



MODOS DE AÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS OBTIDAS DE CANA-DE-AÇÚCAR

Renan C.F. Magalhães^{1a}; Kamila E. Moura^{1b}; Raquel P. Freitas-lório^{1c}; Adriana P.D. Silveira^{1d}

¹ Instituto Agrônômico (IAC) - Centro de Solos e Recursos Ambientais

Nº 13132

RESUMO – As bactérias endofíticas, que vivem no interior de tecidos vegetais, atuam como agentes de biocontrole e promotores de crescimento da planta, por mecanismos diretos e indiretos. Este trabalho teve como objetivo caracterizar alguns isolados de bactérias endofíticas, isoladas de cana de açúcar cultivada nas condições do Estado de São Paulo, quanto à capacidade de produzir substâncias relacionadas à promoção de crescimento de plantas e, ou antagônicas a patógenos, e avaliar o efeito dos isolados no crescimento de plântulas micropropagadas de cana de açúcar. Foram utilizados dez isolados, previamente selecionados como promotores de crescimento de cana, caracterizados quanto à morfologia da colônia, produção de substâncias promotoras de crescimento e antagônicas a *Bipolaris sacchari*. Instalou-se um experimento para avaliar a eficiência dos isolados em promover crescimento da cana (produção de matéria seca de parte aérea), com ou sem adição de N ao solo. Dos isolados empregados nos testes *in vitro*, o IAC/BECA-101 e IAC/BECA-152 mostraram-se os mais promissores por apresentarem capacidade de produzir substâncias indólicas, sideróforo, quitinase, substâncias antagônicas voláteis e solubilizar fosfato. Vários isolados foram eficientes em promover o crescimento das mudas micropropagadas de cana, destacando-se o IAC/BECA-140 e IAC/BECA-141, principalmente com adição de N ao solo.

Palavras-chaves: bactérias promotoras de crescimento de planta, controle biológico, antagonismo a patógenos

^a Bolsista CNPq/PIBIC: Graduação em Ciências Biológicas- renanfavaro@hotmail.com, ^b Bolsista CNPq/PIBIT: Graduação em Ciências Biológicas - milah_rox@hotmail.com, ^c Bolsista CAPES: Doutorado em Agricultura Tropical e Subtropical, -raquel.p.f@hotmail.com, ^d Orientadora: Pesquisadora, Centro de Solos e Recursos Ambientais – IAC - apdsil@iac.sp.gov.br.



ABSTRACT- *Endophytic bacteria, which live inside plant tissues, act as biocontrol agents and plant growth promoters, by direct and indirect mechanisms. This study aimed to characterize some endophytic bacteria, isolated from sugar cane cultivated under São Paulo state management conditions, for their ability to produce substances related to plant-growth promotion or to antagonism to pathogens, and evaluate the effect of the isolates on sugarcane plantlets growth. Ten isolates, previously selected as cane growth promoters, were characterized for colony morphology, production of growth-promoting substances and antagonistic substances to *Bipolaris sacchari*. An experiment was conducted to evaluate the efficiency of the isolates in promoting plant growth (shoot dry matter production), with or without N addition to soil. The most promising isolates- IAC/BECA-101 and IAC/BECA-152, were able to produce indolic substances, siderophore, quitinase, volatile antagonistic substances and solubilize phosphate. Some isolates were effective to promote sugarcane plantlets growth, especially IAC/BECA-140 and IAC/BECA-141, with N addition to soil.*

Key-words: *plant-growth promoting substances, biologic control, antagonism to pathogen*

1 INTRODUÇÃO

Durante sua evolução, as plantas desenvolveram mecanismos de adaptação complexos, sendo que a maioria deles envolveu interação com microrganismos, que normalmente desempenham papel importante na restauração e sustentabilidade de diferentes ecossistemas (NERONI e CARDOSO, 2007).

Em função dos efeitos positivos no controle de doenças e pela produção de crescimento de plantas, que podem ocorrer por mecanismos diretos ou indiretos, muitos microrganismos são estudados. Entre eles encontram-se os microrganismos endofíticos, que vivem no interior de tecidos vegetais, colonizando e competindo com os fitopatógenos, sem, aparentemente, causarem dano ao vegetal. Atuam como agente de biocontrole, competindo pela colonização dos espaços, produção de diversos compostos químicos, antibióticos e enzimas, também indução, na planta hospedeira, de resistências estimuladas por vários mecanismos (HALLMAN et al., 1997; AZEVEDO et al., 2000; AIT BARKA et al., 2002; STURZ et al., 2000; COMPANT, 2005). Esses microrganismos podem ser favorecidos por estarem dentro da planta, em um ambiente protegido, estando em contato direto para troca de nutrientes e metabólitos (GYANESHWAR et al. 2001; BALDANI e BALDANI, 2005).

Os microrganismos endofíticos podem promover outros benefícios para a promoção do crescimento das plantas, como os ajustes osmóticos, regulação de estômatos, aumento na absorção de minerais e alteração no metabolismo da planta (BELESKY e WEST, 2009). Em plantas de beterraba, por exemplo, a inoculação de bactérias endofíticas causou maior teor de clorofila e carboidratos (SHI et al., 2010).

Esse trabalho teve como objetivo caracterizar alguns isolados de bactérias endofíticas, isoladas de cana de açúcar cultivada nas condições do Estado de São Paulo, quanto à capacidade de produzir substâncias relacionadas à promoção de crescimento de plantas e antagônicas a patógenos, e avaliar o efeito dos isolados no crescimento de plântulas micropropagadas de cana de açúcar.



2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 10 isolados (IAC/BECa-101, IAC/BECa-112, IAC/BECa-117, IAC/BECa-128, IAC/BECa-135, IAC/BECa-140, IAC/BECa-141, IAC/BECa-146, IAC/BECa-147, IAC/BECa-152) selecionados por FREITAS (2011), que promoveram o crescimento de mudas micropropagadas de cana de açúcar em casa de vegetação. Foram realizadas as seguintes análises:

2.1. Morfologia da colônia - Os isolados foram cultivados em meio BDA e avaliados em 24 e 48 horas quanto a coloração, consistência, diâmetro da colônia, produção de goma, elevação, forma, borda e superfície. A morfologia celular foi analisada sob microscópio óptico (VIDEIRA et al., 2007).

2.2. Presença de cápsulas - Foi analisado em microscópio óptico para visualização de cápsula pela coloração negativa com tinta da china por via húmida.

2.3. Coloração de Gram - De acordo com o protocolo de YANO *et al.* (1991) foi realizada a coloração de Gram, para diferenciar os isolados com base na composição química e integridade da parede celular.

2.4. Teste de oxidase - O teste de presença da enzima oxidase nos isolados foi realizado pelo uso de solução de TEMED (KOVACS, 1956).

2.5. Teste da catalase - A detecção de catalase nos isolados foi obtida pela reação da cultura com peróxido de hidrogênio a 3% (MARINGONI, 2010).

2.6. Hidrólise de tween-80 - Ao meio foi adicionado Tween-80 em uma concentração final de 1% (v/v). A presença de halo transparente ao redor da colônia indicou resultado positivo (MARINGONI, 2010).

2.7. Teste da gelatinase - Os isolados foram crescidos em meio descrito por YANO et al. (1991), incubados por 24 horas, posteriormente transferidos para geladeira por 2 horas, seguido de nova incubação; o processo foi repetido por 5 dias. O resultado positivo foi indicado pela liquefação do meio de cultura após a refrigeração.

2.8. Produção de citocininas e giberelinas - Para observar a produção de citocininas e giberelinas foi utilizado o método adaptado do bioensaio do cotilédone de rabanete (LETHAM, 1971).

2.9. Capacidade de solubilização de fosfato - A análise da capacidade de solubilização de fosfato foi realizada segundo KATNELSON e BOSE (1959).

2.10. Produção de sideróforos - Foi utilizado o método adaptado por SCHWYN e NEILANDS (1987).

2.11. Produção de quitinase - Foi utilizado um meio de cultura cuja única fonte de carbono foi a quitina, seguindo método de CATELLAN (1999).

2.12. . Produção de β -1,3-glucanase - Foi utilizado método adaptado de RENWICK et al. (1991), que se baseia na detecção da hidrólise do β -1,3-glucano pela reação colorimétrica com o corante vermelho Congo.



2.13. Produção de ácido cianídrico - Foi realizada segundo BAKKER e SCHIPPERS (1987) e observada a mudança de cor dos isolados que mostrou resultado positivo.

2.14. Antagonismo a fitopatógenos - Os isolados foram submetidos a teste de atividade antifúngica pela técnica do pareamento, empregando o patógeno *Bipolaris sacchari*. Os isolados que apresentarem inibição do crescimento do fungo foram submetidos a testes quanto à produção de substâncias voláteis (DICK e HUTCHINSON, 1966) e não voláteis pelo método do papel de celofane (GIBBS et al., 1967), modificado para a utilização da cultura do antagonista crescida em meio líquido.

2.15.- Produção de substâncias indólicas – Os isolados foram transferidos para meio TSA 10% e a membrana de nitrocelulose foi posta em cima, incubando - se por 2 dias na BOD. A membrana foi removida e transferida para placa com solução de Salkowski; após 30 minutos foi observado um halo avermelhado na membrana, indicando o resultado positivo.

Teste de eficiência em casa de vegetação empregando mudas micropropagadas - Foram utilizadas mudas micropropagadas obtidas do meristema apical (SREENIVASAN e SREENIVASAN, 1984) da variedade IACSP 95-5000 e os isolados bacterianos. As mudas foram separadas e inoculadas (100 µL), colocadas em sala de crescimento e depois de uma semana foram transferidas para substrato autoclavado (vasos de 500 mL). Depois de 2 meses, foram separadas mais uma vez, deixando um colmo por vaso. Receberam 5 ml do inóculo, permanecendo um mês sob sombrite 60% e outro sem sombrite. Posteriormente, foram transplantadas para vasos de 5 L de solo não autoclavado e foi feita a adubação, mantendo-se os tratamentos com e sem adubação de N; nova aplicação do inóculo (10ml) foi realizada e as plantas permaneceram por mais um mês, sendo então coletada a parte aérea, que foi seca para obtenção da massa de matéria seca da parte aérea.

3. RESULTADOS

Quanto à morfologia das células e das colônias, foi possível observar que todos os isolados apresentaram forma de cocos e a maioria das colônias apresentou coloração branca, consistência gomosa e elevação convexa. Nenhum dos isolados apresentou cápsula. Somente o isolado IAC/BECa-141 apresentou coloração de Gram positiva (Tabela 1). A maioria dos isolados apresentou os padrões das bactérias diazotróficas (ANTONIO, 2010).

Nenhum dos isolados produziu a enzima oxidase, mas todos apresentaram a enzima catalase. Somente os isolados IAC/BECa-135, IAC/BECa-140 e IAC/BECa-141 exibiram hidrólise do Tween-80 e IAC/BECa-112, IAC/BECa-140 e IAC/BECa-141 foram produtores de gelatinase (Tabela 1). Apenas o isolado IAC/BECa-101 apresentou produção de substâncias indólicas, o que indica possível capacidade de produzir auxina, hormônio que promove o crescimento da planta (BASHAN et al., 2004).

Os isolados IAC/BECa-101, IAC/BECa-140 e IAC/BECa-152 apresentaram capacidade de solubilizar fosfato, podendo contribuir na disponibilidade e absorção desse nutriente pela planta, característica que auxilia na promoção do crescimento das plantas (SILVA, 2010). Os isolados IAC/BECa-101, IAC/BECa-146, IAC/BECa-147 e IAC/BECa-152 produziram sideróforos (Tabela 1), o que pode estar relacionado à absorção de Fe pela planta, assim como supressão do desenvolvimento de alguns fitopatógenos (DASTAGER et al., 2009). Observou-se que apenas o



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013

13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

isolado IAC/BECa-146 apresentou aumento significativo no peso dos cotilédones e o IAC/BECa-152, no comprimento dos hipocótilos. As citocininas são responsáveis pelo aumento do peso dos cotilédones, já as giberelinas pelo aumento do comprimento (CATTELAN *et al*, 1999).

Tabela 1. Análise *in vitro* dos isolados bacterianos quanto à coloração de Gram, presença de cápsula, teste da oxidase, teste da catalase, hidrólise de Tween-80, teste da gelatinase, produção de substâncias Indólicas, capacidade de solubilização de fosfato e produção de sideróforos.

Isolado	Coloração de Gram	Presença de cápsulas	Teste de Oxidase	Teste da Catalase	Hidrólise de Tween-80	Teste da Gelatinase	Produção de Indólicas	Capacidade da Solubilização de P	Produção de sideróforos
IAC/BECa 101	-	-	-	+	-	-	+	+	-
IAC/BECa 112	-	-	-	+	-	+	-	-	-
IAC/BECa 117	-	-	-	+	-	-	-	-	-
IAC/BECa 128	-	-	-	+	-	-	-	-	-
IAC/BECa 135	-	-	-	+	+	-	-	-	-
IAC/BECa 140	-	-	-	+	+	+	-	+	-
IAC/BECa 141	+	-	-	+	+	+	-	-	-
IAC/BECa 146	-	-	-	+	-	-	-	-	-
IAC/BECa 147	-	-	-	+	-	-	-	-	+
IAC/BECa 152	-	-	-	+	-	-	-	+	+

Todos os isolados foram positivos à quitinase, exceto IAC/BECa-135, e nenhum produziu β -1,3-glucanase e ácido cianídrico (Tabela 2). A produção dessas enzimas está relacionada ao antagonismo a fitopatógenos (BAYSAL *et al.*, 2003).

Tabela 2. Atividade antagônica dos isolados a *Bipolaris sacchari*, pelo teste do pareamento (PR), produção de substâncias não voláteis (SNV) e substâncias voláteis (SV), quitinase, β -1,3-glucanase e ácido cianídrico.

Tratamento	Antagonismo a <i>Bipolaris sacchari</i>						Produção de Quitinase	Produção de β -1,3 Glucanase	Produção de HCN
	PR		SNV		SV				
	cm	%	cm	%	cm	%			
Controle	8,50d [*]	0,00 [#]	8,50b [*]	0,00 [#]	8,50b [*]	0,00 [#]	-----	-----	-----
IAC/BECa 101	7,55ab	11,18	7,18ab	15,57	5,03ab	40,78	+	-	-
IAC/BECa 112	8,07bcd	5,10	6,5a	23,53	3,17a	62,75	+	-	-
IAC/BECa 117	8,33cd	1,96	7,28ab	14,39	3,93a	53,73	+	-	-
IAC/BECa 128	7,58b	10,78	7,85ab	7,65	4,10a	51,76	+	-	-
IAC/BECa 135	8,50d	0,00	8,50b	0,00	5,70ab	32,94	-	-	-
IAC/BECa 140	6,97b	6,86	8,50b	0,00	5,50ab	35,29	+	-	-
IAC/BECa 141	8,50d	0,00	7,40ab	12,94	4,12a	51,57	+	-	-
IAC/BECa 146	7,83bc	7,84	8,08b	4,98	5,77ab	32,77	+	-	-
IAC/BECa 147	7,48ab	11,96	8,50b	0,00	6,07ab	28,63	+	-	-
IAC/BECa 152	6,90a	18,82	7,95ab	6,47	4,43a	47,84	+	-	-
CV%	2,86		7,21		24,25		-----	-----	-----

* letras iguais não diferem pelo teste de Tukey a 5%; # porcentagem de inibição do crescimento do patógeno



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013

13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

Em relação ao experimento *in vivo*, observou-se que somente houve efeito da adição do N ao solo sobre a eficiência dos isolados IAC/BECA -140 e IAC/BECA -141, que promoveram significativamente maior massa de matéria seca das plantas. Maior número de isolados mostrou-se mais eficiente na promoção de crescimento das plantas com a adição de N ao solo (Tabela3).

Tabela 3. Massa de matéria seca parte aérea (MMS - PA) de plantas de cana de açúcar micropropagadas, com inoculação de isolados de bactérias endofíticas, com e sem adubação nitrogenada.

Isolados bacterianos	Sem N	Com N
	g	
Controle	4,35bA	4,94bA
IAC/BECA -101	5,35aA	5,71aA
IAC/BECA -112	4,84bA	5,82aA
IAC/BECA -117	4,49bA	6,05aA
IAC/BECA -128	5,67aA	6,00aA
IAC/BECA -135	5,51aA	5,88aA
IAC/BECA -140	5,41aB	6,89aA
IAC/BECA -141	5,48aB	6,38aA
IAC/BECA -146	4,50bA	5,41aA
IAC/BECA -147	4,27bA	5,21bA
IAC/BECA -152	3,63bA	4,34bA

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5%; letra minúscula compara entre isolados na mesma adubação; letra maiúscula compara entre adubação, no mesmo isolado.

4. CONCLUSÕES

Dos isolados empregados nos testes *in vitro*, o IAC/BECA-101 e IAC/BECA-152 mostram-se os mais promissores por apresentarem diferentes modos de ação tanto em relação à produção de substâncias que auxiliam no crescimento da planta quanto que causam antagonismo a fitopatógenos.

Vários isolados são eficientes em promover o crescimento das mudas micropropagadas de cana, destacando-se o IAC/BECA-140 e IAC/BECA-141, principalmente com adição de N ao solo.



5. AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida. À FAPESP pelo auxílio (Projeto BIOEN – 2008/56147-1). Ao Instituto Agrônômico (IAC) - Centro de Solos e Recursos Ambientais, pela oportunidade de estágio.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIT BARKA, E., GOGNIES, S., NOWAK, J., AUDRAN, J., BELARBI, A. Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote grapevine growth. **Biological Control**, v. 24, p.135-142, 2002.

ANTONIO, C.S.; **Ocorrência de bactérias endofíticas associadas a variedades de cana-de-açúcar cultivadas nos Estados: Alagoas e Pernambuco**. Seropédica-RJ, 2010. P.25. Dissertação (Mestre em Ciências). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI JR, W.; PEREIRA, J.O; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.3, n.1, p. 40-65, 2000.

BAKKER, A.W. SCHIPPERS, B. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas aeruginosa*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.21, p.613-618, 1975

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.77, p.549-579, 2005.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L.E. Azospirillum plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v.50, p.521-577, 2004

BAYSAL, Ö; SOYLU, E.M; SOYLU, S. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator cibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* spp. *michiganensis*. **Plant Pathology**, v. 52, n.6, p. 747-753, 2003.

BELESKY, D.P.; WEST. **Abiotic stresses and endophyte effects**. In: FRIBOURG, H.A.. HANNAWAY, D.B.; WEST, C.P. (ed.) Tall fescue for the twenty-first century. p. 49-64, 2009;

CANUTO, E.L.; SALLES, J.F.; OLIVEIRA, A.L.M.; PERIN, L.; REIS, V.M. e BALDANI, J.I. Respostas de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar à inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas. **Agronomia**, v. 37, nº 2, p. 67 - 72, 2003

CATTELAN, A. J. **Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal**. Londrina: Embrapa Soja, 1999. 36p.

COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLÉMENT, C. BARKA, E.A. Use of plant growth-promotion bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. **Applied and Environmental Microbiology**. v.71, p.4951-4959, 2005.

DASTAGER, S.G. ; DEEPA, C.K. ; PUNEET, S.C.; NAUTIYAL; C.S; PANDEY, A. Isolation and characterization of plant growth-promoting strain *Pantoea* NII-186, from Western Ghat Forest soil, India. **Letters in Applied Microbiology**, v. 49, p. 20-25, 2009.

DICK, C.M.; HUTCHINSON, S.A. Biological activity of volatile fungal metabolites. **Nature**, v. 211, p. 868, 1966.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013

13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

FREITAS, R.P. **Bactérias diazotróficas endofíticas associadas à cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical. Área de concentração: Gestão de Recursos Agroambientais – Microbiologia do Solo), Instituto Agronômico – IAC. Campinas – SP, 2011.

GIBBS, J.N. A study of the epiphytic grow habit of *Fomes annosus*. **Annals of Botany**, v. 32, 1967.

GYANESHWAR, P.; JAMES, E.K.; MATHAN, N.; REDDY, P.M.; REINHOLD-HUREK, B.; LADHA, J.K. Endophytic colonization of rice by diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v.183, p.2634-2645, 2001.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN; MAHAFFEE, W.F.; KLOPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.895-914, 1997.

KATZNELSON, H.; BOSE, B. Metabolic activity and phosphate-dissolving capability of bacterial isolates from wheat roots, rhizosphere, and non-rhizosphere soil. **Canadian Journal of Microbiology**, v.5, p.79-85, 1959.

KOVACS, N. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. **Nature**, v.178, p.703, 1956.

LETHAM, D.S. Regulators of cell division in plant tissues – XII. A cytokinin bioassay using excised radish cotyledons. **Physiologia Plantarum**, v.25, p.391-396, 1971.

MARINGONI, A.C.; **Técnicas em Fitobacteriologia**. Botucatu, SP, p.24-26, 2010.

NERONI, R.F.; CARDOSO, E.J.B.N. Occurrence of diazotrophic bacteria in *Araucaria angustifolia*. **Science Agricola**, v.64, n.3, p.303-304, 2007.

RENWICK, A.; CAMPBELL, R., COE, S. Assessment of in vivo screening systems for potential of biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. **Plant Pathology**, v.40, p.524-532, 1991.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J.B.; Universal assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical biochemistry**, v.160, p.47-56, 1987.

SILVA, J.F.; **Isolamento e caracterização de estirpes bacterianas associadas à cana-de-açúcar com características para a promoção de crescimento vegetal**. Campos dos Goytacazes-RJ, 2010. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, UENF.

SHI, Y.; LOU, K.; LI, C. Growth and photosynthetic efficiency promotion of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by endophytic bacteria. **Photosynthesis Research**. v. 105, p.5-13, 2010.

SREENIVASAN, J.; SREENIVASAN, T.V.. In vitro propagation of *Sccharum officinarum* L. x *Sclerostachya fusca* (Roxb) a cane hybrid. **Theoretical and Applied Genetics**., 67, p. 171-174, 1984.

STURZ, A.V.; CHRISTIE, B.R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes: potencial role in developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews in Plant Sciences**. v.19, p.1-30, 2000.

YANO, D.M.Y.; ATTILI, D.S.; GATTI, M.S.V.; EGUCHI, S.Y.; OLIVEIRA, U.M. **Técnicas de microbiologia em controle de qualidade**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, 1991.