Morfológica dos Isolados de Rizobactérias .....	16
4.2	Produção de AHL (Acil Homoserinas Lactonas) .....	23
4.3.	Formação de Biofilmes.....	25
4.4	Capacidade de Promoção de Crescimento em Couve .....	26
4.4.1	Experimento I .....	26
4.4.2	Experimento II .....	28
4.4.3	Experimento III.....	31
5	<b>CONCLUSÕES</b> .....	34
6	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	35
7	<b>ANEXOS</b> .....	40

## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas tem havido uma crescente preocupação com a preservação ambiental, devido à constatação de que as atividades antrópicas podem causar profundos impactos, muitas vezes irreversíveis, sobre os ecossistemas. A agricultura é uma atividade de grande relevância neste contexto, visto que utiliza e depende diretamente dos recursos naturais, além de estar relacionada a outros fatores como a posse da terra e a erradicação da pobreza, questões sociais cuja resolução é imprescindível para se alcançar o desenvolvimento e a preservação do ambiente.

Antes da Conferência de Estocolmo, em 1972, o modelo de desenvolvimento vigente caracterizava-se pela exploração não-planejada dos recursos naturais, levando à degradação ambiental. Atualmente vivenciamos um novo paradigma ambiental, em se busca maneiras de promover o desenvolvimento sem agredir a natureza, da qual todos fazem parte, visando à boa sobrevivência e qualidade de vida. Nos anos 90, a Conferência Rio 92, promovida pela ONU, foi um marco da preocupação mundial com as questões ambientais e a Agenda 21, formulada neste encontro, fornece as diretrizes rumo ao desenvolvimento sustentável, definido como a satisfação das necessidades da atual geração sem o comprometimento das necessidades das futuras gerações.

Tendo em vista esta nova concepção da natureza, há que se buscar também novas maneiras de se relacionar com o meio ambiente em todos os setores produtivos, visando sempre reduzir os impactos negativos e promover a sustentabilidade das atividades humanas. A atenção crescente às questões ambientais tem levado a uma mudança da agricultura dita convencional, que utiliza agrotóxicos e fertilizantes químicos, para uma agricultura que busca formas de manejo menos nocivas ao ambiente. Em sistemas agrícolas sustentáveis a microbiota do solo é de suma importância para processos do ecossistema, como a ciclagem de nutrientes e o controle de pragas e doenças. A fertilização e a aplicação de pesticidas representam distúrbios químicos cujos efeitos dependem das taxas de aplicação, das espécies envolvidas e do tipo de solo. A agricultura ecológica utiliza formas de manejo que promovem um melhor uso dos recursos naturais, enquanto preserva e incrementa os mesmos. Sendo assim, a utilização de inoculantes microbianos pode ser uma alternativa ao uso de fertilizantes e pesticidas, ou pode reduzir a aplicação destes, evitando ou diminuindo os possíveis danos ambientais advindos do uso destes produtos e, ainda auxiliando a recuperação de ecossistemas degradados.

Para a obtenção de inoculantes microbianos eficientes, há que se conhecer os microrganismos a serem utilizados, bem como os possíveis benefícios e impactos gerados pela introdução dos mesmos no agroecossistema. Deve-se conhecer a adequada quantidade de inóculo e sua concentração, bem como a melhor época para a introdução dos microrganismos de modo a se obter o melhor resultado possível.

O solo é um ambiente abundante em microrganismos, que podem ser encontrados em vida livre ou em associação com as plantas. Estas associações podem ser benéficas, como no caso de microrganismos que participam do controle biológico e promovem crescimento, ou prejudiciais, no caso de microrganismos fitopatogênicos. É necessário que se busque parâmetros para avaliação dos isolados em laboratório a fim de selecionar os mais promissores para a produção de inoculantes microbianos. Neste trabalho foi realizado isolamento de microrganismos rizosféricos, que vivem em associação com as plantas. No intuito de buscar parâmetros para a seleção dos melhores isolados, foi avaliada a capacidade dos isolados em produzir o auto-indutor AHL (acil homoserina lactona), caracterizando a presença de sistema de “quorum sensing”, e a formação de biofilmes.

“Quorum sensing” pode ser definido como um sistema de comunicação entre seres unicelulares em função de sua densidade populacional em determinado meio. Foi descoberto no início da década de 70 e detectado pela primeira vez em *Vibrio fischeri*, bactéria que pode ser encontrada em vida livre (forma planctônica), ou colonizando o trato gastrointestinal de peixes e outros animais marinhos, como a lula. À medida que a população aumenta, também aumenta a concentração de substâncias chamadas auto-indutores, secretadas pelos microrganismos. Estes auto-indutores promovem a transcrição de determinados genes que podem conferir alguma vantagem adaptativa para o microrganismo em questão. Devido à possibilidade da presença de sistema de “quorum sensing” promover melhor adaptabilidade ao microrganismo, este pode ser um parâmetro na seleção de rizobactérias promotoras de crescimento em plantas.

Outra característica que pode vir a ser um parâmetro para a seleção destas bactérias é a capacidade de formação de biofilmes. Estes podem ser definidos como comunidades de células bacterianas inseridas em uma matriz polimérica, formada por exopolissacarídeos produzidos pelas próprias bactérias, aderidas a um substrato biótico ou abiótico. Estas comunidades podem ser constituídas por microrganismos de uma mesma espécie ou de espécies diferentes, e confere proteção contra condições adversas do meio em que se encontram. Por isso, a formação de biofilmes pode ser uma característica interessante para se buscar em rizobactérias a serem utilizadas para a produção de inoculantes microbianos.

O objetivo do presente trabalho foi prospectar, caracterizar e avaliar bactérias do grupo *Pseudomonas sp.*, com vistas à seleção de estirpes com capacidade de promover crescimento em plantas, para utilização futura em programas de biotecnologia.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Sistemas Agrícolas: Mudança de Paradigma Rumo à Agricultura Sustentável

No século passado, mais especificamente após a Segunda Guerra Mundial, a agricultura passou por um processo de industrialização, com o surgimento de insumos como fertilizantes químicos, pesticidas, máquinas agrícolas e novos cultivares, e ainda pela mudança no sistema produtivo, com grandes extensões de terra produzindo uma só variedade de planta, as chamadas monoculturas, assemelhando-se aos sistemas de produção industrial. Este processo foi denominado “revolução verde” e, apesar do significativo aumento na produção de gêneros agrícolas, levou a sérios problemas sociais e ambientais (BARKIN, 1997).

ALTIERI (1992) relata que na tentativa de modernizar a agricultura na América Latina após a Segunda Guerra Mundial foram promovidas e difundidas tecnologias que economizavam trabalho e mão-de-obra, em uma seqüência de ciclos, que consistiram em novas práticas agrônômicas, como diminuição de espaçamento entre plantas e utilização de uma só cultura; mecanização das lavouras; introdução de sementes oriundas de melhoramento genético, principalmente as híbridas; pesticidas e fertilizantes químicos e mais recentemente tecnologias advindas da biotecnologia. Ainda que, de fato, tenha havido aumento na produtividade devido à incorporação das tecnologias oriundas da revolução verde, os custos ambientais e sociais foram demasiado altos. O uso intensivo de pesticidas levou à contaminação do solo e da água e, conseqüentemente do homem e outros animais, além do surgimento de insetos e microrganismos resistentes, induzindo à utilização de quantidades cada vez maiores de pesticidas. O manejo do solo privilegiando a mecanização e a utilização de fertilizantes químicos leva à erosão, com perda das camadas mais superficiais e redução da fertilidade.

Na busca por sistemas de produção agrícola que conciliassem produtividade com preservação ambiental, surgiram diversas correntes de “agricultura alternativa” ou “agricultura ecológica” como a agricultura orgânica, a agricultura biodinâmica, a permacultura e a agroecologia, para citar alguns exemplos. Dentre estas correntes a agroecologia destaca-se ao incorporar em sua essência, além da questão ambiental, a dimensão social, valorizando os saberes de populações tradicionais e o desenvolvimento local, além da preservação do meio ambiente e a biodiversidade. Apesar de algumas práticas agroecológicas serem tão antigas quanto a própria agricultura, estas foram aperfeiçoadas e ganharam força graças aos estudos de ecologia dos irmãos ODUM nos anos 50 e 60 e ao surgimento dos movimentos ambientalistas nos anos 60 e 70 (GELATS, 2004). Ao revisar a origem da agroecologia, este autor comenta que o termo foi usado pela primeira vez pelo agrônomo russo BASIL BENSIN em 1938, sendo definido como práticas baseadas no meio ambiente e na cultura rural particular de determinada região. Entretanto, ainda de acordo com GELATS (2004), os estudos dos irmãos ODUM e o surgimento do movimento ambientalista, com o livro “Primavera Silenciosa” de RACHEL CARSON (1962), onde a autora aborda problemas relacionados ao uso de pesticidas, reforçaram a necessidade da busca por sistemas de produção agrícola ambientalmente mais adequados.

Neste contexto, a proposta da agroecologia pode ser entendida como uma mudança de paradigma na agricultura, favorecendo as interações entre os organismos através do aumento da diversidade biológica no agroecossistema, ao invés de substituir os processos biológicos

por insumos externos, como adubos químicos e pesticidas. A ciência da agroecologia, na visão de GLIESSMAN (2001), é definida como a aplicação de conceitos e princípios ecológicos no desenho e manejo de agroecossistemas sustentáveis, além de valorizar o conhecimento local e empírico dos agricultores, a socialização desse conhecimento e sua aplicação ao objetivo comum da sustentabilidade.

A idéia de se estimular as relações entre os organismos a fim de se incrementar os processos biológicos, ao invés de substituí-los por insumos químicos pode levar a agroecossistemas mais estáveis, onde a introdução de insumos e energia diminua com o passar do tempo. A utilização de microrganismos na agricultura, tanto para controle biológico, como para melhor aproveitamento de nutrientes se constitui numa ferramenta interessante no caminho rumo a sistemas agrícolas mais equilibrados.

## 2.2 Rizobactérias Promotoras de Crescimento em Plantas

Os microrganismos desempenham diversas funções e estão presentes nos mais diversos ecossistemas, naturais ou modificados. Na agricultura, considerando os preceitos da “revolução verde”, os microrganismos são encarados como algo a ser combatido e eliminado. Atualmente, entretanto, após décadas de pesquisa e vivenciando um novo paradigma ambiental, no qual se busca trabalhar com a natureza, ao invés de contra a mesma, os microrganismos são vistos como importantes componentes dos agroecossistemas, muitas vezes trazendo mais vantagens do que desvantagens à produção agrícola.

Entre os microrganismos que podem beneficiar a produção agrícola pode-se citar as Rizobactérias Promotoras de Crescimento em Plantas (RPCPs), que incluem um conjunto de microrganismos que vivem em associação muito próxima com as raízes das plantas (ST. JOHN, 1992), utilizando os exsudatos destas e em contrapartida produzindo substâncias que promovem um melhor desenvolvimento das plantas. De acordo com ZAGO et al. (2000), grande parte das estirpes de RPCPs pertence aos gêneros *Pseudomonas* (gram-negativas) e *Bacillus* (gram-positivas), sendo que dentre as primeiras o maior número de espécies refere-se ao grupo das fluorescentes.

A promoção de crescimento pode ser direta, quando uma rizobactéria produz metabólitos que propiciam o crescimento das plantas, como substâncias similares a fitormônios. Pode ser também indireta, quando ocorre a produção, pelas rizobactérias, de substâncias que inibem a atividade de fitopatógenos, como antibióticos, sideróforos e ácido hidrociânico (ZAGO et al, 2000).

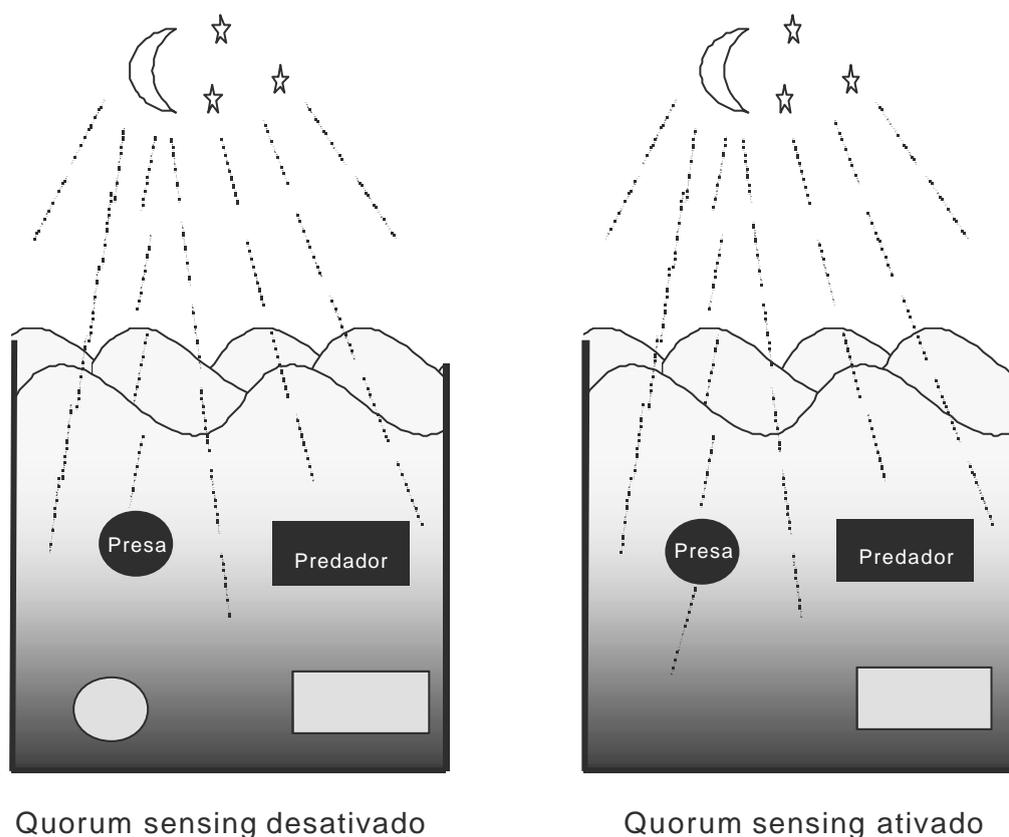
A utilização de RPCPs na agricultura pode trazer benefícios para as culturas, tanto pelo efeito direto, como pelos efeitos indiretos de promoção de crescimento. Há relatos de efeitos sinérgicos quando se procede a inoculação de RPCPs em conjunto com outros microrganismos, como fungos micorrízicos arbusculares e bactérias fixadoras de nitrogênio. GAMALERO et al. (2004) relatam significativo aumento na massa fresca de parte aérea e raízes em tomate quando inoculado com fungos micorrízico-arbusculares e duas estirpes do gênero *Pseudomonas spp.* e TILAK et al (2006) concluíram que a inoculação de *Rhizobium spp.* com *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens* e *Bacillus cereus* promoveu maior crescimento e nodulação em guandu (*Cajanus cajan*).

São muitas as rizobactérias de ocorrência natural e é importante que se encontrem parâmetros que forneçam indicação das estirpes mais eficientes na promoção de crescimento de plantas e no biocontrole e ainda, aquelas mais adequadas em cada caso.

### 2.3 Sistema de Comunicação entre Microrganismos: A Percepção do Quorum

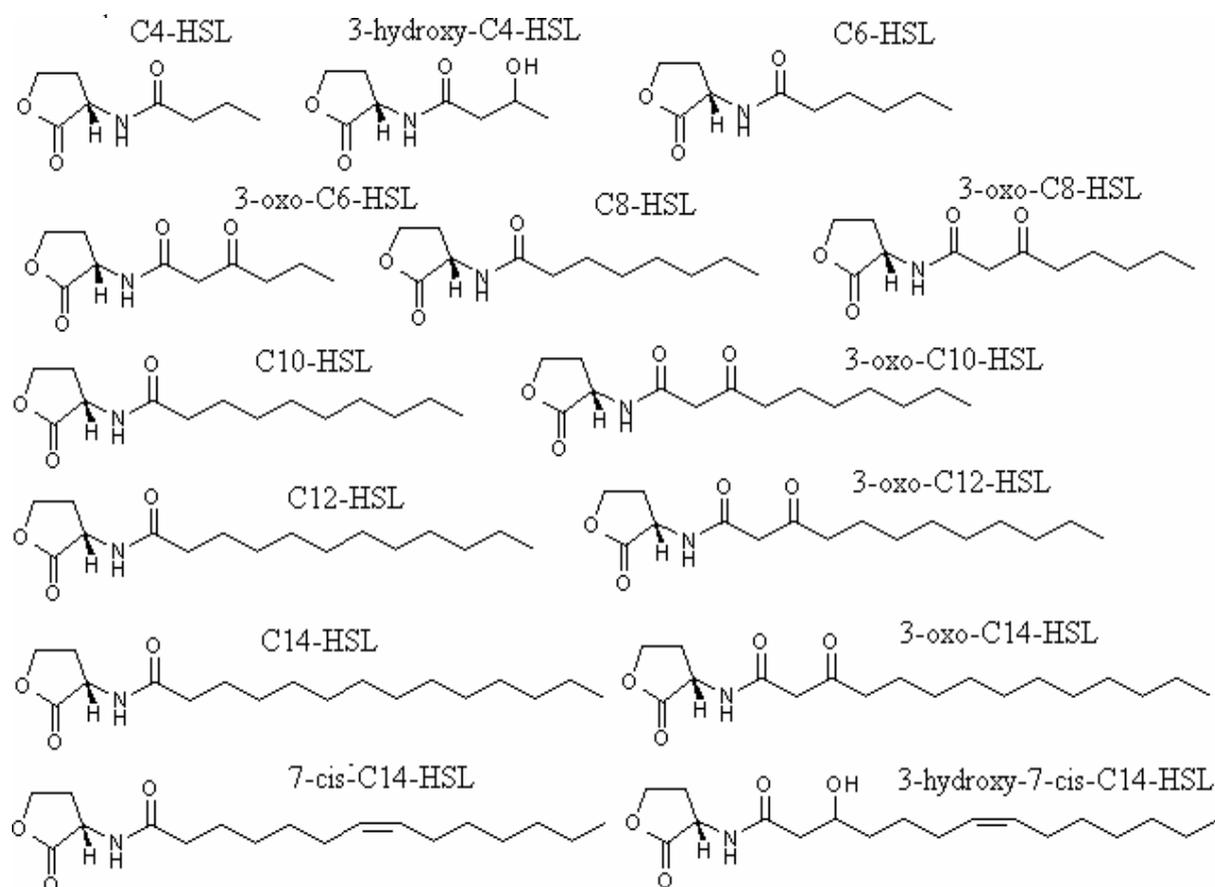
Um mecanismo de comunicação entre microrganismos, descoberto no final da década de 60, denominado “quorum sensing”, possivelmente pode vir a elucidar muitas questões relacionadas às interações entre microrganismos rizosféricos. Uma definição apropriada seria que “quorum sensing” é um sistema pelo qual os seres unicelulares possuem a habilidade de perceber o tamanho de sua população em determinado ambiente, através da produção de substâncias sinalizadoras, denominadas auto-indutores (CAMILLI & BASSLER, 2006).

Os estudos sobre este mecanismo, denominado “quorum sensing” foram iniciados no final dos anos 60, quando alguns autores (NEALSON et al., 1970 e EBERHARD, 1972) suspeitaram haver um sistema de comunicação entre seres unicelulares, mais especificamente bactérias, que os levava a apresentar determinados comportamentos em função da densidade populacional. A bactéria primeiramente estudada foi *Vibrio fischeri*, que tanto pode ser encontrada em vida livre como na forma de um microrganismo planctônico, como colonizando o trato gastrointestinal, mais especificamente órgãos luminescentes, de alguns peixes e cefalópodes marinhos, como a lula (Figura 1). Quando presentes no sistema digestivo destes animais, após atingir determinado número de indivíduos, levam a um fenômeno conhecido como bioluminescência que auxilia na camuflagem para escapar de possíveis predadores. Em noites de lua cheia, a bioluminescência faz com que não haja sombra da lula no solo do fundo do mar e, portanto seus predadores têm mais dificuldade em localizá-la.



**Figura 1.** Representação esquemática da função da bioluminescência para a lula (adaptado de RUMJANEK et al., 2004).

A pesquisa sobre a regulação da bioluminescência em *Vibrio fischeri* levou à descoberta dos sistemas bacterianos de “quorum sensing” via N-acil lactonas homoserinas (ALHs), também chamados auto-indutores (Figura 2). A partir de uma determinada concentração limite de auto-indutores, estes sinais servem de co-indutores e passam a regular a transcrição de genes-alvo sendo que os produtos de transcrição garantem, presumivelmente, alguma vantagem para a célula bacteriana nesta condição particular. No caso de *V. fischeri*, quando a população de bactérias atinge um determinado nível crítico, as moléculas do auto-indutor passam a interagir com proteínas chamadas LuxR, convertendo-as em ativadoras da transcrição funcional. É ativada, então, a transcrição do operon *lux*, cujo primeiro gene é o *luxI*. A partir daí, a proteína LuxI, codificada por este gene, catalisa a síntese de novas moléculas sinalizadoras (DUNLAP & GREENBERG, 1988; FUQUA et al., 1994; FUQUA et al., 1996). Desta maneira, a ativação por auto-indução resulta na produção de quantidades crescentes dos ativadores funcionais (co-indutores) e, concomitantemente a amplificação da transcrição do operon-alvo.



**Figura 2.** Fórmula estrutural de alguns AHL (acil homoserina lactona). Adaptado do site [www.nottingham.ac.uk/quorum/AHLs.htm](http://www.nottingham.ac.uk/quorum/AHLs.htm) em 22/05/2007.

Esse sistema de comunicação é utilizado na regulação de várias características bacterianas, desde as ligadas à sobrevivência até as determinantes de patogenicidade (CAMILLI & BASSLER, 2006). A fitobactéria *Pantoea stewartii ssp. stewartii*, por exemplo, 55556655

tem sua síntese de exopolissacarídeos regulada por sistema de “quorum sensing” e estes são fundamentais para sua atuação como fitopatógeno. Sendo assim, bactérias deficientes na produção de auto-indutores são avirulentas (MINOGUE et al., 2005). A habilidade de se comunicarem umas com as outras permite que as bactérias coordenem sua expressão gênica e, desta maneira, o comportamento de toda a comunidade, conferindo às bactérias qualidades de organismos multicelulares. De acordo com MILLER & BASSLER (2001), a evolução de sistemas de “quorum sensing” em bactérias pode ter sido um dos primeiros passos no desenvolvimento da multicelularidade.

Durante algum tempo acreditou-se que o sistema de “quorum sensing” baseado em acil homoserinas lactonas (AHLs) fosse restrito a bactérias bioluminescentes marinhas, entretanto pesquisas sobre a síntese de antibióticos conduzidas no início dos anos 90 levaram à descoberta de que este sistema estava presente em muitos outros microrganismos. WILLIAMS et al. (1992), observaram que mutantes de *Erwinia carotovora* que não produziam antibióticos, conseguiam fazê-lo ao serem expostos a um meio onde previamente encontravam-se mutantes capazes de produzir antibiótico. Concluíram, então, que estes estavam produzindo AHL que em contato com os mutantes não produtores induzia os mesmos a sintetizar antibióticos. Ainda nos anos 90, foi demonstrado que a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* também possui um sistema de “quorum sensing”, que regula a produção de fatores de virulência (GAMBELLO & IGLEWSKI, 1991; LATIFI et al., 1995).

À medida que os estudos sobre “quorum sensing” avançaram, descobriu-se que inúmeras espécies de microrganismos possuem este mecanismo e ainda que existem sistemas de quorum sensing regulados por outros auto-indutores, além das AHLs. Sabe-se que as bactérias gram-negativas, em geral, possuem sistemas de “quorum sensing” baseados nas AHLs, substâncias que apresentam uma estrutura de aminoácidos modificados (lactonas homoserinas) com radicais substituintes de cadeias acil. As bactérias gram-positivas, entretanto, têm demonstrado utilizar diferentes sinais moleculares. Sistemas de “quorum sensing” baseados em peptídeos modificados foram encontrados regulando diversos processos, como a virulência em *Staphylococcus aureus* (KLEEREBEZEM et al., 1997). Outro sistema baseado na butirólactona é utilizado por *Streptomyces sp* no controle da produção e resistência a antibióticos (BIBB, 1996). Foi descrito ainda um sistema de “quorum sensing” em *Vibrio harveyi*, baseado em uma molécula, denominada AI-2 (BASSLER et al., 1997). Este sistema tem sido encontrado em um grande número de espécies de bactérias, sendo considerado um sinal universal entre diferentes espécies.

Atualmente existem três classes bem definidas de moléculas que servem como paradigma para a sinalização química em bactérias: oligopeptídeos, AHLs e AI-2, cada uma com diferente grau de especificidade e diferentes custos de produção para as bactérias (KELLER & SURETTE, 2006), como descrito na tabela abaixo (Tabela 1):

**Tabela 1.** Auto-indutores, bactérias produtoras, especificidade e custo metabólico na sinalização química em bactérias. Adaptado de KELLER & SURETTE, 2006.

Auto-indutor	Bactéria	Especificidade	Custo Metabólico
Oligopeptídeos	Gram-positivas	Alta	Alto
AHLs	Gram-negativas	Moderada	Intermediário
AI-2	Gram-positivas e Gram-negativas	Baixa ou Inespecífica	Baixo

Tendo em vista a grande quantidade de microrganismos que possuem sistemas de “quorum sensing” regulando importantes características, pode-se considerar que este é um campo de estudo muito promissor para várias áreas, como agricultura, veterinária, medicina, farmácia, ecologia, entre outras.

Muitas bactérias associadas a plantas e animais apresentam sistemas de “quorum sensing”, tanto bactérias simbióticas como patogênicas. Deste modo, existem inúmeras possibilidades de se utilizar o conhecimento do funcionamento dos sistemas de “quorum sensing”, seja para combater doenças ou para otimizar associações benéficas.

RASCH et al. (2004) obtiveram resultados que sugerem a possibilidade de se tratar a infecção de peixes, mais especificamente trutas (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum), por *Vibrio anguillarum* através da manipulação do sistema de “quorum sensing” desta bactéria, sem a utilização de antibióticos. A infecção pela bactéria oportunista *Pseudomonas aeruginosa* pode levar a estados patogênicos tanto em humanos como em outros animais. Em humanos pode causar infecção crônica em pacientes acometidos por fibrose cística (HOGARDT et al., 2004), complicando ainda mais a sua condição. Em animais, como os cães, por exemplo, podem ser isoladas no conduto auditivo em casos de otite crônica (TRON & al., 2004). Uma das estratégias de sobrevivência desta bactéria é a formação de biofilmes, que as protegem das condições adversas do meio, como a atuação do sistema imunológico de seus hospedeiros. A formação de biofilmes pode ser regulada por sistema de “quorum sensing”, sendo possível desenvolver terapias mais eficientes através de um melhor entendimento do processo (LEQUETTE & GREENBERG, 2005).

De acordo com RUMJANEK et al (2004), a descoberta da diversidade de microrganismos que usam sistemas de “quorum sensing” cria um alvo atrativo para a sua aplicação biotecnológica na agricultura, pois além de fornecer detalhes fundamentais acerca dos mecanismos de parasitismo e simbiose, pode permitir meios inovadores para o controle de infecções em plantas e animais. Um desses exemplos são as bactérias do grupo das *Pseudomonas* fluorescentes, envolvidas no controle biológico de fungos causadores de damping-off, *Rhizoctonia solani* e *Phytophthora ultimum*, através da produção de substâncias antifúngicas regulada por mecanismo de “quorum sensing”, e promotoras de crescimento (ANDERSEN et al., 2003). A habilidade na comunicação intercelular tem sido demonstrada em diversas espécies do gênero *Pseudomonas sp.* (JUHAS, et al., 2005).

Informações a respeito de condições que estimulem ou inibam sistemas de “quorum sensing” são importantes para o manejo destes sistemas de modo a trazer benefícios práticos na agricultura e nas demais áreas de interesse. Foi encontrado por DANHORN et al. (2004) que a aderência de biofilmes produzidos por *Agrobacterium tumefaciens* é aumentada em condições de baixo teor de fósforo.

Recentes estudos demonstraram a existência de sistemas de “quorum sensing” em microrganismos eucarióticos, como *Candida albicans*, levedura que causa infecções oportunistas no homem e em outros animais (KRUPPA et al., 2004), e há evidências de que estes sistemas atuem não somente em microrganismos, mas também em seus organismos hospedeiros (ZHANG & DONG, 2004). Evidências sugerem que alguns auto-indutores são utilizados não só para comunicação intraespecífica, mas também para comunicação entre espécies diferentes (JUHAS et al., 2005). KELLER & SURETTE (2006), comentam que é importante considerar que sistemas de comunicação celular podem ter evoluído devido à necessidade de cooperação em alguns casos e, em outros, devido à necessidade de competição entre organismos vivendo em um mesmo ambiente.

Ainda há muito que se elucidar a respeito de sistemas de “quorum sensing”, visto que é um assunto relativamente recente, mas já se pode perceber que são sistemas encontrados em

um grande número de espécies e que sua função pode variar de acordo com o ambiente e os organismos envolvidos.

## 2.4 Produção de Biofilmes

Ao longo do processo evolutivo, diversas estratégias foram desenvolvidas por seres unicelulares, como também pelos demais seres vivos, para melhorar sua adaptação ao meio em que vivem. Em relação aos microrganismos, a formação de biofilmes é uma delas.

Os biofilmes bacterianos são comunidades estruturadas de células aderidas a um substrato biótico ou não, inseridas em uma matriz polimérica produzida pelas próprias bactérias (COSTERTON et al, 1999). Essas comunidades podem ser formadas por uma ou várias espécies bacterianas e a sua formação permite uma maior adaptabilidade e melhor aproveitamento dos recursos do ambiente, tendo em vista que os biofilmes protegem as bactérias nele inseridas contra agentes antimicrobianos e permitem uma cooperação metabólica, através da troca de substratos e distribuição de metabólitos (SOUZA, 2002).

A persistência do patógeno bacteriano *Vibrio cholerae* em ambientes aquáticos é uma das causas da ocorrência de surtos sazonais de cólera e, isto se deve à capacidade do *V. cholerae* em formar biofilmes em superfícies animadas e inanimadas (MATZ et al., 2005). Os sistemas de “quorum sensing”, são responsáveis pelo controle da patogênese, da produção de biofilmes e de protease em *Vibrio cholerae*. Auxiliam também sua sobrevivência quando expostos à água do mar, pois esta é melhor quando estão associadas em biofilmes do que quando se encontram em seu estado planctônico (JOELSSON et al., 2006).

A capacidade de um microrganismo em formar biofilme pode ser prejudicial aos humanos, como no caso do *V. cholerae*, mas também pode ser benéfica, como no caso dos trabalhos de biorremediação. De acordo com KAPLAN & KITTS (2004), três tipos de biorremediação são predominantes na indústria atualmente: atenuação natural, que consiste no monitoramento de áreas contaminadas; bioestimulação, onde o ambiente é alterado, em geral pela adição de nutrientes como nitrogênio e fósforo, de modo a torná-lo favorável a microrganismos que degradam contaminantes e a introdução de microrganismos degradadores no ambiente. Biofilmes são produzidos por vários microrganismos e propiciam melhores condições para que estes se estabeleçam. Na biorremediação utiliza-se biofilmes para a formação de um habitat específico em sistemas contaminados (BETANCOURTH et al., 2004; DUTTA et al., 2005) e, por isso, as bactérias formadoras de biofilmes têm melhor desempenho na biorremediação.

São interessantes também como modelo de estudo do desenvolvimento e evolução de organismos multicelulares. Entretanto, KREFT & BONHOEFFER, (...) afirmam que embora bactérias vivendo em biofilmes não tenham evoluído para organismos multicelulares mostrando aspectos funcionais de multicelularidade, as fases de formação do biofilme correspondem à adaptação e sucessão ecológica, sendo útil em estudos de ecologia microbiana.

Possivelmente, a formação de biofilmes bacterianos favorece a promoção de crescimento mediada por rizobactérias, como ocorre com as associações de bactérias do gênero *Pseudomonas spp.* sobre a superfície das raízes de plantas. 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).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

As atividades práticas do estudo foram conduzidas na EMBRAPA – Agrobiologia, no Laboratório de Ecologia Microbiana. A seguir são descritos os isolados de rizobactérias utilizados, através da caracterização morfológica de suas colônias, as metodologias utilizadas para a verificação da produção de AHL, que indica a presença de sistema de “quorum sensing”, produção de biofilme pelas estirpes de rizobactérias da coleção do laboratório supracitado e os experimentos de promoção de crescimento em casa de vegetação.

#### 3.1. Caracterização Morfológica dos Isolados de Rizobactérias

No mês de agosto de 2005 foi formada uma coleção com um total de 127 isolados de rizobactérias, constituídos de 17 isolados obtidos de raízes de alface (*Lactuca sativa* L.), 48 isolados obtidos de raízes de couve (*Brassica oleracea* cv. *Acephala*), 29 isolados obtidos de raízes de rúcula (*Eruca vesicaria sativa* (Mill) Thell) e 33 isolados obtidos de raízes de salsa (*Petroselinum crispum*), cultivadas no sistema integrado de produção agroecológica - SIPA (Convênio Embrapa Agrobiologia, UFRRJ e PESAGRO), em Seropédica-RJ. As plantas encontravam-se na porção do Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA) denominada “Ilha”, onde comumente são cultivadas hortaliças. O local foi escolhido, porque há cerca de 10 anos tem-se cultivado diversas culturas agrícolas, além de criação de animais, em sistema de produção agroecológico e, observa-se baixa ocorrência de pragas e doenças em plantas. Portanto, acredita-se que as plantas cultivadas nessa região apresentem forte interação com diversos microrganismos promotores de crescimento e biocontroladores de fitopatógenos.

A obtenção dos isolados foi realizada quando as plantas apresentavam cerca de 1/3 de seu ciclo no campo, de acordo com a metodologia descrita por XAVIER et al. (2004). As plantas foram coletadas e as raízes retiradas e lavadas por 5 segundos em solução estéril de NaCl a 0,85%. As raízes foram então secas em papel toalha estéril e se pesou 1 g por planta, sendo colocado em tubo falcon estéril de 50 ml ao qual foram adicionados 20 ml de solução estéril de NaCl a 0,85%. Os tubos foram colocados em agitador de ação pulsada por 30 minutos a 20 rpm. Após este tempo, foram retiradas alíquotas de 8 ml e centrifugadas a 8000 rpm por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e se adicionou 1 ml de água destilada estéril, levou-se ao Vórtex por 10 segundos e transferiu-se para microtubo estéril de 1,5 ml. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 15 minutos. Descartou-se o sobrenadante e foram realizadas diluições, com água destilada estéril, de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-10</sup> e estas cultivadas em meio KB sólido modificado para *Pseudomonas* (KING et al., 1954) com os antibióticos cloranfenicol (12,5 ppm) e ampicilina (50 ppm) e o antifúngico ciclohexamida (100 ppm). A partir das placas que apresentaram crescimento bacteriano, foram selecionados e transferidos para outra placa de Petri contendo meio KB as colônias que apresentavam diferenças visuais. Após o cultivo, os isolados foram armazenados em meio KB líquido e glicerol, em proporção 1:1 a 20 °C.

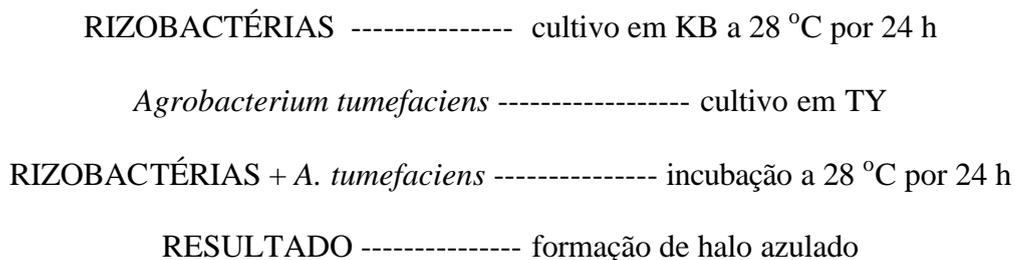
Para a caracterização morfológica, os referidos isolados foram cultivados em meio KB sólido modificado para *Pseudomonas* a partir de estoque do mesmo KB líquido e glicerol 1:1 mantido a -20 °C, em tubos de 1 ml. O conteúdo dos tubos foi homogeneizado em Vórtex por alguns segundos e, imediatamente após, foi retirada uma pequena quantidade com alça de platina e colocada em placa de Petri com KB sólido, em forma de zigue-zague. O procedimento foi realizado em capela de fluxo horizontal.

As placas contendo os isolados de rizobactérias foram levadas à estufa, onde permaneceram por 48 h, à temperatura de cerca de 28 °C. Após este intervalo de tempo foi feita a caracterização morfológica das colônias, cujos parâmetros avaliados foram: tamanho (em mm), forma, borda, aspecto da colônia, cor, transparência, fluorescência e presença de muco.

### 3.2. Ensaio com o Sistema Repórter *Agrobacterium tumefaciens*

O sistema repórter utilizado foi a bactéria indicadora *Agrobacterium tumefaciens* NT1, na qual a produção de AHL foi bloqueada por mutação, mas que contém um gene repórter responsivo ao AHL exógeno. A bactéria indicadora foi então cultivada em meio de cultura TY semi-sólido, no qual foi também colocado X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-*B*-D-galactoside). Ao entrar em contato com um isolado produtor de AHL, foi observada a formação de *B*-galactosidase, conferindo coloração azul ao meio devido à hidrólise do X-Gal (VAN HOUDT et al., 2003).

A bactéria *A. tumefaciens* repórter foi cultivada em meio TY semi-sólido e os isolados de rizobactérias em meio KB sólido, cerca de 24 horas antes do sistema repórter. Pequenos fragmentos circulares (cerca de 0,5 cm de diâmetro) foram retirados das placas com rizobactérias e colocados sobre a placa com *A. tumefaciens* repórter. Colocou-se então para incubação em estufa por 24 horas a 28 °C e foram feitas as observações (Figura 3).



**Figura 3.** Esquema da metodologia utilizada no ensaio para detectar a produção de AHL (acil homoserinas lactonas).

Foram testados 112 isolados de rizobactérias, sendo 17 isolados de alface (*Lactuca sativa* L.), 44 de couve (*Brassica oleracea* cv. *Acephala*), 27 de rúcula (*Eruca vesicaria sativa* (Mill) Thell) e 24 de salsa (*Petroselinum crispum*) cultivadas no sistema integrado de produção agroecológica - SIPA (Convênio Embrapa Agrobiologia, UFRRJ e PESAGRO), em Seropédica-RJ, para verificar a produção de auto-indutores do tipo AHL (acil homoserinas lactonas), com a utilização do sistema *Agrobacterium tumefaciens* reporter descrito anteriormente. A coleção constitui-se de 127 isolados e todos foram cultivados para a realização do teste, entretanto 15 não puderam ser utilizados, pois alguns levaram mais tempo para crescer e outros apresentaram contaminação.

### 3.3. Ensaio para Verificar a Capacidade de Formação de Biofilmes

Com alça de platina, retirou-se uma alíquota, a partir do estoque em microtubos contendo glicerol e KB líquido à temperatura de -20 °C e em seguida, transferiu-se para placas de Petri contendo meio King B sólido, que foram incubadas a 28 °C durante 24 h. Após este período, uma pequena quantidade das colônias foi retirada com alça de platina e colocada em tubos de ensaio contendo 3 ml de meio KB líquido. Os tubos foram incubados a 28 °C por

24 h sob agitação e posteriormente, foram feitas as observações visuais.

Foram testados 91 isolados de rizobactérias oriundos do rizoplano de hortaliças, sendo 14 de alface (*Lactuca sativa* L.), 23 de couve (*Brassica oleracea* cv. *Acephala*), 23 de rúcula (*Eruca vesicaria sativa* (Mill) Thell) e 31 de salsa (*Petroselinum crispum*), cultivadas no sistema integrado de produção agroecológica - SIPA (Convênio Embrapa Agrobiologia, UFRRJ e PESAGRO), em Seropédica-RJ. Foram preparados 100 isolados para o teste, escolhidos aleatoriamente, porém 9 apresentaram contaminação e não puderam ser utilizados.

### **3.4 Experimentos em Casa de Vegetação: Teste da Capacidade de Promoção de Crescimento em Couve**

#### **3.4.1 Experimento I**

No planejamento do experimento I, três fatores foram levados em consideração. Primeiramente, foram escolhidos dois isolados de bactérias com características opostas: um sem capacidade de formar biofilme e produzir AHL e outro com capacidade de formar biofilme e produzir AHL. O segundo fator considerado foi a forma de inoculação. Esta foi efetuada nas sementes e em plântulas e, no dia da montagem do experimento e aos doze dias após o plantio. Aos doze dias foi realizado desbaste em todas as parcelas. Por último foi testada a concentração do inoculo, através da determinação de sua densidade óptica, tendo sido utilizadas cinco diluições distintas.

Para a avaliação dos resultados do experimento I, as variáveis analisadas foram: massa fresca da parte aérea, massa seca da parte aérea e massa seca das raízes, em gramas.

O experimento foi conduzido em um delineamento de blocos ao acaso, em fatorial 3x4x5, com 60 tratamentos e 5 repetições, num total de 300 parcelas. Cada parcela se constituiu de um vaso contendo 1 kg de terra oriunda de horizonte A de um Planossolo, não-estéril, no qual foram plantadas 5 sementes ou plântulas de couve, que receberam 1 ml de inoculo, em diferentes concentrações.

#### **Fatores**

##### **Fator 1: Bactéria**

1. Sem Bactéria
2. Com Bactéria, Sem produção de AHL e Sem formação de Biofilme
3. Com Bactéria, Com produção de AHL e Com produção de Biofilme

##### **Fator 2: Época de Inoculação**

1. Inoculação das sementes e desbaste aos 12 dias
2. Inoculação das sementes aos 12 dias, seguida de desbaste
3. Inoculação das plântulas (sementes pré-germinadas com 2 dias) e desbaste aos 12 dias
4. Inoculação das plântulas (sementes pré-germinadas com 2 dias) aos 12 dias, seguida de desbaste

##### **Fator 3: Concentração do Inoculo (nm):**

1. Densidade Óptica = 1,0
2. Densidade Óptica = 0,5
3. Densidade Óptica = 0,25
4. Densidade Óptica = 0,125
5. Densidade Óptica = 0,065

Os isolados utilizados para preparação do inoculo a ser utilizado no experimento foram previamente cultivados em 50 ml de meio King B líquido, sob agitação, a temperatura de aproximadamente 28 °C, durante 24 h. Após este período de tempo, as células foram centrifugadas a 6000 rpm, durante 3 minutos. A densidade óptica foi determinada em comprimento de onda de 540 nm e ajustada de acordo com as concentrações pré-estabelecidas (fator 3).

Foi depositado um volume de 1 ml de inoculo em cinco diferentes concentrações sobre as sementes ou plântulas de couve em cada vaso contendo 1 kg de terra oriunda de horizonte A de um Planossolo, não esterilizado. O inoculo foi depositado sobre as sementes e na região próxima às raízes das plântulas, o mais próximo possível das mesmas. A avaliação foi realizada 30 dias após a instalação do experimento. Foi realizada análise de variância através do programa SISVAR, seguida do teste de Scott-Knott.

### 3.4.2 Experimento II

No experimento II foram utilizados 7 isolados de bactérias, além do controle, (Tabela 2) e as concentrações de inoculo ( $10^9$  e  $10^7$  ufc/ml), o substrato utilizado foi terra não esterilizada oriunda do horizonte A de um Planossolo.

**Tabela 2.** Isolados de Rizobactérias, planta de origem, formação de biofilme e produção de AHL (acil homoserinas lactonas).

Número	Isolado	Planta de origem	Biofilme	AHL
1	A1101	Alface	+	-
2	A242	Alface	+	+
3	A161	Alface	+	-
4	A263	Alface	+	+
5	C122	Couve	+	-
6	C352	Couve	+	-
7	R142	Rúcula	+	-
8	Controle	---	---	---

Cada parcela do experimento II constituiu-se de um vaso plástico com aproximadamente 1 kg de substrato. O volume de inoculante aplicado foi de 200 microlitros aplicados em cada parcela no experimento. A inoculação foi realizada uma única vez no décimo dia.

Preparo do inoculo: Na preparação do inoculo os isolados previamente cultivados em placas com meio KB sólido e incubados por 48 horas a 28 °C. Após este período, a superfície da placa foi raspada e o material foi transferido para recipiente contendo 200 ml de meio King B líquido, sendo incubadas sob agitação, à temperatura de 28 °C, durante 24 h. As células foram então centrifugadas a 10000 rpm, durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e para o preparo da dose  $10^9$  foi adicionado 200 ml de água destilada esterilizada. Para a preparação da dose  $10^7$ , retirou-se uma alíquota de 20 ml da dose  $10^9$  e completou-se com 200 ml de água destilada esterilizada.

Foi montado um experimento em vasos plásticos contendo aproximadamente 1 kg de horizonte A de um Planossolo (Figura 4). O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso, com 7 isolados, mais 1 controle, 2 doses de inoculo ( $10^9$  e  $10^7$  ufc/ml) e 5 repetições

(fatorial 8x2), num total de 80 parcelas. Foram plantadas 4 sementes de couve em cada um dos 80 vasos plásticos contendo aproximadamente 1 kg de substrato. Após a emergência, foi realizado o desbaste, ficando apenas uma planta em cada vaso. Dez dias após o plantio foi realizada a inoculação.



**Figura 4.** Parcelas experimentais do experimento II.

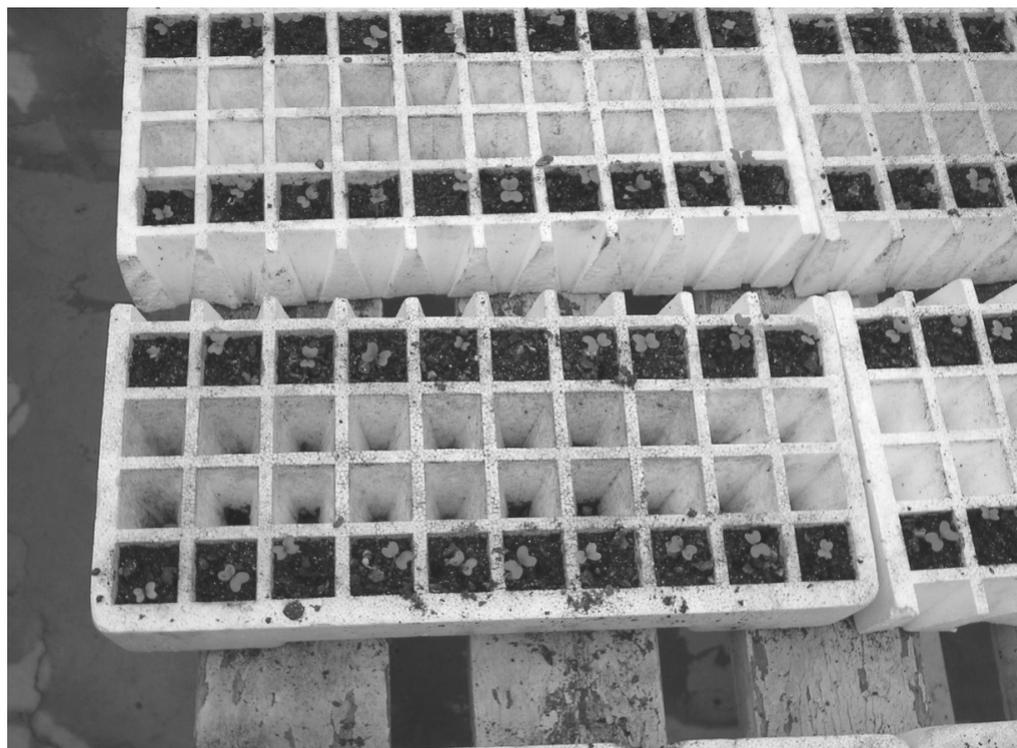
No 27º dia após o plantio foi realizada adição de nutrientes ao substrato, pois as plantas apresentavam-se visualmente deficientes, utilizando-se uma solução de adubação para vasos contendo macro e micronutrientes. Foi aplicado 10% da dose recomendada. Na inoculação das parcelas, realizada 10 dias após o plantio, foi depositado o volume de 200 microlitros de inoculo em duas diferentes concentrações, ao redor das raízes das plântulas de couve em cada vaso contendo 1 kg de terra oriunda de horizonte A de um Planossolo, não esterilizado. A coleta ocorreu 55 dias após o plantio e os parâmetros avaliados foram: massa fresca da parte aérea, massa seca da parte aérea e das raízes. Os dados foram submetidos a uma análise de variância e as medias testadas pelo teste de Tukey a 5% usando o programa SISVAR.

### 3.4.3 Experimento III

No experimento III foram utilizados os mesmos 7 isolados de bactérias do experimento II, além do controle, e as mesmas concentrações de inoculo ( $10^9$  e  $10^7$  ufc/ml). Cada parcela do experimento III constituiu-se de dez células de uma bandeja de isopor, com 12x36 cm. O volume de foi de 3 ml em cada célula da bandeja e a inoculação foi realizada no sexto dia após o plantio, na metade das parcelas e no décimo segundo dia, na outra metade. A preparação do inoculo foi igual à do experimento II. O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, com 7 isolados, mais o controle, 2 doses de inoculo ( $10^9$  e  $10^7$  ufc/ml), 2 épocas de inoculação (ao 6º e ao 12º dia após o plantio) e 3 repetições (8x2x2), num total de 96 parcelas.

Foi montado um experimento em bandejas de isopor (Figura 5), utilizando-se as duas linhas laterais e em cada uma foi inoculada o mesmo isolado, mas em duas diferentes concentrações. A planta utilizada foi a couve e o substrato, PLANTMAX (EUCATEX), que é um substrato comercial para produção de hortaliças.

Foram plantadas 3 sementes por célula e após a emergência, foi feito o desbaste ficando uma plântula por célula. Após 24 dias as plantas foram coletadas e foi avaliada a massa fresca da parte aérea, a massa seca da parte aérea e das raízes. Os dados foram submetidos a uma análise de variância e as medias testadas pelo teste de Tukey a 5% usando o programa SISVAR.



**Figura 5.** Parcelas do experimento III.

A tabela 3 mostra as principais características de cada experimento de promoção de crescimento.

**Tabela 3.** Experimentos de promoção de crescimento.

Experimentos	No. isolados	Substrato	No. doses	Épocas inoc.	Coleta (dias)
I	2	Horiz. A	5	2	30
II	7	Horiz. A	2	1	55
III	7	PLANTMAX	2	2	24

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização Morfológica dos Isolados de Rizobactérias

Foram obtidos 127 isolados no total, sendo 17 oriundos do rizoplano de plantas de alface (13,2%), 48 do rizoplano de couve (37,5%), 29 do rizoplano de rúcula (22,5%) e 33 do rizoplano de salsa (26%).

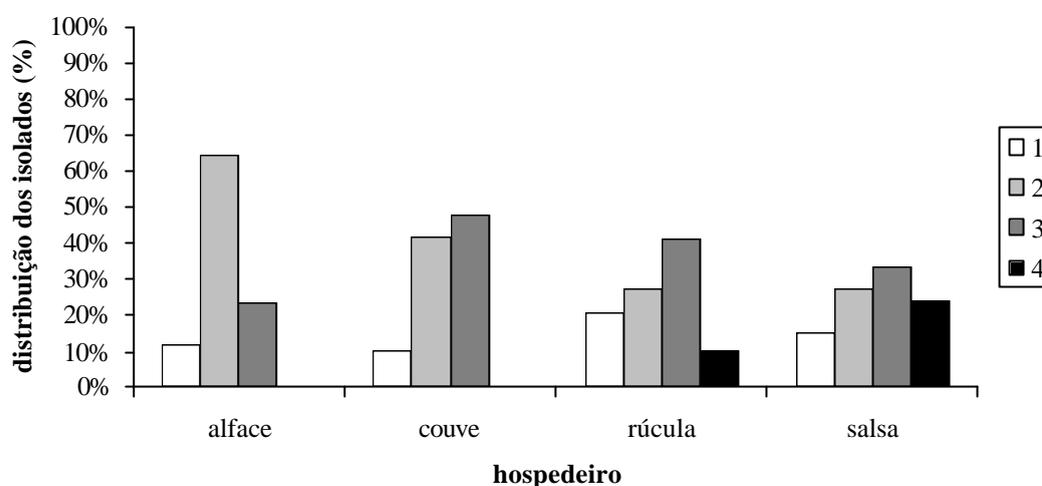
A caracterização morfológica foi realizada após 48 horas de crescimento dos isolados, em meio King B sólido, à temperatura de 28°C. Foram observados os seguintes parâmetros: tamanho das colônias (diâmetro, em milímetros), forma das colônias, borda, aspecto, coloração, transparência, fluorescência e produção de muco. O resultado da caracterização morfológica de todos os isolados é apresentado nas Tabelas 4, 5, 6 e 7 do ANEXO I.

A primeira característica observada foi o tamanho das colônias formadas 48 h após o cultivo em placas contendo meio King B sólido. A forma das colônias também foi avaliada, podendo ser circular ou ovalada. A borda das colônias foi avaliada, podendo ser classificada como lisa ou ondulada. O aspecto das colônias foi classificado como homogêneo, quando a massa formada apresenta-se bem distribuída sobre a placa ou heterogêneo, quando dava a impressão de que havia maior concentração em determinado ponto, geralmente no centro. A coloração das colônias foi classificada entre matizes de amarelo esverdeado, amarelo claro e creme. Em relação à transparência as colônias, estas foram classificadas em opacas, quando não se via o fundo, ou translúcidas, quando se podia visualizar o fundo. A classificação de acordo com a fluorescência da colônia foi classificada em alta, média e baixa. A produção de muco foi observada em todas as colônias, classificada como pouco, médio e muito.

Na Figura 6 é mostrado o parâmetro “tamanho das colônias”, avaliado na caracterização morfológica das colônias dos isolados. O tamanho das colônias após 48 horas de crescimento em KB sólido oscilou entre 1 a 4 mm, ficando a maioria entre 2 e 3 mm.

Dentre os isolados de alface, aproximadamente 65% das colônias apresentaram 2 mm, 23% apresentaram 3 mm e 12% apresentaram 1 mm. Nenhum isolado do rizoplano de alface apresentou 4 mm de diâmetro. Nos isolados de couve, em relação ao tamanho das colônias, 48% apresentaram 3 mm; 42% apresentaram 2 mm e 10% apresentaram 1 mm. Assim como em alface, em couve também nenhum isolado alcançou 4 mm. Os isolados de rúcula apresentaram tamanhos de 1 a 4 mm, na seguinte proporção: 41% com 3 mm; 28% com 2 mm; 21% com 1 mm e 10% com 4 mm. Os isolados de salsa, assim como os de rúcula, também apresentaram tamanho de colônias variando entre 1 a 4 mm, com a seguinte distribuição: 33% com 3 mm; 28% com 2 mm; 24% com 4mm e 15% com 1 mm.

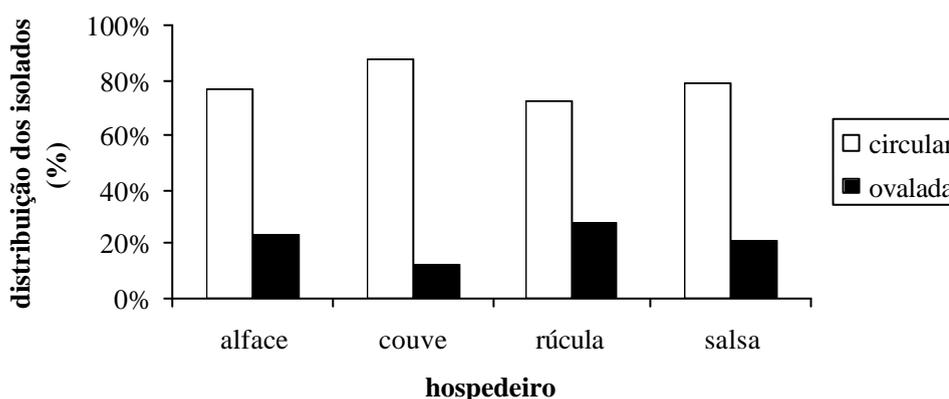
### Tamanho das colônias



**Figura 6.** Distribuição do tamanho das colônias de rizobactérias, em cada espécie hospedeira.

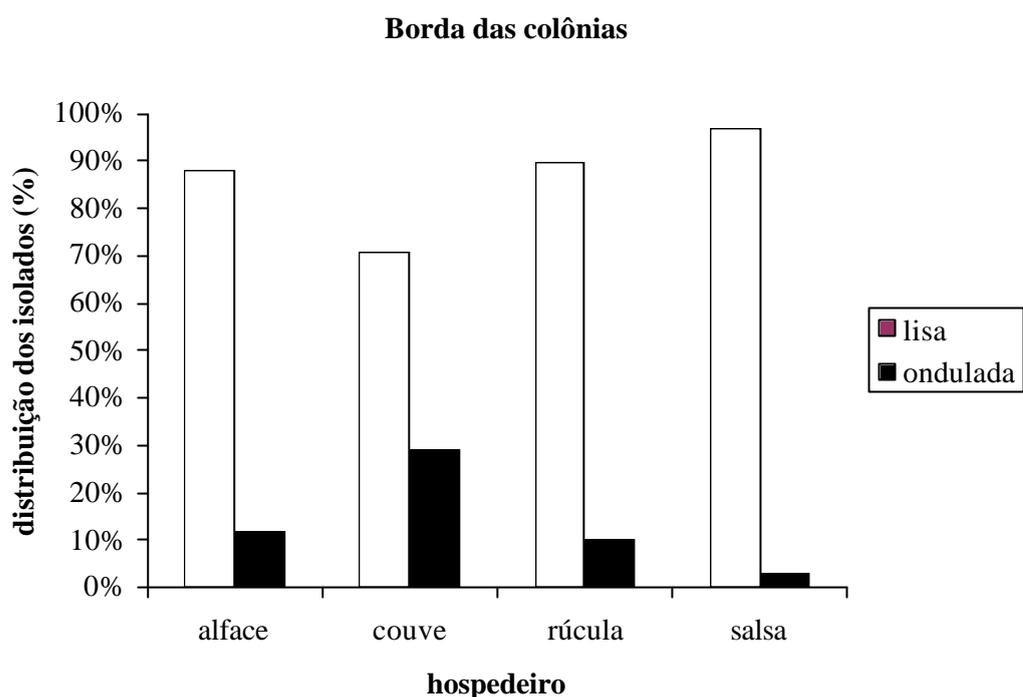
A forma das colônias (Figura 7) foi classificada em circular e ovalada, sendo a maioria circular nos isolados de todas as plantas utilizadas neste trabalho. Nos isolados de couve, 88% das colônias foram circulares e 12%, ovaladas. Entre os isolados de salsa, 79% apresentaram colônias circulares e 21% ovaladas. Em alfaca, 76% das colônias foi circular e 24% foi ovalada. Os isolados de rúcula formaram 72% de colônias circulares e 28% ovaladas.

### Forma das colônias



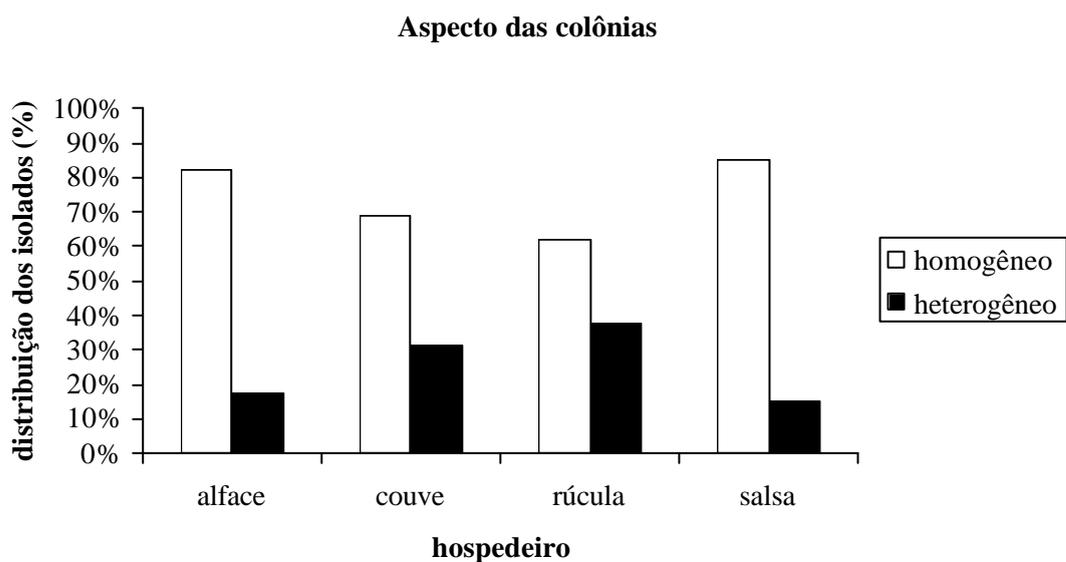
**Figura 7.** Distribuição da forma das colônias de rizobactérias, em cada espécie hospedeira.

A borda das colônias (Figura 8), classificada em lisa ou ondulada, sendo que a maioria dos isolados apresentou borda lisa. Nos isolados de salsa, 97% formaram colônias com bordas lisas e 3% (apenas 1) formaram colônias de bordos ondulados. Nos isolados de rúcula, 90% apresentaram colônias de borda lisa e 10% com borda ondulada. Em alfaca a proporção foi semelhante, com 88% das colônias com borda lisa e 12% com borda ondulada. Os isolados de couve apresentaram 71% de suas colônias com bordos lisos e 29% com bordos ondulados.



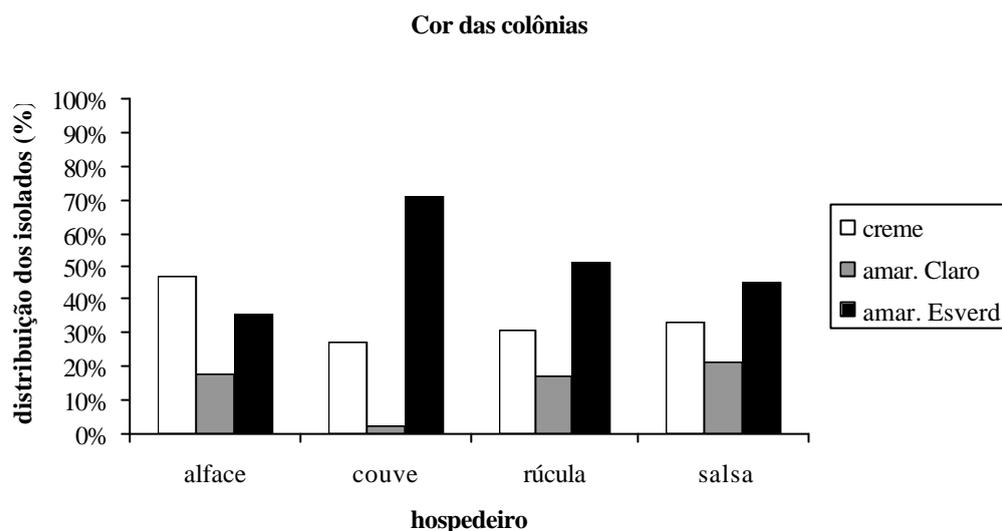
**Figura 8.** Distribuição da borda das colônias dos isolados de rizobactérias em cada espécie hospedeira.

O aspecto das colônias (Figura 9) foi considerado homogêneo ou heterogêneo, sendo a maioria considerada homogênea, com as maiores proporções observadas em isolados de salsa e alfaca, com 85% e 82%, respectivamente, das colônias com aspecto homogêneo. Os isolados de couve apresentaram 69% de colônias homogêneas e 31% heterogêneas e as de rúcula, 62% homogêneas e 38% heterogêneas.



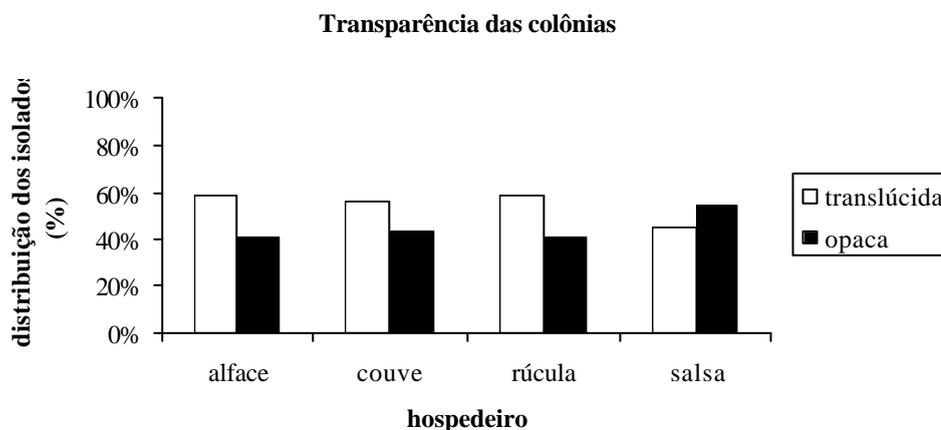
**Figura 9.** Distribuição do aspecto das colônias dos isolados em cada espécie hospedeira.

A coloração das colônias (Figura 10) apresentou tonalidades creme e amarelada, sendo esta última classificada em amarela clara ou amarela esverdeada. A coloração amarela esverdeada foi predominante, com exceção dos isolados do rizoplano de alface, onde predominou a coloração creme, com 47% dos isolados, 35% dos isolados amarelos esverdeados e 18% dos isolados amarelos claros. Em isolados oriundos de couve, 71% formaram colônias de coloração amarela esverdeada, 27% creme e 2% amarelo claro. Os isolados de rúcula e salsa apresentaram distribuição mais homogênea em relação à coloração das colônias, sendo na primeira 52% amarela esverdeada, 31% creme e 17% amarela clara e em salsa, 46% amarela esverdeada, 33% creme e 21% amarela clara.



**Figura 10.** Distribuição da cor das colônias dos isolados em cada espécie hospedeira.

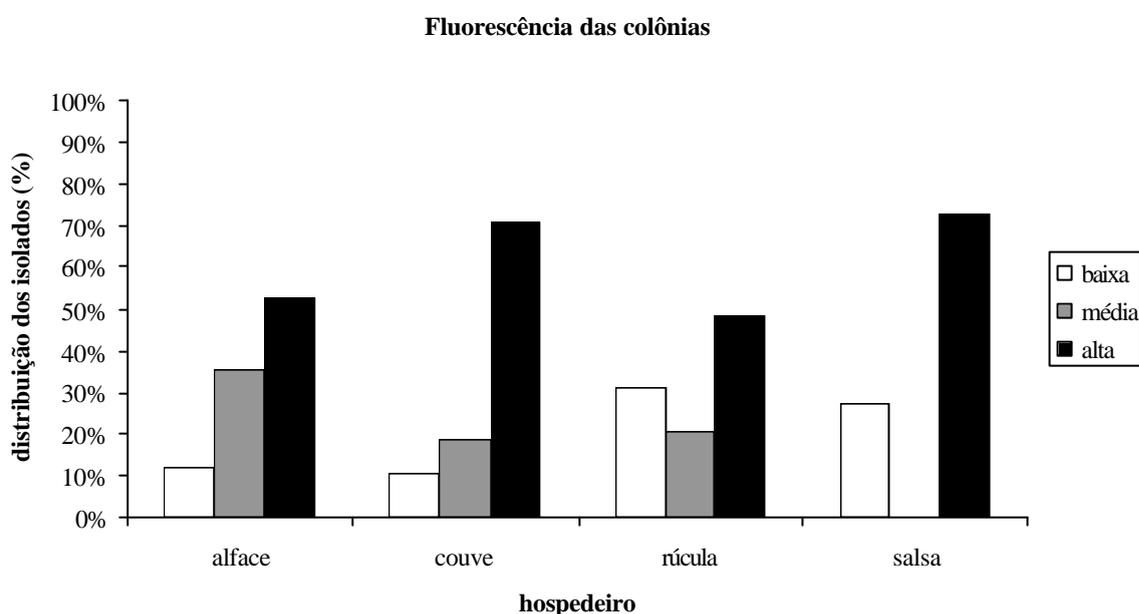
A transparência das colônias (Figura 11) foi classificada como translúcida ou opaca, havendo predominância de colônias translúcidas, com exceção dos isolados de salsa, onde 45% foram translúcidas e 55% foram opacas. Em isolados de alface, 59% formaram colônias translúcidas e 41% opacas; em couve, 56% das colônias foram consideradas translúcidas e 44% opacas e em rúcula o resultado foi igual ao dos isolados de alface.



**Figura 11.** Distribuição da transparência das colônias dos isolados em cada espécie hospedeira.

Na avaliação da fluorescência das colônias foi utilizado o meio de cultura King B modificado para *Pseudomonas*. Portanto, supõe-se que os isolados pertençam ao grupo *Pseudomonas* e se pode constatar que todos os isolados de rizobactérias da coleção produziram colônias com algum grau de fluorescência, pertencendo, então, ao grupo das *Pseudomonas* fluorescentes.

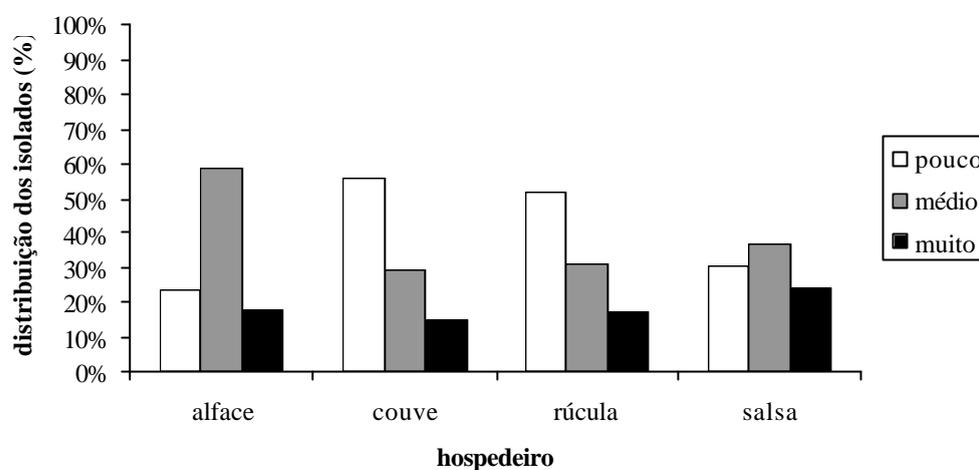
A fluorescência emitida (Figura 12) foi classificada de acordo com a intensidade em baixa, média ou alta. A maioria das colônias formadas apresentou alta fluorescência. Nos isolados oriundos de raízes de salsa, não houve colônias com fluorescência média, sendo 73% alta e 27% baixa. Dentre os isolados do rizoplano de alface, 53% apresentaram alta fluorescência, 35% média e 12% baixa. Em couve, 71% apresentaram alta fluorescência, 19% média e 10% baixa. Em rúcula, 48% dos isolados formaram colônias com alta fluorescência, 31% média e 10% baixa.



**Figura 12.** Distribuição da fluorescência das colônias dos isolados de rizobactérias em cada espécie hospedeira.

A presença de muco (Figura 13) foi observada em todos os isolados e foi classificada como pouco, médio e muito. Em alface, a maioria dos isolados formou colônias com média presença de muco (59%), 23% pouca e 18% muita. Já em couve, a maior parte dos isolados, 56%, formou colônias com pouco muco, 29% médio e 15% muito, assim como os isolados oriundos de rúcula, com 52% com pouco muco, 31% com médio e 17% muito. Em salsa a distribuição dos resultados foi bem homogênea, com 36% com média presença de muco, 30% com pouca e 24% com muito.

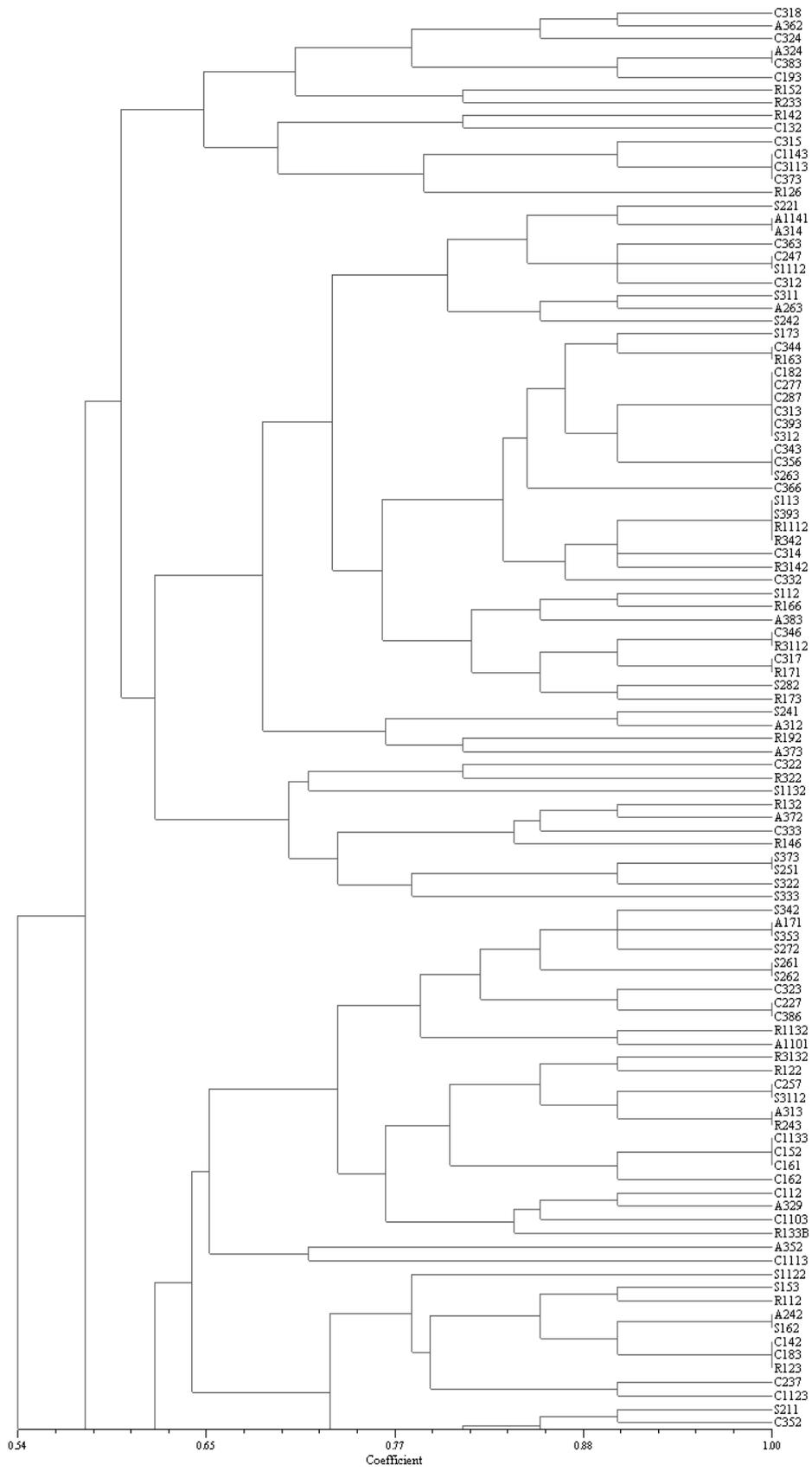
### Muco das colônias



**Figura 13.** Distribuição da presença de muco pelas colônias dos isolados em cada espécie hospedeira.

Os dados obtidos na caracterização morfológica dos isolados foram utilizados na análise de agrupamento, sendo obtido um dendrograma com os grupos formados (Figura 14) e havendo a formação de 97 grupos morfológicos (Tabela 8, ANEXO II).

Legenda da figura 14???????????



Pode-se observar a formação de dois grandes agrupamentos distintos; o primeiro vai do grupo 1 ao 50 (Agrupamento A: 69 isolados) e o segundo do grupo 51 ao 97 (Agrupamento B: 58 isolados). Na formação destes agrupamentos, foram determinantes as seguintes características morfológicas: tamanho, cor, transparência e presença de muco. A distribuição destas características foi diferente no agrupamento A e B (Tabela 9).

De acordo com ZAGO et al., 2000, o gênero *Pseudomonas* é um dos mais complexos dentre as bactérias gram-negativas, devido à similaridades fenotípicas com outros gêneros, além de sua grande diversidade fenotípica e genotípica. Os resultados encontrados na caracterização morfológica refletem a alta diversidade fenotípica da coleção em estudo.

**Tabela 9.** Distribuição das características morfológicas mais relevantes em nos agrupamentos A e B.

	<b>Agrupamento A</b>	<b>Agrupamento B</b>
<b>Tamanho</b>		
1	22%	3%
2	39%	38%
3	30%	50%
4	9%	9%
<b>Cor</b>		
amarelo claro	17%	10%
amarelo esverdeado	70%	31%
creme	13%	59%
<b>Transparência</b>		
opaca	7%	88%
translúcida	93%	12%
<b>Muco</b>		
pouco	68%	21%
médio	29%	45%
muito	3%	34%

No agrupamento A, mais da metade das colônias dos isolados tem 2 ou 3 mm, é amarela esverdeada, translúcida e possui pouco muco. Assim como no agrupamento A, no agrupamento B, mais da metade das colônias formadas pelos isolados apresentou 2 ou 3 mm, porém a predominância foi de colônias de cor creme, opacas e com pouca ou média presença de muco.

#### **4.2 Produção de AHL (Acil Homoserinas Lactonas)**

Foram realizadas duas tentativas com a finalidade de ajustar a metodologia às condições do laboratório, antes de se obter resultado positivo, pois o teste ainda não havia sido realizado no Laboratório de Ecologia Microbiana.

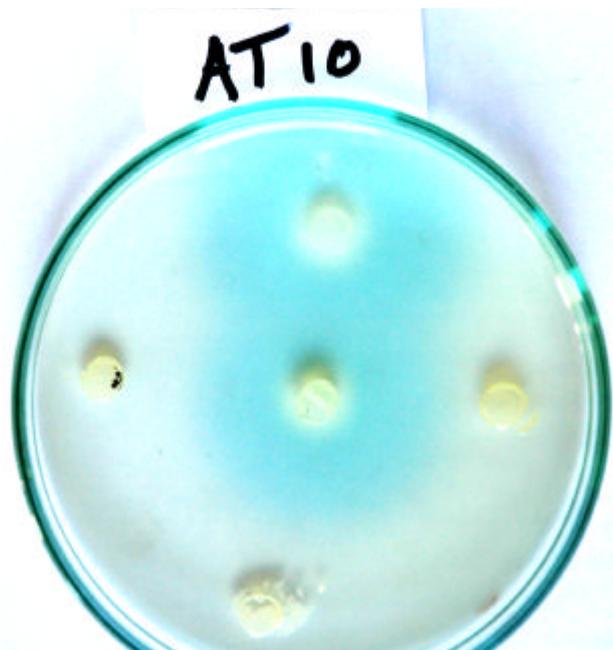
Na primeira tentativa, as estirpes de rizobactérias foram cultivadas em meio KB líquido e em meio TY líquido. A bactéria repórter foi cultivada simultaneamente em meio TY semi-sólido e incubada a 28 °C no escuro (placas envolvidas por papel laminado). Após 24 horas uma alíquota de 2 microlitros foram retiradas dos meios líquidos contendo rizobactérias

e colocadas sobre o meio semi-sólido contendo a bactéria repórter.

Na segunda tentativa, as rizobactérias foram cultivadas em meio KB sólido e a bactéria repórter em meio TY semi-sólido, também ao mesmo tempo. Após 24 horas, pequenos fragmentos circulares contendo rizobactérias foram retirados do meio KB sólido e colocados sobre o meio TY com a bactéria repórter.

Na terceira tentativa, as rizobactérias foram cultivadas em meio KB sólido, entretanto, antes da bactéria repórter, que foi cultivada em meio TY semi-sólido, em 4 repetições, a saber: a primeira 36 horas antes, a segunda 24 horas antes, a terceira 12 horas antes e a quarta simultaneamente. Foram retirados fragmentos circulares do meio contendo rizobactérias e estes foram colocados sobre o meio contendo *Agrobacterium tumefaciens* repórter. Após 24 horas foi possível observar resultado positivo em um isolado de rizobactéria, A242, oriunda do rizoplano de alface, quando cultivada entre 12 a 36 horas antes da bactéria repórter, sendo o resultado mais expressivo (coloração mais intensa) quando se cultivou 24 horas antes. A bactéria A242 foi utilizada como controle positivo nos testes subsequentes.

A coleção de rizobactérias do Laboratório de Ecologia Microbiana utilizada neste trabalho possui 127 isolados e 112 foram utilizados no ensaio para verificar a produção de AHL. Destes 112 isolados, 14 (12,5%) foram positivos para produção de AHL. O resultado positivo foi observado devido a formação de halo azul no meio de cultura TY contendo *Agrobacterium tumefaciens* repórter ao redor do fragmento contendo o isolado de rizobactérias (Figura 15).



**Figura 15.** Resposta positiva à produção de AHL. Formação de halo azulado ao redor do fragmento central e do fragmento logo acima deste.

A classificação de cada isolado quanto à produção de AHL pode ser observada na Tabela 10, no ANEXO III.

Os resultados da avaliação da produção de AHL com a utilização do sistema *Agrobacterium tumefaciens* repórter são apresentados na tabela a seguir (Tabela 11):

**Tabela 11.** Produção do auto-indutor AHL (acil homoserina lactona) por isolados de rizobactérias de raízes de hortaliças.

Planta de origem	No. de isolados testados	No. de isolados que produziram AHL	Porcentagem por planta
Alface	17	5	30%
Couve	44	2	4,5%
Rúcula	27	4	15%
Salsa	24	3	12,5%
TOTAL	112	14	12,5%

Dentre os 17 isolados de raízes de alface, 30% foram positivos quanto à produção de AHL, em ensaio com a bactéria indicadora *A. tumefaciens* repórter. Dentre os 44 isolados provenientes do rizoplano de plantas de couve, 4,5% foram positivos para a produção de AHL em ensaio com *A. tumefaciens* repórter. Dos 27 isolados de rizobactérias de plantas de rúcula, 15% foram positivos para a produção de AHL em ensaio com a bactéria repórter *A. tumefaciens*. Foram testados 24 isolados provenientes do rizoplano de salsa e 12,5% foram positivos.

Neste estudo, dentre 112 isolados testados, 14 apresentaram produção de AHL, representando aproximadamente 12,5% do total. Em um estudo realizado na antiga União Soviética, onde foram testadas 300 isolados de bactérias do solo e associadas a plantas, VESELOVA et al. (2003) encontraram 17% destas capazes de produzir AHL quando testadas com o sistema repórter *Agrobacterium tumefaciens*. KAMILOVA et al. (2005) testaram 5 isolados de rizobactérias promotoras de crescimento, utilizando o sistema repórter *Agrobacterium tumefaciens*, e apenas uma foi positiva, ou seja, 20% dos isolados testados.

No trabalho de SESSITSCH et al. (2005) foi recuperado um isolado de raízes esterilizadas de cebola e constatou-se que o mesmo era extremamente eficiente na colonização de raízes, além de apresentar alta capacidade de biocontrole e de promoção de crescimento. Quando testado com a bactéria repórter *Agrobacterium tumefaciens*, este isolado foi positivo para a produção de AHL. BLOEMBERG & LUGTENBERG (2001) relatam que estirpes mutantes de *Pseudomonas fluorescens* que produzem níveis reduzidos de AHL produziram menores quantidades de metabólitos anti-fúngicos.

Não há métodos *in vitro* que identifiquem rizobactérias promotoras de crescimento rapidamente (HAAS & DÉFAGO, 2005). Desta maneira, a produção de AHL pode ser um parâmetro para a seleção *in vitro* de RPCPs. Porém, segundo os mesmos autores, existem microrganismos que produzem substâncias que degradam as acil homoserinas lactonas, o que pode reduzir a eficiência de RPCPs que atuam via sistema de “quorum sensing”.

### 4.3. Formação de Biofilmes

Foram testados 91 isolados para avaliar a capacidade de formar biofilme quando cultivados em meio King B líquido, sendo 14 isolados oriundos do rizoplano de Alface, 23 de Couve, 23 de Rúcula e 31 de Salsa. O total de isolados da coleção foi de 127 e 91 foram testados, então aproximadamente 72% foram utilizados no ensaio para verificar a capacidade de formação de biofilme.

Do total de 91 isolados testados, 88 foram capazes de formar biofilme, ou seja, aproximadamente 95%. A classificação de cada isolado quanto à formação de biofilme pode

ser observada na Tabela 12, no ANEXO IV.

Dentro de cada espécie vegetal a distribuição ficou assim: 93% dos isolados de Alface, 91% de Couve, 95% de Rúcula e 100% de Salsa foram capazes de formar biofilme (Tabela 13).

**Tabela 13.** Capacidade de formação de biofilme de isolados de rizobactérias de hortaliças.

<b>Planta hospedeira</b>	<b>No. de isolados testados</b>	<b>No. de isolados que formaram Biofilme</b>	<b>Porcentagem por planta</b>
Alface	14	13	93%
Couve	23	21	91%
Rúcula	23	22	95%
Salsa	31	31	100%
<b>TOTAL</b>	<b>91</b>	<b>88</b>	<b>95%</b>

Mais de 90% dos isolados avaliados foram capazes de formar biofilme quando cultivado em meio King B líquido. O resultado encontrado está muito próximo do encontrado por VAN HOUDT et al. (2004), ainda que estes tenham utilizado metodologia distinta, pois estes autores testaram 68 isolados de bactérias gram-negativas obtidos de equipamentos e superfícies de trabalho de uma linha de processamento de vegetais, e todos foram capazes de produzir biofilme.

Os autores supracitados não encontraram correlação entre a capacidade de formação de biofilme e a produção de AHL. Entretanto, STICKLER et al. (1998) relatam que ao testar seções de 9 catéteres urinários com formação de biofilme retirados de pacientes, em 4 se encontrou produção de AHL, concluindo que AHLs são produzidos por biofilmes que se desenvolvem em catéteres. Biofilmes, entretanto, podem abrigar várias espécies de bactérias (SOUZA, 2002).

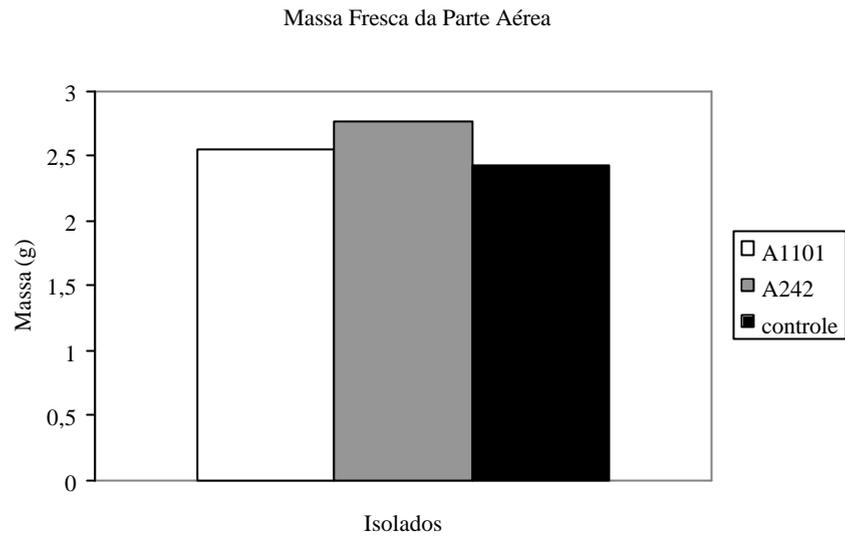
Os biofilmes bacterianos são produzidos por vários microrganismos e propiciam melhores condições para que os mesmos se estabeleçam, sendo uma característica importante, devido às possíveis aplicações dos biofilmes, como na biorremediação. DUTTA et al. (2005), utilizaram bactérias produtoras de biofilmes para tratar um lençol freático contaminado por nitrato e a concentração deste foi reduzida de 275 mg/l para menos de 1 mg/l.

#### **4.4 Capacidade de Promoção de Crescimento em Couve**

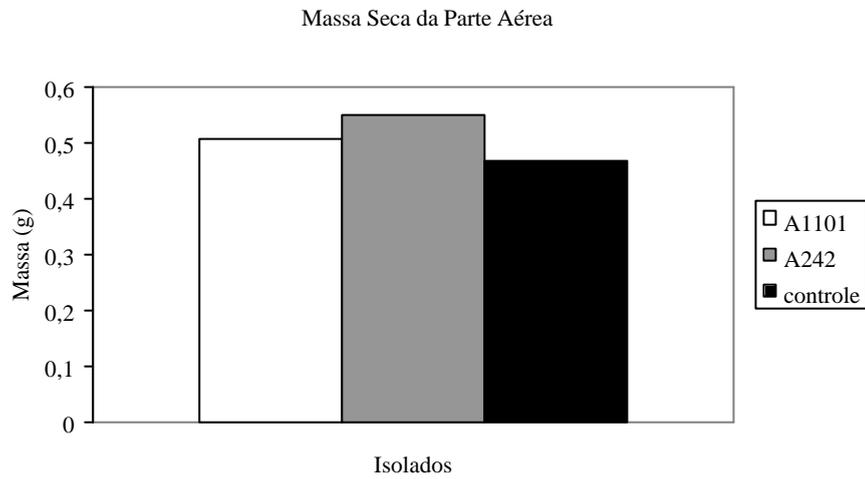
##### **4.4.1 Experimento I**

Para avaliação da capacidade de promover crescimento em plantas de couve foi conduzido um experimento utilizando-se dois isolados de bactérias distintas quanto à formação de biofilme e produção de AHL (uma negativa: A1101, e outra positiva: A242, para estes parâmetros), com quatro maneiras diferentes de se proceder à inoculação e com cinco diferentes concentrações de inoculo.

Os parâmetros avaliados nas plantas foram: massa fresca da parte aérea, em gramas; massa seca da parte aérea, em gramas e massa seca das raízes, em gramas. Foi realizada análise de variância através do programa SISVAR e teste de Scott-Knott, para verificar se os resultados obtidos são significativos. Não foram encontradas diferenças significativas entre as bactérias (Figuras 16, 17 e 18) e as doses, entretanto houve diferença em relação à época de inoculação, sendo a inoculação aos 12 dias após o plantio aquela que apresentou os melhores resultados. **Tirar linhas das fig 16, 17 e 18.**



**Figura 16.** Média de massa fresca da parte aérea em função do isolado inoculado.



**Figura 17.** Média de massa seca da parte aérea em função do isolado inoculado.



**Figura 18.** Média de massa seca de raízes em função do isolado inoculado.

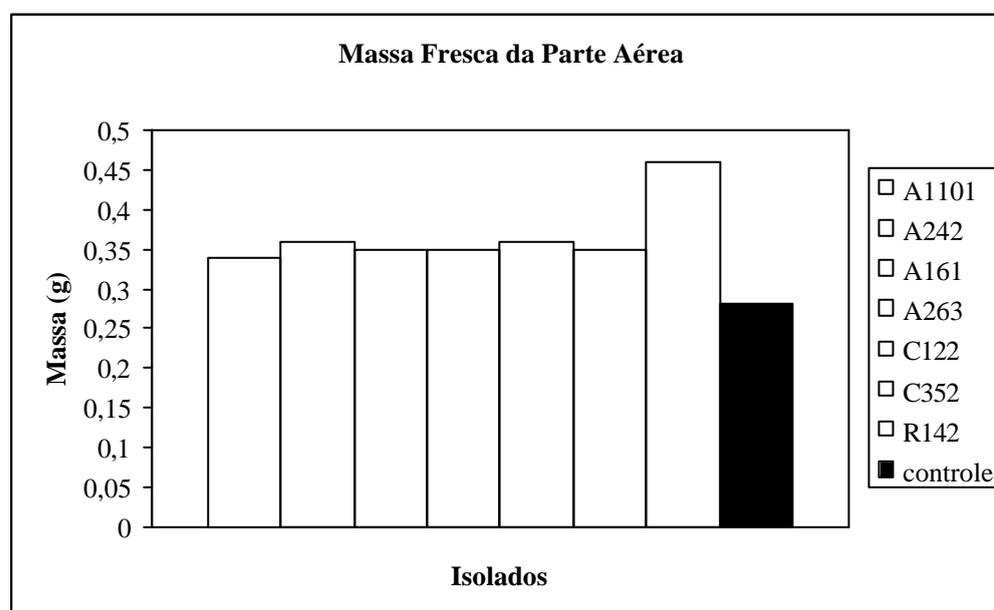
Algumas considerações podem ser feitas a respeito dos resultados. Primeiramente, e possível que o número de isolados utilizados (dois) tenha sido insuficiente, visto que SOTTERO et al. (2006) avaliaram 64 isolados de *Pseudomonas* sp., e apenas 12 (18%) promoveram crescimento em plantas. A quantidade de inoculo pode ter sido insuficiente, pois as bactérias inoculadas passam por processos de competição com aquelas já presentes no solo. SOTTERO et al. (2006) e PEROTTI et al. (2005) usaram maiores quantidades e concentrações em seus estudos. Estes últimos autores relatam ainda que a sobrevivência das rizobactérias por eles estudadas foi mais baixa em solos com menores teores de matéria orgânica, sendo este outro fator a se considerar para a inoculação.

Este primeiro experimento, apesar de não ter apresentado diferenças entre bactérias, forneceu subsídios para o planejamento dos experimentos seguintes, principalmente no que diz respeito à época de inoculação, visto que, com a metodologia utilizada, a inoculação nas sementes não foi eficiente. Nos experimentos subseqüentes não foi realizada inoculação nas sementes, mas sim após a emergência, quando já havia a presença de raízes a serem colonizadas pelas rizobactérias.

#### 4.4.2 Experimento II

Em relação à massa fresca da parte aérea, a análise de variância (teste F) não revelou diferença significativa entre os tratamentos, entretanto no teste de Tukey, a bactéria 7 (R142) diferiu significativamente do controle (Figura 19), podendo-se constatar diferença visual através da Figura 20, onde se mostram plantas inoculadas com a bactéria R142 e plantas controle. As plantas inoculadas com a bactéria R142 tiveram aumento de cerca de 40% na massa fresca da parte aérea.

O referido teste não apontou diferença entre as doses e para a interação entre bactéria e dose, para o parâmetro em questão.



**Figura 19.** Média de massa fresca da parte aérea em função dos isolados inoculados.



**Figura 20.** Da esquerda para a direita: As três primeiras foram inoculadas com o isolado R142, e as demais não foram inoculadas (controle).

No presente estudo, dentre as 7 rizobactérias utilizadas, a R142 promoveu aumento de cerca de 40% na massa fresca da parte aérea. SOTTERO et al. (2006) realizaram experimento em casa de vegetação utilizando 64 rizobactérias, 9 promoveram aumento no número de folhas em alface, também correspondendo a 14% do total. Num experimento em casa de vegetação, SIDDIQUI & SHAUKAT (2002) inocularam tomateiros com mistura de rizobactérias e encontraram maior massa fresca de parte aérea nas plantas que receberam o inoculo em comparação ao controle.

Quanto à massa seca da parte aérea, a análise de variância e o teste de Tukey a 5% não revelaram diferença significativa entre as bactérias, entre as doses e entre a interação das mesmas. CARVALHO et al. (2005) comentam que a falta de homogeneidade dos dados, devido a diferentes condições experimentais é comum e pode ser um empecilho na seleção de rizobactérias promotoras de crescimento. Entretanto, neste experimento obteve-se diferença significativa entre bactérias para os demais parâmetros, sendo a estirpe R142 mais eficiente em promover aumento na massa fresca da parte aérea e na massa seca das raízes (Figura 21).

Em experimento com mudas de abacaxi, MELLO et al. (2002) inocularam diferentes misturas de bactérias e obtiveram diferença significativa em relação à massa seca da parte aérea. No presente estudo as estirpes foram inoculadas separadamente, pois se queria saber o efeito de cada uma isoladamente. No trabalho de MELLO et al. (2002) já se conhecia o efeito de cada estirpe e a compatibilidade entre as mesmas.

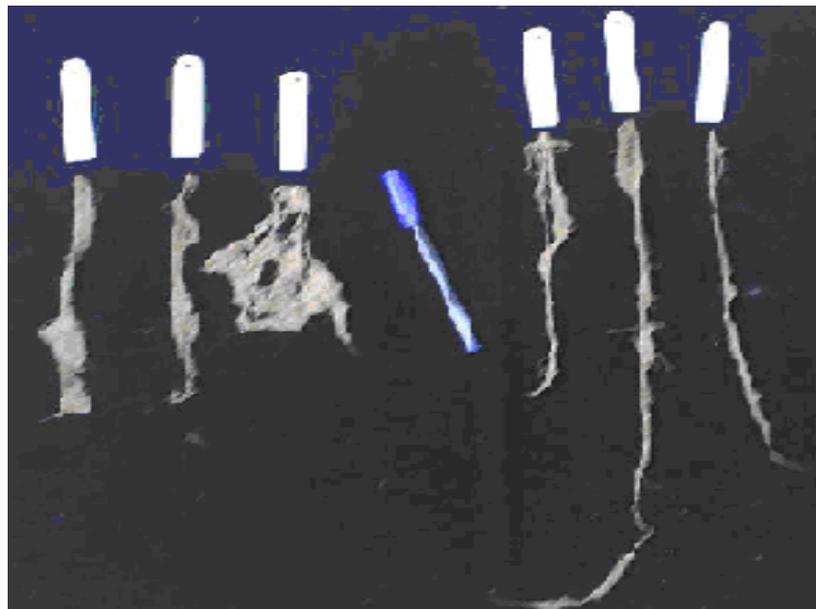
A análise de variância revelou diferença significativa entre as bactérias em relação à massa seca das raízes. No teste de Tukey a 5% houve diferença entre as médias das bactérias, sendo a 7 (R142) a que apresentou o maior valor e houve interação entre esta bactéria e a dose 1 (10<sup>9</sup>), sendo sua média maior quando utilizada esta dose.



**Figura 21.** Média de massa seca de raízes em função do isolado inoculado.

No trabalho de SOTTERO et al. (2006), dos 64 isolados avaliados, 4 promoveram aumento de massa seca em raízes de plântulas de alface. Um melhor desenvolvimento do sistema radicular também foi obtido por GAMALERO et al. (2004), que inocularam plântulas de tomateiro com 2 estirpes de rizobactérias do gênero *Pseudomonas* e o fungo micorrízico *Glomus mossae*. Estes autores encontraram maior desenvolvimento das raízes tanto quando os microrganismos foram inoculados juntos como isoladamente.

A Figura 22 revela a diferença visual entre as plantas inoculadas com a bactéria R142 e o controle.



**Figura 22.** Da esquerda para a direita: As 3 primeiras são raízes de plantas inoculadas com a bactéria R142 e as demais, não receberam inoculo, sendo o controle.

Além de maior massa seca, a arquitetura do sistema radicular das plantas inoculadas com a bactéria R142 ficou diferente das plantas controle. As plantas inoculadas apresentaram sistema radicular mais alargado e as plantas controle, mais comprido. Em hortaliças é interessante que as raízes se espalhem mais horizontalmente, pois os canteiros são pouco profundos e os nutrientes oriundos da adubação tendem a se concentrar nos primeiros 10 a 15 cm do solo.

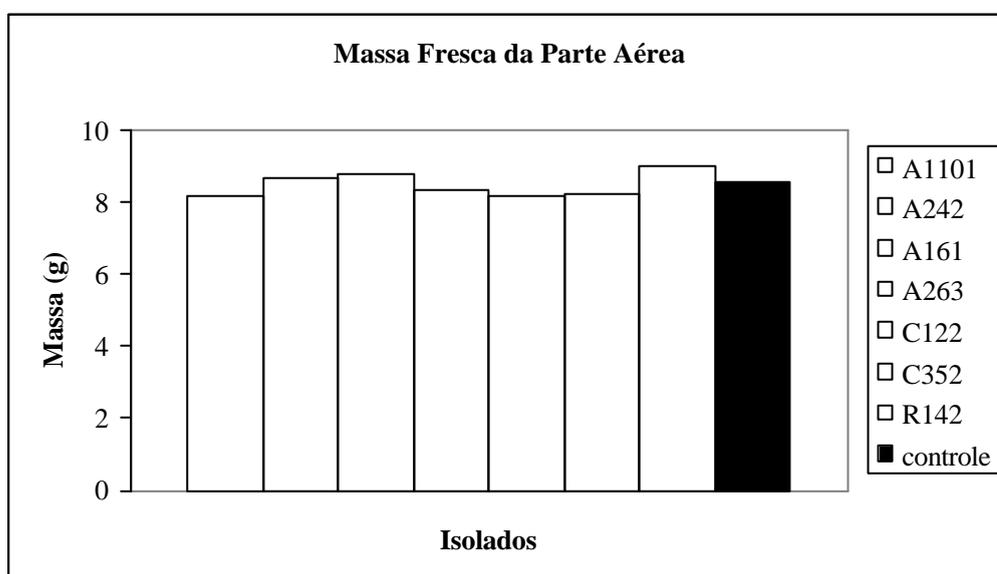
No presente experimento o aumento de massa seca nas raízes das plantas inoculadas com a bactéria R142 foi de cerca de 55% em relação às plantas do controle. Foram testadas 7 isolados de rizobactérias e 2 doses de inoculo e a maior dose foi significativamente mais eficiente em promover aumento de massa seca das raízes do que a dose menor (Tabela 14).

**Tabela 14.** Resultado do teste de Tukey a 5% para massa seca das raízes, em gramas, em função da dose de inoculo utilizada, no experimento II.

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
10 7 ufc/ml	0,33	b
10 9 ufc/ml	0,55	a

#### 4.4.3 Experimento III

Para a massa fresca da parte aérea, a análise estatística não revelou diferença significativa entre as bactérias (Figura 23). Entretanto, ocorreu interação entre bactéria e época de inoculação. A bactéria R142, inoculada no sexto dia após o plantio, entre dose e época; dose 10 9 aplicada no sexto dia após o plantio, e entre bactéria, dose e época; bactéria R142, dose 10 9, no sexto dia após o plantio.



**Figura 23.** Médias de massa fresca da parte aérea em função do isolado inoculado.

Este experimento foi conduzido em bandejas com substrato comercial PLANTMAX (EUCATEX) e foi coletado aos 24 dias após o plantio, enquanto o experimento II foi coletado aos 55 dias após o plantio. Por ter sido coletado mais cedo, pode não ter havido tempo

suficiente para que os efeitos da interação planta-bactéria pudessem ser perceptíveis em relação ao ganho de massa. O incremento ao crescimento não ocorreu, mas também não houve depleção, como encontrado por CARVALHO et al. (2005), quando aplicaram filtrados de rizobactérias em cafeeiros.

Apesar da coleta mais precoce, já se nota interação entre dose e bactéria (Tabela 15), época de inoculação e bactéria e entre bactéria, época e dose. Destaca-se mais uma vez a estirpe R142, a inoculação ao sexto dia após o plantio e a dose 10<sup>9</sup> (maior). No experimento I a inoculação nas plântulas foi melhor do que nas sementes e neste experimento (III), a inoculação ao sexto dia foi melhor do que ao décimo segundo dia após o plantio.

**Tabela 15.** Resultado do teste de Tukey a 5% para o desdobramento de dose dentro de bactéria. A tabela mostra a interação entre a bactéria 7 (R142) e a dose 10<sup>9</sup> ufc/ml, no experimento III.

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
10 <sup>7</sup> ufc/ml	7,99	b
10 <sup>9</sup> ufc/ml	9,99	a

Pode-se concluir que quando a inoculação é feita nas sementes, as rizobactérias têm menos chances de sobrevivência, visto que vivem em associação com as raízes das plantas. Entretanto, quando inoculadas mais tarde pode haver competição com rizobactérias que já estavam presentes no substrato.

Quanto à massa seca da parte aérea, não houve diferença significativa entre as bactérias, porém houve entre as doses, sendo a dose 10<sup>9</sup> melhor do que a 10<sup>7</sup> (Tabela 16), entre as épocas (6<sup>o</sup> dia melhor que 12<sup>o</sup>) e ocorreram interações entre dose e bactéria (dose 10<sup>9</sup> e bactéria R142) e entre bactéria e época (bactéria A242, inoculada no 6<sup>o</sup> dia).

**Tabela 16.** Resultado do teste de Tukey a 5% para as médias de massa seca da parte aérea em relação às doses de inoculo, no experimento III.

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
10 <sup>7</sup> ufc/ml	1,18	b
10 <sup>9</sup> ufc/ml	1,24	a

Alguns autores consultados (SIDDIQUI & SHAUKAT, 2002; SOTTERO et al., 2006) utilizaram inoculo com concentração de 10<sup>8</sup> e obtiveram resultados satisfatórios. Aqui foram testadas 2 doses, 10<sup>9</sup> e 10<sup>7</sup>, e a dose maior parece ser mais eficiente, além de não causar danos às plantas.

A bactéria R142 foi mais eficiente na maior dose para o parâmetro em questão.

A inoculação ao 6<sup>o</sup> dia também foi melhor para o parâmetro massa seca de parte aérea (Tabela 17), possivelmente pelos motivos anteriormente comentados.

**Tabela 17.** Resultado do teste de Tukey a 5% para as médias em relação às épocas de inoculação, no experimento III.

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
12 <sup>o</sup> dia	1,16	b
6 <sup>o</sup> dia	1,26	a

Outra bactéria se destaca, o isolado A242, oriundo do rizoplano de alface, foi mais eficiente quando inoculado ao 6º dia após o plantio. Este isolado foi o primeiro positivo encontrado para a produção de AHL, tendo sido utilizado como controle positivo nos testes com *Agrobacterium tumefaciens* repórter. Isto significa que este isolado possui sistema de “quorum sensing”, o que pode lhe conferir vantagem na competição com outras bactérias.

Em relação à massa seca das raízes, não houve diferença entre as bactérias, entretanto ocorreu interação entre bactéria e dose (bactéria A161 e dose 10<sup>9</sup>) e entre bactéria e época (bactéria A161, no 6º dia após o plantio).

A dose 10<sup>9</sup> e a inoculação ao 6º dia novamente se destacam e um outro isolado, oriundo do rizoplano de alface interagiu positivamente com a dose e a época de inoculação, para o parâmetro massa seca de raízes.

A coleção de rizobactérias de onde vieram os isolados utilizados nos experimentos foi montada em agosto de 2005 e pouco se sabia sobre os mesmos. Grande parte deste trabalho foi dedicada a se obter informações sobre os isolados, através de sua caracterização morfológica e acerca das melhores condições para a inoculação e o estabelecimento dos mesmos. A concentração e quantidade de inóculo, bem como a melhor época para inoculação era desconhecida. Portanto, foram testados poucos isolados para promoção de crescimento em relação ao número total da coleção, porém a maioria foi testada quanto à produção de AHL e formação de biofilme.

A produção de AHL foi uma característica pouco encontrada com o sistema repórter utilizado, pois uma pequena percentagem dos isolados testados apresentou resultado positivo. Dentre os isolados utilizados nos experimentos de promoção de crescimento, dois apresentaram produção de AHL quando testados com o sistema repórter *Agrobacterium tumefaciens*, a bactéria 2 (A242) e a 4 (A263). Devido à pequena quantidade de isolados testados nos experimentos de promoção de crescimento, não se pode afirmar ou negar que haja correlação entre estas características.

Em relação à formação de biofilme, esta parece ser uma característica amplamente disseminada entre as rizobactérias, visto que a grande maioria dos isolados foi positiva neste quesito e por isso, com a metodologia utilizada não foi possível estabelecer correlação entre esta característica e a promoção de crescimento. Talvez uma metodologia que permita a quantificação do biofilme formada aliada a um experimento mais direcionado em casa de vegetação possa fornecer respostas mais objetivas.

Quanto à promoção de crescimento, pode-se concluir que a inoculação deve ser realizada na planta jovem, mas não nas sementes, visto que as rizobactérias necessitam da presença de raízes para seu estabelecimento no meio. A dose mais alta parece ser mais eficiente e algumas bactérias se destacaram, porém a bactéria 7 (R142), isolada do rizoplano de rúcula, parece ser mais promissora, visto que promoveu maior ganho de massa seca em raízes no experimento II.

## 5 CONCLUSÕES

A coleção de rizobactérias obtida apresenta uma grande diversidade, devido aos resultados encontrados na caracterização morfológica, o que corresponde às características do grupo *Pseudomonas*.

A grande maioria dos isolados foi capaz de produzir biofilme, sendo esta, então, uma característica comum desta coleção.

A produção de AHL ocorreu como uma característica mais rara do que a produção de biofilme, sendo encontrada em apenas 17% dos isolados avaliados. Entretanto, isto não significa necessariamente que os isolados negativos não possuam sistema de “quorum sensing”, pois existem outros auto-indutores que são detectados por metodologias diferentes da empregada neste estudo.

A dose de inoculo  $10^9$  ufc/ml foi mais eficiente na promoção de crescimento de couve, bem como a inoculação das plântulas de couve ao 6<sup>o</sup> dia após o plantio.

O isolado R142, oriundo do rizoplano de rúcula, apesar de ser negativo para a produção de AHL, promoveu aumento de 40% na massa fresca e 55% na massa seca de raízes de couve, indicando a possibilidade de apresentar outros mecanismos de “quorum sensing”, visto que foi capaz de formar biofilme.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTIERI, M. A. Sustainable agricultural development in Latin America: exploring the possibilities. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, n. 39, p. 1-21, 1992.
- ANDERSEN, J. B.; KOCH, B.; NIELSEN, T. H.; SORENSEN, D.; HANSEN, M.; NYBROE, O; CHRISTOPHERSEN, C.; SORENSEN, J.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M. Surface motility in *Pseudomonas* sp. DSS73 is required for efficient biological containment of the root-pathogenic microfungi *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora ultimum*. **Microbiology**, v. 149, p. 37-46, 2003.
- BARKIN, D. Overcoming the Neoliberal Paradigm: Sustainable Popular Development. **Latin America Studies Association**, México, April 17-19, 1992.
- BASSLER, B. L.; GREENBERG, E. P.; STEVENS, A. M. Cross species induction of luminescence in the quorum sensing bacterium *Vibrio harveyi*. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 12, p. 4043-4045, 1997.
- BETANCOURTH, M.; BOTERO, J. E.; RIVERA, S. P. Biopelículas: una comunidad microscópica en desarrollo. **Revista Colombia Médica**, v. 35, n. 3, Suppl. 1, p. 34-39, 2004.
- BIBB, M. Colworth Prize Lecture. The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Microbiology**, v. 142, p. 1335-1344, 1996.
- BLOEMBERG, G. V.; LUGTENBERG, B. J. J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by Rhizobacteria. **Current Opin. Plant Biol.**, v. 4, p. 343-350, 2001.
- CAMILLI, A.; BASSLER, B. L. Bacterial Small-Molecule Signaling Pathways. **Science**, v. 311, no. 5764, p. 1113-1116, 2006.
- CARVALHO, G. A.; ABREU, M. S.; OLIVEIRA, D. F.; RESENDE, M. L. V.; ABREU, M. F. E. Efeito *In Vitro* e *In Vivo* de Filtrados de Rizobactérias sobre *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. do Cafeeiro. **Ciência Agrotécnica**, v. 29, no. 3, p. 553-561, 2005.
- COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**. v.284, p. 1318-1322, 1999.
- DANHORN, T.; HENTZER, M.; GIVSKOV, M.; PARSEK, M. R.; FUQUA, C. Phosphorus limitation enhances biofilm formation of the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens* through the PhoR-PhoB regulatory system. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 14, p. 4492-4501, 2004.
- DUNLAP, P. V.; GREENBERG, E. P. Control of *Vibrio fischeri* lux gene transcription by a cyclic AMP receptor protein-luxR protein regulatory circuit. **Journal of Bacteriology**, v. 170 (9), p. 4040-4046, 1988.
- DUTTA, L.; NUTTALL, H. E.; CUNNINGHAM, A.; JAMES, G.; HIEBERT, R. *In situ* biofilm barriers: Case study of a nitrate groundwater plume, Albuquerque, New Mexico.

**Remediation Journal**, v. 15, i. 4, p. 101-111, 2005.

EBERHARD, A. Inhibition and activation of bacterial luciferase synthesis. **Journal of Bacteriology**, v. 109, p. 1101-1105, 1972.

FUQUA, C.; WINANS, S. C. A. LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. **Journal of Bacteriology**, v. 176 (10), p. 2796-2806, 1994.

FUQUA, C.; WINANS, S. C.; GREENBERG, E. P. Census and consensus in bacterial ecosystems: The LuxR-LuxI family of quorum sensing transcriptional regulators. **Annual Review of Microbiology**, v. 50, p. 727-751, 1996.

GAMALERO, E.; TROTTA, A.; MASSA, N.; COPETTA, A.; MARTINOTTI, M. G.; BERTA, G. Impact of two fluorescent pseudomonads and an arbuscular mycorrhizal fungus on tomato plant growth, root architecture and P acquisition. **Mycorrhiza**, v. 14, no. 3, p. 185-192, 2004.

GAMBELLO, M. J.; IGLEWSKI, B. H. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* lasR gene: a transcriptional activator of elastase expression. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 3000-3009, 1991.

GELATS, F. L. i. A discursive approach to agricultural and rural policy in Europe. **3rd Global Conference – Environmental Justice & Global Citizenship**. Copenhagen, Denmark, February 12-14, 2004.

GLIESSMAN, S. R. **Agroecologia: Processos ecológicos em agricultura sustentável**. Ed. Universidade, Porto Alegre, 2<sup>a</sup> ed, 656 p., 2001.

HAAS, D.; DÉFAGO, G. Biological Control of Soil-Borne Pathogens by Fluorescent Pseudomonads. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 307-319, 2005.

HOGARDT, M.; FOEDER, M.; SCHREFF, A. M.; EBERL, L.; HEESEMANN, J. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* exoS is controlled by quorum sensing and RpoS. **Microbiology**, v. 150, p. 843-851, 2004.

JOELSSON, A.; LIU, Z.; ZHU, J. Genetic and Phenotypic Diversity of Quorum-Sensing Systems in Clinical and Environmental Isolates of *Vibrio cholerae*. **Infection and Immunity**, v. 74, no. 2, p. 1141-1147, 2006.

JUHAS, M.; EBERL, L.; TUMMLER, B. Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. **Environmental Microbiology**, v. 7, i. 4, p. 459-471, 2005.

KAMILOVA, F.; VALIDOV, S.; AZAROVA, T.; MULDER, I.; LUGTENBERG, B. Enrichment for enhance competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 7, no. 11, p. 1809-1817, 2005.

KAPLAN, C. W.; KITTS, C. L. Bacterial Succession in a Petroleum Land Treatment Unit. **Applied and Environmental Microbiology**, número???? p. 1777-1786, 2004.

KELLER, L.; SURETTE, M. G. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary

perspective. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, p. 249-258, 2006.

KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 44, p. 301-307, 1954.

KREFT, J. U.; BONHOEFFER, S. The evolution of groups of cooperating bacteria and the growth rate versus yield trade-off. **Microbiology**, v. 151, p. 637-641, 2005.

KLEEREBEZEM, M.; BEERTHUYZEN, M. M.; VAUGHAN, E. E.; VOS, W. M. de; KUIPERS, O. P. Controlled gene expression systems for lactic acid bacteria: transferable nisin-inducible expression cassettes for *Lactococcus*, *Leuconostoc* and *Lactobacillus* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 4581-4584, 1997.

KRUPPA, M.; KROM, B. P.; CHAUHAN, N.; BAMBACH, A. V.; CIHLAR, R. L.; CALDERONE, R. A. The two-component signal transduction protein Chk1p regulates quorum sensing in *Candida albicans*. **Eukaryotic Cell**, v. 3, n. 4, p. 1062-1065, 2004.

LATIFI, A.; WINSON, M. K.; FOGLINO, M.; BYCROFT, B. W.; STEWART, G. S.; LAZDUNSKI, A.; WILLIAMS, P. Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of the virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Molecular Microbiology**, v. 17 (2), p. 333-343, 1995.

LEQUETTE, Y.; GREENBERG, E. P. Timing and localization of rhamnolipid synthesis gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 1, p. 37-44, 2005.

MATZ, C.; MCDOUGALD, D.; MORENO, A. M.; YUNG, P. Y.; YILDIZ, F. H.; KJELLEBERG, S. Biofilm formation and phenotypic variation enhance predation-driven persistence of *Vibrio cholerae*. **PNAS**, v. 102, no. 46, 2005.

MELLO, M. R. F.; MARIANO, R. L. R.; MENEZES, M.; CÂMARA, T. R.; ASSIS, S. M. P. Seleção de bactérias e métodos de bacterização para promoção de crescimento em mudas de abacaxizeiro micropropagadas. **Summa Phytopathologica**, v. 28, no. 3, p. 222-228, 2002.

MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum Sensing in Bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, p. 165-199, 2001.

MINOGUE, T. D.; CARLIER, A. L.; KOUTSOUDIS, M. D.; VON BODMAN, S. B. The cell density-dependent expression of stewartan exopolysaccharide in *Pantoea stewartii* ssp. *stewartii* is a function of EsaR-mediated repression of the rcsA gene. **Molecular Microbiology**, v. 56, no. 1, p. 189-203, 2005.

NEALSON, K. H.; PLATT, T.; HASTINGS, J. W. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescence system. **Journal of Bacteriology**, v. 104, p. 313-322, 1970.

PEROTTI, E. B. R.; MENÉNDEZ, L. T.; GAIA, O. E.; PIDELLO, A. Supervivencia de *Pseudomonas fluorescens* em suelos com diferente contenido de materia orgânica. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 37, p. 102-105, 2005.

RASCH, M.; BUCH, C.; AUSTIN, B.; SLIERENDRECHT, W. J.; EKMANN, K. S.; LARSEN, J. L.; JOHANSEN, C.; RIEDEL, K.; EBERL, L.; GIVSKOV, M.; GRAM, L. An inhibitor of bacterial quorum sensing reduces mortalities caused by vibriosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 350-359, 2004.

RUMJANEK, N. G.; FONSECA, M. C. C.; XAVIER, G. R. Quorum sensing em sistemas agrícolas. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, número???? n. 33, p. 35-50, 2004.

SESSITSCH, A.; COENYE, T.; STURZ, A. V.; VANDAMME, P.; BARKA, E. A.; SALLES, J. F.; VAN ELSAS, J. D.; FAURE, D.; REITER, B.; GLICK, B. R.; WANG-PRUSKI, G.; NOWAK, J. *Burkholderia phytofirmans* sp., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 1187-1192, 2005.

SIDDIQUI, I. A. ; SHAUKAT, S. S. Mixtures of plant disease suppressive bacteria enhance biological control of multiple tomato pathogens. **Biology and Fertility of Soils**, v. 36, no. 4, p. 260-268, 2002.

SOTTERO, A. N.; FREITAS, S. S.; MELO, A. M. T.; TRANI, P. E. Rizobactérias e Alfaca: Colonização Rizosférica, Promoção de Crescimento e Controle Biológico. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, p. 225-234, 2006.

SOUZA, L. C. A. Produção e caracterização do operon *gum* de *Xylella fastidiosa*. **Tese de Mestrado em Agronomia**. ESALQ, Piracicaba, SP, 2002. Ver formato citação????

STICKLER, D. J.; MORRIS, N. S.; McLEAN, R. J. C.; FUQUA, C. Biofilms on Indwelling Urethral Catheters Produce Quorum-Sensing Signal Molecules In Situ and In Vitro. **Applied and Environmental Microbiology**, número????, p. 3486-3490, 1998.

ST. JOHN, T. The Importance of Mycorrhizal Fungi and Other Beneficial Microorganisms in Biodiversity Projects. Paper presented at the **Western Forest Nursery Associations** meeting at Fallen Leaf Lake, September, 14-18, 1992.

TILAK, K. V. B. R.; RANGANAYAKI, N.; MANOHARACHARI, C. Synergistic effects of plant-growth promoting rhizobacteria and *Rhizobium* on nodulation and nitrogen fixation by pigeonpea (*Cajanus cajan*). **European Journal of Soil Science**, v. 57, issue 1, p. 67 até???, 2006.

TRON, E. A.; WILKE, H. L.; PETERMANN, S. R.; RUST, L. *Pseudomonas aeruginosa* from canine otitis externa exhibit a quorum sensing deficiency. **Veterinary Microbiology**, v. 99, n. 2, p. 121-129, 2004.

VAN HOUTT, R.; AERTSEN, A.; JANSEN, A.; QUINTANA, A. L.; MICHIELS, C. W. Biofilm formation and cell-to-cell signalling in Gram-negative bacteria isolated from a food processing environment. **Journal of Applied Microbiology**. v. 96, 177-184, 2004.

VESELOVA, M.; KHOLMECKAYA, M.; KLEIN, S.; VORONINA, E.; LIPASOVA, V.; METLITSKAYA, A.; MAYATSKAYA, A.; LOBANOK, E.; KHMEL, I.; CHERNIN, L. Production of *N*-Acylhomoserine Lactone Signal Molecules by Gram-Negative Soil-Borne

and Plant-Associated Bacteria. **Folia Microbiol.** v. 48, no. 6, p. 794-798, 2003.

WILLIAMS, P.; BAINTON, N. J.; SWIFT, S.; CHHABRA, S. R.; WINSON, M. K.; STEWART, G. S. A. B.; SALMOND, G. P. C.; BYCROFT, B. W. Small molecule-mediated density-dependent control of gene expression in prokaryotes: bioluminescence and the biosynthesis of carbapen antibiotics. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 100, p. 161-168, 1992.

XAVIER, G. R.; SILVA, F. V.; ZILLI, J. E.; RUMJANEK, N. G. Extração de DNA de microrganismos associados às plantas. **EMBRAPA Agrobiologia**, Comunicado Técnico, 2004. 15p.

ZAGO, V.C.P.; DE-POLLI, H.; RUMJANEK, N.G. *Pseudomonas spp.* Fluorescentes – Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontroladoras de fitopatógenos em sistemas de produção agrícola. **Documento n. 127, EMBRAPA Agrobiologia**, 2000. Pág???

ZHANG, L. H.; DONG, Y. H. Quorum sensing and signal interference: diverse implications. **Molecular Microbiology**, v. 53, p. 1563 até????, 2004.

## 7 ANEXOS

### ANEXO I

**Tabela 4.** Caracterização morfológica de isolados de raízes de Alface (*Lactuca sativa* L.).

<b>Isolado</b>	<b>Tamanho</b>	<b>Forma</b>	<b>Borda</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Cor</b>	<b>Transparência</b>	<b>Fluoresc.</b>	<b>Muco</b>
A1101	1	circular	lisa	homogênea	creme	opaca	alta	pouco
A1141	2	circular	lisa	homogênea	amarela clara	translúcida	alta	médio
A161	2	ovalada	ondulada	homogênea	creme	translúcida	baixa	médio
A171	3	circular	lisa	homogênea	amarela esverdeada	opaca	alta	médio
A242	2	circular	lisa	homogênea	creme	opaca	alta	muito
A263	2	ovalada	lisa	homogênea	creme	translúcida	alta	médio
A312	3	ovalada	lisa	homogênea	amarela esverdeada	translúcida	baixa	médio
A313	2	circular	lisa	homogênea	creme	opaca	alta	médio
A314	2	circular	lisa	homogênea	amarela clara	translúcida	alta	médio
A324	2	circular	lisa	heterogênea	amarela esverdeada	translúcida	média	médio
A329	2	circular	lisa	homogênea	creme	opaca	média	médio
A342	2	ovalada	lisa	homogênea	creme	opaca	média	muito
A352	2	circular	ondulada	heterogênea	creme	opaca	alta	pouco
A362	2	circular	lisa	heterogênea	amarela esverdeada	translúcida	alta	médio
A372	3	ovalada	lisa	homogênea	amarela esverdeada	translúcida	média	pouco
A373	3	circular	lisa	homogênea	amarela esverdeada	translúcida	média	muito
A383	1	circular	lisa	homogênea	amarela clara	translúcida	média	pouco

**Tabela 5.** Caracterização morfológica de isolados de raízes de Couve (*Brassica oleracea* cv. *Acephala*).

Isolado	Tamanho	Forma	Borda	Aspecto	Cor	Transparência	Fluoresc.	Muco
C1103	2	circular	ondulada	homogênea	creme	opaca	média	médio
C1113	2	circular	ondulada	homogênea	amarela esverdeada	opaca	baixa	pouco
C1123	3	circular	lisa	homogênea	creme	opaca	média	muito
C1133	2	circular	ondulada	homogênea	amarela esverdeada	opaca	alta	médio
C1143	3	circular	ondulada	heterogênea	amarela esverdeada	translúcida	alta	pouco
C112	2	circular	lisa	homogênea	amarela esverdeada	opaca	média	médio
C132	3	ovalada	ondulada	heterogênea	amarela clara	translúcida	alta	pouco
C142	3	circular	lisa	homogênea	creme	opaca	alta	muito
C152	2	circular	ondulada	homogênea	amarela esverdeada	opaca	alta	médio
C161	2	circular	ondulada	homogênea	amarela esverdeada	opaca	alta	médio
C162	2	circular	ondulada	homogênea	creme	opaca	alta	médio
C182	2	circular	lisa	homogênea	amarela esverdeada	translúcida	alta	pouco
C183	3	circular	lisa	homogênea	creme	opaca	alta	muito
C193	2	circular	lisa	heterogênea	amarela esverdeada	translúcida	média	pouco
C227	3	circular	lisa	homogênea	amarela esverdeada	opaca	alta	pouco
C237	3	circular	lisa	homogênea	amarela clara	opaca	média	muito
C247	2	circular	lisa	homogênea	amarela esverdeada	translúcida	alta	médio
C257	2	circular	lisa	heterogênea	creme	opaca	alta	médio
C267	3	ovalada	lisa	heterogênea	creme	opaca	alta	muito
C277	2	circular	lisa	homogênea	amarela esverdeada	translúcida	alta	pouco
C287	2	circular	lisa	homogênea	amarela esverdeada	translúcida	alta	pouco
C3113	3	circular	ondulada	heterogênea	amarela esverdeada	translúcida	alta	pouco
C312	3	circular	lisa	homogênea	amarela esverdeada	translúcida	alta	médio
C313	2	circular	lisa	homogênea	amarela esverdeada	translúcida	alta	pouco
C314	3	circular	lisa	homogênea	amarela esverdeada	translúcida	baixa	pouco
C315	3	circular	lisa	heterogênea	amarela esverdeada	translúcida	alta	pouco
C316	3	ovalada	lisa	heterogênea	creme	opaca	baixa	muito
C317	1	circular	lisa	homogênea	creme	translúcida	baixa	pouco
C318	2	circular	ondulada	heterogênea	amarela esverdeada	translúcida	alta	medio
C322	3	ovalada	ondulada	homogênea	amarela esverdeada	opaca	alta	pouco
C323	1	circular	lisa	homogênea	amarela esverdeada	opaca	alta	pouco
C324	2	circular	ondulada	heterogênea	creme	translúcida	alta	médio
C332	2	circular	lisa	homogênea	amarela esverdeada	translúcida	média	pouco
C333	3	ovalada	lisa	heterogênea	amarela esverdeada	translúcida	média	pouco
C335	3	circular	lisa	homogênea	amarela esverdeada	opaca	baixa	pouco
C337	3	circular	lisa	heterogênea	creme	translúcida	média	pouco
C343	3	circular	lisa	homogênea	amarela esverdeada	translúcida	alta	pouco
C344	1	circular	lisa	homogênea	amarela esverdeada	translúcida	alta	pouco
C346	1	circular	lisa	homogênea	creme	translúcida	alta	pouco
C352	3	ovalada	lisa	homogênea	creme	opaca	alta	muito
C356	3	circular	lisa	homogênea	amarela esverdeada	translúcida	alta	pouco
C363	1	circular	lisa	homogênea	amarela esverdeada	translúcida	alta	médio
C366	2	circular	ondulada	homogênea	amarela esverdeada	translúcida	alta	pouco
C373	3	circular	ondulada	heterogênea	amarela esverdeada	translúcida	alta	pouco
C376	3	circular	lisa	heterogênea	amarela esverdeada	opaca	baixa	médio
C383	2	circular	lisa	heterogênea	amarela esverdeada	translúcida	média	médio
C386	3	circular	lisa	homogênea	amarela esverdeada	opaca	alta	pouco
C393	2	circular	lisa	homogênea	amarela esverdeada	translúcida	alta	pouco

**Tabela 6.** Caracterização morfológica de isolados de raízes de Rúcula (*Eruca vesicaria sativa* (Mill) Thell).

<b>Isolado</b>	<b>Tam.</b>	<b>Forma</b>	<b>Borda</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Cor</b>	<b>Transparência</b>	<b>Fluoresc.</b>	<b>Muco</b>
R1102	3	circular	lisa	heterogênea	creme	translúcida	baixa	médio
R1112	2	circular	lisa	homogênea	amarela esverdeada	translúcida	baixa	pouco
R112	3	circular	lisa	heterogênea	creme	opaca	alta	muito
R1132	1	circular	lisa	homogênea	creme	opaca	alta	médio
R122	2	circular	lisa	homogênea	amarela esverdeada	opaca	alta	médio
R123	3	circular	lisa	homogênea	creme	opaca	alta	muito
R126	2	ovalada	ondulada	heterogênea	amarela esverdeada	translúcida	alta	pouco
R132	3	ovalada	lisa	homogênea	amarela esverdeada	translúcida	alta	pouco
R133	3	circular	lisa	homogênea	amarela esverdeada	opaca	baixa	muito
R133B	2	circular	lisa	homogênea	creme	opaca	média	pouco
R142	3	ovalada	ondulada	heterogênea	amarela clara	translúcida	baixa	médio
R143	3	circular	lisa	heterogênea	amarela esverdeada	opaca	média	muito
R146	4	ovalada	lisa	homogênea	amarela esverdeada	translúcida	média	pouco
R152	2	ovalada	lisa	heterogênea	amarela clara	translúcida	alta	médio
R153	3	ovalada	lisa	heterogênea	creme	opaca	alta	muito
R163	1	circular	lisa	homogênea	amarela esverdeada	translúcida	alta	pouco
R166	1	circular	lisa	homogênea	amarela clara	translúcida	alta	pouco
R171	1	circular	lisa	homogênea	creme	translúcida	baixa	pouco
R173	1	circular	lisa	homogênea	amarela esverdeada	translúcida	baixa	pouco
R183	3	circular	lisa	heterogênea	amarela clara	opaca	média	pouco
R192	3	circular	lisa	homogênea	amarela clara	translúcida	média	médio
R223	3	circular	lisa	heterogênea	amarela esverdeada	opaca	média	pouco
R233	4	ovalada	lisa	heterogênea	amarela esverdeada	translúcida	alta	médio
R243	2	circular	lisa	homogênea	creme	opaca	alta	médio
R3112	1	circular	lisa	homogênea	creme	translúcida	alta	pouco
R3132	2	circular	lisa	heterogênea	amarela esverdeada	opaca	alta	médio
R3142	4	circular	lisa	homogênea	amarela esverdeada	translúcida	baixa	pouco
R322	3	ovalada	ondulada	homogênea	amarela esverdeada	translúcida	baixa	pouco
R342	2	circular	lisa	homogênea	amarela esverdeada	translúcida	baixa	pouco

**Tabela 7.** Caracterização morfológica de isolados de raízes de Salsa (*Petroselinum crispum*).

Isolado	Tamanho	Forma	Borda	Aspecto	Cor	Transparência	Fluoresc.	Muco
S1112	2	circular	lisa	homogênea	amarela esverdeada	translúcida	alta	médio
S1122	4	circular	lisa	homogênea	amarela clara	opaca	alta	muito
S112	1	circular	lisa	heterogênea	amarela clara	translúcida	alta	pouco
S113	2	circular	lisa	homogênea	amarela esverdeada	translúcida	baixa	pouco
S1132	3	ovalada	lisa	homogênea	amarela clara	opaca	baixa	pouco
S122	1	ovalada	lisa	homogênea	creme	opaca	baixa	muito
S133	3	ovalada	lisa	homogênea	creme	translúcida	alta	muito
S142	3	circular	lisa	heterogênea	amarela esverdeada	opaca	alta	pouco
S153	2	circular	lisa	heterogênea	creme	opaca	alta	muito
S162	2	circular	lisa	homogênea	creme	opaca	alta	muito
S173	1	circular	lisa	homogênea	amarela esverdeada	translúcida	alta	muito
S211	3	ovalada	lisa	homogênea	creme	opaca	alta	médio
S221	1	circular	lisa	homogênea	amarela clara	translúcida	alta	médio
S231	3	circular	lisa	heterogênea	amarela clara	opaca	alta	pouco
S241	3	circular	lisa	homogênea	amarela esverdeada	translúcida	baixa	médio
S242	2	circular	lisa	homogênea	creme	translúcida	baixa	médio
S251	4	ovalada	lisa	homogênea	amarela esverdeada	opaca	alta	pouco
S261	4	circular	lisa	homogênea	amarela esverdeada	opaca	alta	médio
S262	4	circular	lisa	homogênea	amarela esverdeada	opaca	alta	médio
S263	3	circular	lisa	homogênea	amarela esverdeada	translúcida	alta	pouco
S272	3	circular	lisa	homogênea	creme	opaca	alta	médio
S282	1	circular	lisa	homogênea	amarela clara	translúcida	baixa	pouco
S3112	2	circular	lisa	heterogênea	creme	opaca	alta	médio
S311	2	circular	lisa	homogênea	creme	translúcida	alta	médio
S312	2	circular	lisa	homogênea	amarela esverdeada	translúcida	alta	pouco
S313	3	circular	lisa	heterogênea	amarela esverdeada	opaca	baixa	muito
S322	4	ovalada	lisa	homogênea	amarela esverdeada	opaca	baixa	pouco
S324	4	circular	ondulada	homogênea	creme	translúcida	alta	muito
S333	4	ovalada	lisa	homogênea	creme	translúcida	alta	pouco
S342	3	circular	lisa	homogênea	amarela clara	opaca	alta	médio
S353	3	circular	lisa	homogênea	amarela esverdeada	opaca	alta	médio
S373	4	opaca	lisa	homogênea	amarela esverdeada	opaca	alta	pouco
S393	2	circular	lisa	homogênea	amarela esverdeada	translúcida	baixa	pouco

## ANEXO II. Grupos morfológicos encontrados na análise de agrupamento

**Tabela 8.** Grupos morfológicos encontrados na análise de agrupamento.

Grupo	Tam	Forma	Borda	Aspecto	Cor	Transp	Fluor	Muco	N. isolados
1	2	circular	ondulada	hetero	am esv	transl	alta	médio	1
2	2	circular	lisa	hetero	am esv	transl	alta	médio	1
3	2	circular	ondulada	hetero	creme	transl	alta	médio	1
4	2	circular	lisa	hetero	am esv	transl	média	médio	2
5	2	circular	lisa	hetero	am esv	transl	média	pouco	1
6	2	ovalada	lisa	hetero	am clara	transl	alta	médio	1
7	4	ovalada	lisa	hetero	am esv	transl	alta	médio	1
8	3	ovalada	ondulada	hetero	am clara	transl	baixa	médio	1
9	3	ovalada	ondulada	hetero	am clara	transl	alta	pouco	1
10	3	circular	lisa	hetero	am esv	transl	alta	pouco	1
11	3	circular	ondulada	hetero	am esv	transl	alta	pouco	3
12	2	ovalada	ondulada	hetero	am esv	transl	alta	pouco	1
13	1	circular	lisa	homo	am clara	transl	alta	médio	1
14	2	circular	lisa	homo	am clara	transl	alta	médio	2
15	1	circular	lisa	homo	am esv	transl	alta	pouco	1
16	2	circular	lisa	homo	am esv	transl	alta	médio	2
17	3	circular	lisa	homo	am esv	transl	alta	médio	1
18	2	circular	lisa	homo	creme	transl	alta	médio	1
19	2	ovalada	lisa	homo	creme	transl	alta	médio	1
20	2	circular	lisa	homo	creme	transl	baixa	médio	1
21	1	circular	lisa	homo	am esv	transl	alta	muito	1
22	1	circular	lisa	homo	am esv	transl	alta	pouco	2
23	2	circular	lisa	homo	am esv	transl	alta	pouco	6
24	3	circular	lisa	homo	am esv	transl	alta	pouco	3
25	2	circular	ondulada	homo	am esv	transl	alta	pouco	1
26	2	circular	lisa	homo	am esv	transl	baixa	pouco	4
27	3	circular	lisa	homo	am esv	transl	baixa	pouco	1
28	4	circular	lisa	homo	am esv	transl	baixa	pouco	1
29	2	circular	lisa	homo	am esv	transl	média	pouco	1
30	1	circular	lisa	hetero	am clara	transl	alta	pouco	1
31	1	circular	lisa	homo	am clara	transl	alta	pouco	1
32	1	circular	lisa	homo	am clara	transl	média	pouco	1
33	1	circular	lisa	homo	creme	transl	alta	pouco	2
34	1	circular	lisa	homo	creme	transl	baixa	pouco	2
35	1	circular	lisa	homo	am clara	transl	baixa	pouco	1
36	1	circular	lisa	homo	am esv	transl	baixa	pouco	1
37	3	circular	lisa	homo	am esv	transl	baixa	médio	1
38	3	ovalada	lisa	homo	am esv	transl	baixa	médio	1
39	3	circular	lisa	homo	am clara	transl	média	médio	1
40	3	circular	lisa	homo	am esv	transl	média	muito	1
41	3	ovalada	ondulada	homo	am esv	opaca	alta	pouco	1
42	3	ovalada	ondulada	homo	am esv	transl	baixa	pouco	1
43	3	ovalada	lisa	homo	am clara	opaca	baixa	pouco	1
44	3	ovalada	lisa	homo	am esv	transl	alta	pouco	1
45	3	ovalada	lisa	homo	am esv	transl	média	pouco	1
46	3	ovalada	lisa	hetero	am esv	transl	média	pouco	1
47	4	ovalada	lisa	homo	am esv	transl	média	pouco	1

48	4	ovalada	lisa	homo	am esv	opaca	alta	pouco	2
49	4	ovalada	lisa	homo	am esv	opaca	baixa	pouco	1
50	4	ovalada	lisa	homo	creme	transl	alta	pouco	1
51	3	circular	lisa	homo	am clara	opaca	alta	médio	1
52	3	circular	lisa	homo	am esv	opaca	alta	médio	2
53	3	circular	lisa	homo	am clara	opaca	alta	médio	1
54	4	circular	lisa	homo	am esv	opaca	alta	médio	2
55	1	circular	lisa	homo	am esv	opaca	alta	pouco	1
56	3	circular	lisa	homo	am esv	opaca	alta	pouco	2
57	1	circular	lisa	homo	creme	opaca	alta	médio	1
58	1	circular	lisa	homo	creme	opaca	alta	pouco	1
59	2	circular	lisa	hetero	am esv	opaca	alta	médio	1
60	2	circular	lisa	homo	am esv	opaca	alta	médio	1
61	2	circular	lisa	hetero	creme	opaca	alta	médio	2
62	2	circular	lisa	homo	creme	opaca	alta	médio	2
63	2	circular	ondulada	homo	am esv	opaca	alta	médio	3
64	2	circular	ondulada	homo	creme	opaca	alta	médio	1
65	2	circular	lisa	homo	am esv	opaca	média	médio	1
66	2	circular	lisa	homo	creme	opaca	média	médio	1
67	2	circular	ondulada	homo	creme	opaca	média	médio	1
68	2	circular	lisa	homo	creme	opaca	média	pouco	1
69	2	circular	ondulada	hetero	creme	opaca	alta	pouco	1
70	2	circular	ondulada	homo	creme	opaca	média	médio	1
71	4	circular	lisa	homo	am clara	opaca	alta	muito	1
72	2	circular	lisa	hetero	creme	opaca	alta	muito	1
73	3	circular	lisa	hetero	creme	opaca	alta	muito	1
74	2	circular	lisa	homo	creme	opaca	alta	muito	2
75	3	circular	lisa	homo	creme	opaca	alta	muito	3
76	3	circular	lisa	homo	am clara	opaca	média	muito	1
77	3	circular	lisa	homo	creme	opaca	média	muito	1
78	3	ovalada	lisa	homo	creme	opaca	alta	médio	1
79	3	ovalada	lisa	homo	creme	opaca	alta	muito	1
80	3	ovalada	lisa	homo	creme	transl	alta	muito	1
81	3	ovalada	lisa	hetero	creme	opaca	alta	muito	2
82	3	ovalada	lisa	hetero	creme	opaca	baixa	muito	1
83	1	ovalada	lisa	homo	creme	opaca	baixa	muito	1
84	2	ovalada	lisa	homo	creme	opaca	média	muito	1
85	3	circular	lisa	hetero	am esv	opaca	baixa	médio	1
86	3	circular	lisa	hetero	am esv	opaca	baixa	muito	1
87	3	circular	lisa	homo	am esv	opaca	baixa	muito	1
88	3	circular	lisa	homo	am esv	opaca	baixa	pouco	1
89	3	circular	lisa	hetero	am clara	opaca	alta	pouco	1
90	3	circular	lisa	hetero	am esv	opaca	alta	pouco	1
91	3	circular	lisa	hetero	am clara	opaca	média	pouco	1
92	3	circular	lisa	hetero	am esv	opaca	média	muito	1
93	3	circular	lisa	hetero	am esv	opaca	média	pouco	1
94	3	circular	lisa	hetero	creme	transl	baixa	médio	1
95	3	circular	lisa	hetero	creme	transl	média	pouco	1
96	2	ovalada	ondulada	homo	creme	transl	baixa	médio	1
97	4	circular	ondulada	homo	creme	transl	alta	muito	1

**ANEXO III.** Classificação dos isolados quanto à produção de AHL.

**Tabela 10.** Classificação dos isolados quanto à produção de AHL.

	AHL +	AHL -
Alface	A171; A242; A263; A372; A373	A1101; A1141; A161; A312; A313; A314; A324; A329; A342; A352; A362
Couve	C277; C324	C1103; C1113; C1123; C1133; C1143; C112; C117; C122; C142; C152; C161; C162; C182; C183; C193; C227; C237; C247; C257; C267; C287; C3113; C312; C315; C316; C317; C318; C323; C332; C335; C337; C343; C346; C352; C356; C363; C366; C373; C383; C386; C393
Rúcula	R122; R223; R243; R152	R1102; R1132; R1112; R112; R123; R132; R133; R133B; R142; R143; R146; R153; R163; R166; R171; R173; R183; R192; R3112; R3132; R3142; R322; R342
Salsa	S112; S153; S393	S1112; S1122; S113; S142; S162; S173; S211; S231; S241; S251; S263; S282; S3103; S311; S312; S313; S322; S324; S333; S353; S373

ANEXO IV. Classificação dos isolados quanto à formação de biofilme.

**Tabela 12.** Classificação dos isolados quanto à formação de biofilme.

	Biofilme +	Biofilme -
Alface	A1101; A161; A171; A242; A263; A312; A313; A324; A342; A352; A362; A372; A383	A1141
Couve	C117; C227; C312; C313; C314; C315; C316; C322; C323; C335; C337; C343; C346; C352; C356; C366; C373; C376; C383; C386; C393	C332; C363
Rúcula	R1102; R1112; R112; R122; R123; R132; R133; R142; R143; R146; R162; R163; R173; R183; R192; R223; R233; R3112; R3132; R3142; R322; R342	R153
Salsa	S1112; S1122; S1132; S122; S133; S142; S153; S162; S173; S211; S221; S231; S241; S242; S251; S261; S262; S263; S272; S282; S3102; S3112; S312; S313; S322; S333; S342; S353; S373; S393	