



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



CARACTERIZAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS ASSOCIADAS À *Solanum lycocarpum* St. Hil. QUANTO AO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO PARA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL, ENZIMAS E AGENTES ANTIMICROBIANOS

Paulo Henrique Gomes Lisboa

Orientador: Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava

SÃO CARLOS - SP
2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA



Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

CARACTERIZAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS ASSOCIADAS À *Solanum lycocarpum* St. Hil. QUANTO AO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO PARA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL, ENZIMAS E AGENTES ANTIMICROBIANOS

Paulo Henrique Gomes Lisboa

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos, trabalho que foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava

Departamento de Morfologia e Patologia – UFSCar

Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha

Departamento de Genética e Evolução – UFSCar

Dra. Marina Alves Gavassi

Instituto de Biociências – UNESP Rio Claro

SÃO CARLOS - SP

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado candidato Paulo Henrique Gomes Lisboa, realizada em 05/03/2020:

Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava
UFSCar

Prof. Dra. Marina Alves Gavassi
UNESP

Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha
UFSCar

AGRADECIMENTOS

À minha família, Antônio, Eva e Poliana, pelo amor incondicional e por estarem sempre ao meu lado nos momentos bons e ruins, independente da distância. São minha base, amo vocês!

Ao Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava pela orientação, pela oportunidade de crescimento profissional, pela paciência comigo até nos momentos mais difíceis, por tudo, obrigado!

À Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa, pelo apoio, pelo empenho e por toda a ajuda neste momento e nos momentos futuros, agradeço de coração!

Aos mentores Dra. Paula Cristiane Machado e Dr. Paulo Henrique de Andrade, por todos os ensinamentos no início e no decorrer dessa jornada. Vocês têm um papel muito importante no meu crescimento como pesquisador e pessoa, muito obrigado!

Aos colegas do LaMiB – Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas por todos estes anos de convivência e aprendizado. Sou grato por cada ajuda recebida, cada conversa, cada momento.

Aos colegas, técnicos, docentes, terceirizados e demais funcionários do Departamento de Patologia e Morfologia da UFSCar, pelos anos de convivência sempre harmônica e pela amizade.

À todos os amigos que fiz nesta cidade, que me ajudaram na adaptação e na construção de uma nova vida. Serei eternamente grato por todos os momentos e levarei todos pra sempre no meu coração.

Aos meus animais de estimação, Dora, Hope, Latifa e Katrina, que fizeram com que essa jornada fosse muito menos estressante e mais alegre.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos – código de financiamento 001 - durante estes dois anos, tornando possível a realização deste trabalho.

LISBOA, Paulo Henrique Gomes. **Caracterização de rizobactérias associadas à *Solanum lycocarpum* St. Hil. quanto ao potencial biotecnológico para promoção de crescimento vegetal, enzimas e agentes antimicrobianos.** 2020. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2020.

RESUMO

Os metabólitos secundários provindos da biodiversidade do bioma Cerrado têm valores agregados devido as suas aplicações na obtenção de novos fármacos, agroquímicos e alimentos. A *Solanum lycocarpum* St. Hil., conhecida popularmente como lobeira, é uma planta característica deste bioma, que têm sido estudada pela capacidade de se desenvolver em terras ácidas e pobres em nutrientes; ademais, possui propriedades medicinais descritas em literatura, tornando interessante o estudo de sua microbiota rizosférica também no contexto da resistência microbiana, problema preocupante para a saúde mundial que aumenta a severidade das doenças infecciosas e os custos de tratamento. O presente trabalho teve como objetivos a caracterização bioquímica de cento e trinta e uma bactérias associadas à rizosfera de lobeira avaliando, *in vitro*, o potencial desses micro-organismos para a fixação biológica de nitrogênio (FBN), solubilização de fosfato (SF), produção de ácido indol-acético (AIA) e controle biológico por meio de antagonismo à fungos fitopatógeno; adicionalmente, foram avaliados o perfil de atividade enzimática e o potencial de produção de antibióticos pelos isolados. A identificação dos melhores isolados também foi realizada. Quanto aos testes *in vitro*, a FBN foi testada em meio de cultura semi-sólido livre de nitrogênio, a SF foi testada em meio ágar nutriente suplementado com fosfato insolúvel e o AIA foi testado o meio caldo Triptona de Soja (TSB) 10% + L-triptofano. No teste de antagonismo, houve uma seleção massal utilizando discos com micélios de 14 fungos fitopatógeno que foram depositados em placas contendo meio *Potato Dextrose Agar* (PDA) juntamente com os isolados e as bactérias com melhores resultados foram selecionadas para o teste de pareamento direto com os mesmos fitopatógenos. Para os ensaios de atividade enzimática, os isolados foram estriados em meios especiais cujas fontes de carbono eram substratos das enzimas de interesse. A antibiose contra três diferentes patógenos clínicos foi avaliada pelo método do bloco de gelose. Na identificação molecular foi utilizado o gene 16S e as sequências foram comparadas no software MEGA X. Do total, 32,6% dos isolados obtidos apresentaram resultados positivos para fixação biológica de nitrogênio atmosférico, todos produziram AIA (variando de 0,07 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 134,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e 45,8% solubilizaram fosfato inorgânico. Os testes de atividade enzimática *in vitro* revelaram que 42,9% dos isolados endofíticos apresentaram atividade amilolítica, 42,9% celulolítica, 47,3% esterolítica, 27,7%

lipolítica, 31,3% pectinolítica e 60,7% proteolítica. Nos ensaios contra patógenos, foi demonstrado atividade antagônica contra um espectro de 14 fungos fitopatogênicos e 3 patógenos de importância clínica. Os melhores isolados foram identificados como pertencentes aos gêneros *Burkholderia*, *Microbacterium* e *Bacillus* sp.

Palavras-chaves: *Solanum lycocarpum* st. Hil.; Enzimas; Fungos fitopatogênicos; Rizobactérias; Antibiose; Cerrado.

LISBOA, Paulo Henrique Gomes. **Characterization of rhizobacteria associated with *Solanum lycocarpum* St. Hil. regarding the biotechnological potential for promoting plant growth, enzymes and antimicrobial agents.** 2020. Master's dissertation (Pos-graduation Program of Biotechnology) – Federal University of São Carlos, São Carlos, 2020.

ABSTRACT

Solanum lycocarpum St. Hil., endemic plant of the Brazilian tropical savanna, known as the “Cerrado”, has been studied for its medicinal properties and for having the ability to grow in acidic and nutrient-poor lands, attracting interest in the investigation of its rhizospheric microbiota, which includes plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). Industrial enzymes and antibiotics can also be obtained from them. In this work, the biological nitrogen fixation capacity was tested in NFb semi-solid culture medium and 32.6% of the isolates showing positive results. In the inorganic phosphate solubilization tests, 45.8% of the isolates demonstrated this capacity in nutrient agar supplemented with insoluble phosphate. The solubilization index (SI) for calcium phosphate by the bacterial isolates grown in solid medium varied from 0 to 4.833. All bacteria produced indole acetic acid (ranging from 0.07 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ to 134.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) in Tryptic Soy Broth (TSB) 10% + L-tryptophan medium. In assays against pathogens, antagonistic activity was demonstrated against a spectrum of fourteen phytopathogenic fungi through the technique of direct pairing in Potato Dextrose Agar (PDA) medium and three clinical pathogens using the agar block method. The bacterial isolates were striated in special mediums whose carbon sources were substrates of the enzymes in the enzyme activity assays and 88.4% of them had at least one of these activities. The best isolates were identified by partial sequencing of the 16S gene as belonging to the genera *Bacillus*, *Burkholderia* and *Microbacterium*.

Keywords: *Solanum lycocarpum* St. Hil.; Enzymes; Phytopathogenic fungi; Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR); Antibiotics; Brazillian savanna.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica

Figura 2.1 *Solanum lycocarpum* St. Hil. Fonte: autor 12

Capítulo 5 - Resultados

Figura 5.1 Controle negativo (à esq.) e isolado positivo pra FBN (à dir.). A presença da película (indicada pela seta vermelha) mostra a realização de FBN pelo microrganismo. Sua falta (seta preta) indica a ausência dessa capacidade. Fonte: autor 37

Figura 5.2 Quantificação de ácido indol acético em isolados positivos para a síntese. Fonte: autor..... 37

Figura 5.3 Halo translúcido ao redor da colônia indica processo de solubilização de fósforo. Dc: diâmetro da colônia. Dh: diâmetro do halo. Fonte: Abreu (2016). 38

Figura 5.4 As setas indicam a atividade enzimática, com formação de halo; sendo A) produção de amilase, B) de celulase, C) de esterase, D) de lipase, E) de pectinase e F) de protease. Fonte: Machado (2015). 39

Figura 5.5 Perfil enzimático das rizobactérias associadas a *Solanum lycocarpum* st. Hil. Fonte: autor..... 44

Figura 5.6 Seleção massal, mostrando controle (no qual somente o micélio do fungo foi inoculado na placa, à esquerda de cada imagem) e tratamento (inoculação do fungo juntamente com os isolados bacterianos, à direita de cada imagem), evidenciando atividade antagônica. A: *Alternaria alternata*. B: *Sclerotinia sclerotiorum*. C: *Sphaceloma* sp. D: *Fusarium proliferatum*. Fonte: autor..... 44

Figura 5.7 Antibiose de *Bacillus subtilis* contra *Escherichia coli*, evidenciada pelo halo em volta do bloco de gelose indicado pela seta vermelha. Fonte: autor. 46

Figura 5.8 Gel de confirmação da amplificação do fragmento do gene 16S, indicados pelas setas. Fonte: autor..... 48

LISTA DE TABELAS

Capítulo 5 - Resultados

Tabela 5.1 Avaliação de indicadores de promoção de crescimento vegetal <i>in vitro</i> analisados para os isolados rizobacterianos associados à <i>Solanum lycocarpum</i> St. Hil. .31	
Tabela 5.2 Perfil enzimático dos isolados rizobacterianos associados a <i>Solanum lycocarpum</i> St. Hil.40	
Tabela 5.3 Porcentagem de inibição micelial (PIC) em %. Nas ordenadas, FP1: <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , FP2: <i>Moniliophthora perniciosa</i> , FP3: <i>Fusarium solani</i> , FP4: <i>Fusarium oxysporum</i> (ATTCC 2163), FP5: <i>Sphaceloma sp.</i> (CNPUV 102), FP6: <i>Ceratocystis paradoxa</i> , FP7: <i>Alternaria alternata</i> , FP8: <i>Fusarium proliferatum</i> FP9: <i>Colletotrichum sp.</i> , FP10: <i>Fusarium verticillioides</i> , FP11: <i>Fusarium oxysporum</i> (isolado de feijão), FP12: <i>Fusarium oxysporum</i> (isolado de algodão), FP13: <i>Phytophthora sojae</i> e FP14: <i>Rhizopus microsporus</i> . Na abscissa estão o código dos dez isolados selecionados para o teste.45	
Tabela 5.4 Antibiose contra patógenos de interesse clínico46	
Tabela 5.5 Identificação dos melhores isolados por sequenciamento parcial do gene 16S48	

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	3
RESUMO	5
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	9
1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 Cerrado	11
2.1.1 <i>Solanum lycocarpum</i> St. Hil.	11
2.2 Rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (RPCP) associadas às plantas	12
2.2.1 Mecanismos de promoção de crescimento vegetal por rizobactérias	13
2.2.1.1 Fixação biológica de nitrogênio	14
2.2.1.2 Produção de ácido indol acético (AIA)	15
2.2.1.3 Solubilização de fosfato	16
2.2.1.4 Controle biológico de fungos fitopatogênicos por rizobactérias	17
2.3 Produção de enzimas por rizobactérias	19
2.4 Antibiose contra patógenos humanos	20
3. OBJETIVOS	22
3.1 Objetivo geral	22
3.2 Objetivos específicos	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 Local da realização do trabalho e coleta do material vegetal	23
4.2 Obtenção, purificação e armazenamento dos isolados de rizobactérias	23
4.3 Seleção de rizobactérias com potencial agrícola e biotecnológico	24
4.3.1 Ensaio de promoção de crescimento vegetal in vitro	24
4.3.1.1 Fixação biológica de nitrogênio (FBN)	24
4.3.1.2 Produção de ácido indol acético (AIA)	24
4.3.1.3 Solubilização de fosfato inorgânico	25

4.4	Atividade enzimática	25
4.4.1	Atividade amilolítica	25
4.4.2	Atividade celulolítica	26
4.4.3	Atividade lipolítica e esterolítica	26
4.4.4	Atividade pectinolítica	26
4.4.5	Atividade proteolítica	27
4.5	Atividade antagônica contra fungos fitopatogênicos	27
4.5.1	Técnica de cultura pareada ou pareamento direto in vitro	27
4.6	Antibiose frente à patógenos humanos	28
4.7	Identificação molecular dos isolados bacterianos	29
4.7.1	Extração de DNA bacteriano	29
4.7.2	Amplificação do gene 16s rDNA pela reação de PCR	29
4.7.3	Purificação do DNA, sequenciamento, edição e análise das sequências	29
5.	RESULTADOS	31
5.1	Seleção de rizobactérias com potencial para promoção de crescimento vegetal	31
5.1.1	Fixação biológica de nitrogênio - FBN	37
5.1.2	Produção de ácido indol acético	37
5.1.3	Solubilização de fosfato	38
5.2	Produção enzimática	38
5.3	Antagonismo à fungos fitopatogênicos	44
5.4	Antibiose frente a patógenos de interesse clínico	45
5.5	Sequenciamento	47
6.	DISCUSSÃO	49
6.1	Ensaio de promoção de crescimento por mecanismos diretos	49
6.2	Resultados dos ensaios enzimáticos	51
6.3	Resultados de antagonismo	51
6.4	Resultados de antibiose	52
7.	CONCLUSÃO	54
8.	REFERÊNCIAS	55

1. INTRODUÇÃO

Há um grande valor agregado em metabólitos secundários provindos da biodiversidade, devido a suas possíveis aplicações em diversas áreas industriais. O Brasil possui a flora mais rica em abundância de espécies e cerca de 54,2% de endemismo, o que corresponde a 18.357 plantas endêmicas em um total de 33.885 espécies vegetais encontradas pelo país, com parte desses vegetais se localizando no bioma Cerrado, que hospeda, aproximadamente, 6 mil espécies de árvores em uma área de 2.036.448 km², que equivale a quase um quarto (23,92%) do território nacional (OLIVEIRA-FILHO e RATTER, 2002), mas grande parte da biodiversidade desse bioma ainda não é conhecida, tornando-o um dos 25 hotspots mundiais e, com o avanço das atividades agrícolas, o Cerrado vem perdendo áreas de seu domínio e, também, espécies endêmicas (SILVA, 2014; SANTOS, 2015).

Dentre as plantas do Cerrado podem-se destacar uma espécie vegetal com muitos estudos descritos na literatura: *Solanum lycocarpum* st. Hil., cujo nome popular é lobeira. É uma planta arbustiva/arbórea que pode chegar a quatro metros de altura, com frutos globosos que são a base da alimentação do, ameaçado de extinção, lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), sendo assim, além de ser altamente nutritivo, possui grande importância ambiental (MOURA; OLIVEIRA; CHAVES, 2010).

A lobeira também atrai interesse por ser uma planta com propriedades medicinais bem descritas pela literatura, como no tratamento de hepatite (ALVES *et al.*, 2016), asma, gripes, resfriados (ARAÚJO; COELHO; AGRA, 2010) e atividade antitumoral (CARVALHO, 2017). É de fácil obtenção e tem a capacidade de prosperar em solos ácidos e pobres em nutrientes, propriedade esta que pode ser, em parte, devida a sua microbiota associada (TORRES, 2018).

A interação planta-microrganismos é uma área científica a ser explorada, principalmente em um país que possui uma enorme biodiversidade de vegetais e microrganismos como o Brasil. A utilização de microrganismos capazes de promover o crescimento vegetal se apresenta como uma alternativa sustentável em relação aos fertilizantes químicos na busca de promover o aumento da produção de culturas agrícolas (BAEZ-ROGELIO *et al.*, 2017; PREININGER *et al.*, 2018). Contudo, essa é uma opção pouco utilizada e estudada na agricultura, apesar de possuir um enorme potencial de sustentabilidade e preservação do meio ambiente e, também, na utilização em estratégias no manejo integrado de pragas e doenças (GARCIA; KNAAK; FIUZA, 2015). Dentre esses microrganismos são encontradas bactérias associadas às rizosferas de plantas, atraídas por secreções das raízes e que são capazes de promover o desenvolvimento vegetal, sendo denominadas de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP), (MENDES, GARBEVA, RAAIJMARKERS, 2013). A efetivação direta do crescimento vegetal

ocorre por meio do aumento da disponibilização de nutrientes, através da fixação biológica de nitrogênio (FBN); pela solubilização de fosfato mineral e pelo biossintese de substâncias reguladoras do crescimento de plantas, como ácido indol acético (AIA). A promoção de crescimento vegetal indireta ocorre pelo antagonismo a outros microrganismos que são patogênicos à planta, através da produção de antibióticos, competição, parasitismo ou indução de resistência sistêmica (VEGA, 2007; GLICK, 2014; AHEMAD e KIBRET, 2014). Os microrganismos promotores de crescimento vegetal têm grande potencial biotecnológico na forma de produtos biológicos que objetivam atender propostas agronômicas específicas com aumento de produtividade e menores impactos ao meio-ambiente com, por exemplo, fitoestimulantes, biofertilizantes, agentes de controle biológico ou produtos de biorremediação (PREININGER *et al.*, 2018).

Os microrganismos associados a plantas acabam por ser objetos perfeitos para o estudo de novas enzimas (LACAVA e AZEVEDO, 2013) e novos antibióticos (LACAVA e SOUSA, 2016). Enzimas de interesse na agricultura, indústria e medicina podem ser prospectadas através de diversas origens, tais como animal, vegetal ou microbiana; porém a última acaba sendo mais utilizada devido ao rápido crescimento dos microrganismos e maior facilidade de manipulação genética (COELHO, SALGADO, RIBEIRO, 2008; PATIL, SEBALE, DEVALE, 2015). Enzimas das classes das proteases, pectinases, celulases, lipases, esterases, amilases e outras já foram descritas pela literatura como sendo obtidas por meio de microrganismos; essas enzimas são utilizadas nos mais diversos setores industriais, tais como combustível, produtos têxteis, papel, química, ração animal, dentre outros (DOS SANTOS *et al.*, 2018).

Quanto aos antibióticos, o correto tratamento das infecções acaba sendo negligenciado em países em desenvolvimento, visto que a prevenção destas exige a utilização de fármacos específicos e outros agentes e ações cujo custo total se torna dispendioso financeiramente, favorecendo o uso indiscriminado de antibióticos e, conseqüentemente a resistência microbiana (SOUSA, 2008; BARBOSA, SOUSA, HOKKA, 2009; RATTI e SOUSA, 2009). Diante disso, faz-se necessária a bioprospecção de novos antibióticos e terapias como forma de contornar o problema (LIN *et al.*, 2015).

Visando a conservação da riqueza vegetal do Cerrado e a bioprospecção microbiana associada aos vegetais, se fazem necessários estudos nesta área de relação entre microrganismos e planta, que atualmente ainda é pouco explorada (AHEMAD e KIBRET, 2014; SOUSA, SERRANO, LACAVA, 2017). Por esta razão, o estudo teve como objetivo isolar, identificar e selecionar bactérias rizosféricas cultiváveis associadas à espécie *Solanum lycocarpum* St. Hil.,

as quais foram testadas quanto a avaliação do potencial biotecnológico dos isolados na produção de enzimas e antibióticos e na promoção de crescimento vegetal.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cerrado

Grande parte da diversidade do mosaico de biomas Cerrado, o segundo maior do Brasil em extensão territorial com 2.036.448 km², ainda é desconhecida (OLIVEIRA-FILHO e RATTER, 2002). Esse mosaico é conhecido, também, como savana brasileira devido a sua semelhança com as savanas africanas e possui flora e fauna ricas em diversidade com alto endemismo (FRANÇOSO *et al.*, 2015) o que faz do bioma um dos 25 *hotspots* do mundo necessitando ser protegido ambientalmente (SOUSA, SERRANO, LACAVA, 2017); Contudo, o cerrado perdeu aproximadamente cerca de 50% da sua cobertura vegetal natural, sendo que em 2012 a taxa de desmatamento do bioma foi de 7.652km²/ano (SANTOS, 2015) sendo essa perda causada, majoritariamente, pela expansão das fronteiras agrícolas e da pecuária (CASTRO *et al.*, 2009); como consequência ocorre a fragmentação de habitats, erosão de solo e a invasão de espécies exóticas, comprometendo a biodiversidade do Cerrado (KLINK e MACHADO, 2005) e toda a função hidrológica do continente sul-americano (LOPES e MIOLA, 2010).

O solo do Cerrado é considerado ácido, pobre em nutrientes e sofre alta exposição aos raios UV devido ao clima tropical; as plantas endêmicas são interessantes alvos de estudo pois, além de se adaptar a estas condições, também necessitam lidar com uma alta gama de fitopatógenos presentes neste solo, já que o bioma possui grande diversidade de microrganismos (TORRES, 2018).

2.1.1 *Solanum lycocarpum* St. Hil.

A lobeira (figura 2.1), de nome científico *Solanum lycocarpum* St. Hil., é uma planta perene pertencente ao gênero *Solanum*, da família *Solanaceae*. É uma espécie nativa do Cerrado, conseguindo prosperar em áreas de solo ácido e pobre em nutrientes, sendo facilmente encontrada em áreas antrópicas em bordas de fragmentos do bioma (GALLON *et al.*, 2015).

É uma planta arbustiva/arbórea que pode chegar a quatro metros de altura, com densos pêlos, ramos lenhosos, folhas pecioladas, raízes profundas (OLIVEIRA JUNIOR *et al.*, 2004) e frutos globosos nutritivos, que são a base da alimentação do lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), mamífero endêmico do Cerrado, ameaçado de extinção e principal dispersor de sementes da lobeira; o fruto, além de ser altamente nutritivo, possui compostos e substâncias com ação vermífuga contra o verme-gigante-dos-rins, parasita fatal a este mamífero; a planta

tem ciclo de vida longo e não necessita de muitos subsídios para seu desenvolvimento, além de florescer o ano todo (MOURA; OLIVEIRA; CHAVES, 2010).

Além da grande importância ecológica e ambiental, a lobeira também possui importância clínica por suas propriedades medicinais. Na literatura já foi relatado o uso de suas raízes contra hepatite (ALVES, 2016), obtenção de um pó extraídos dos frutos e utilizado como agente hipoglicêmico no tratamento de diabetes Mellitus tipo II (YOSHIKAWA, 2007), uso de suas flores como analgésicos e anti-inflamatórios (ARAÚJO *et al.*, 2010) e atividade antitumoral (CARVALHO, 2017). Mais de 100 espécies do gênero *Solanum* foram descritas na literatura com algum tipo de atividade biológica e se fazem importantes na biossíntese de compostos de defesa contra microrganismos (BAILAO *et al.*, 2015).

Devido à sua adaptação as condições adversas, sua importância ambiental, as propriedades medicinais associadas, a fácil obtenção do vegetal oriundo do Cerrado e aos prévios estudos do grupo, este estudo preconiza o isolamento de rizobactérias isolados de lobeira, enfatizando a obtenção de produtos naturais de interesses biotecnológicos.



Figura 2. 1 *Solanum lycocarpum* St. Hil. Fonte: autor

2.2 Rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (RPCP) associadas às plantas

Por definição, a rizosfera é a zona de contato entre o solo e as raízes das plantas, rica em nutrientes (GRAÇAS *et al.*, 2015). Nessa região, as raízes das plantas fazem a rizodeposição, processo no qual são produzidos e liberados exsudatos para o solo, que podem

ser utilizados por bactérias, dentre outros microrganismos, favorecendo seu crescimento e, conseqüentemente, culminando em uma alta densidade delas no solo próximo às raízes (MENDES, GARBEVA, RAAIJMAR-KERS, 2013; GOSWAMI, THAKKER, DHANDHUKIA, 2016).

Por sua vez, essas bactérias podem oferecer substâncias de interesse para o desenvolvimento da planta ou para sua proteção; assim, essas bactérias são denominadas rizobactérias promotoras de crescimento das plantas (RPCP) ou, em inglês, “*Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)*” (KLOEPPER e SCHROTH, 1978).

As RPCP podem promover o crescimento vegetal por diversos mecanismos, como fixação biológica de nitrogênio (FBN), a produção de fitormônios, em especial o ácido indolacético (AIA) (SOUZA; AMBROSINI; PASSAGLIA, 2015); a síntese de sideróforos, que são moléculas orgânicas captadoras de ferro (PANDEY *et al.*, 2017); a solubilização de fosfato inorgânico (SF) (MUTHUKUMARASAMY *et al.*, 2017); conferindo proteção ao vegetal contra fitopatógenos por meio de competição, parasitismo, produção de antibióticos e enzimas ou induzindo resistência sistêmica (GOSWAMI, THAKKER, DHANDHUKIA, 2016). Esses microrganismos também apresentam enorme potencial como fonte de prospecção de várias enzimas de interesses diversos, como na agricultura, medicina e vários setores da indústria (PATIL, SEBALE, DEVALE, 2015; DOS SANTOS *et al.*, 2018).

Na agricultura de alguns países, incluindo o Brasil, as RPCP já estão sendo utilizadas (GUPTA *et al.*, 2015) em diversas culturas com o propósito de aumento de produtividade, como soja (ARAUJO e HUNGRIA, 1999), milho (BABALOLA *et al.*, 2003; GHOLAMI *et al.*, 2009), trigo (LUZ, 2001), feijão (SILVEIRA *et al.*, 1995), arroz (BENEDUZI *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2008), tomate (FREITAS e PIZZINATTO, 1991; BERNABEU *et al.*, 2015;) e alface (GOMES *et al.*, 2003; CHAMANGASHT *et al.*, 2012). Nestes estudos, o desenvolvimento vegetal foi avaliado quanto produtividade de grãos, germinação, absorção de nutrientes, peso seco e altura dos cultivares, dentre outros (RATZ *et al.*, 2017).

2.2.1 Mecanismos de promoção de crescimento vegetal por rizobactérias

De acordo com Goswami *et al.* (2016), as RPCP podem afetar o crescimento da planta por mecanismos diretos ou indiretos, sendo que algumas são capazes de apresentarem mais de um simultaneamente.

No mecanismo direto, a rizobactéria aumenta a disponibilidade de nutrientes ou produz substâncias que possuem ação de fitormônios como, por exemplo, realizando a fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato inorgânico, produção de sideróforos e

produção de ácido indol acético ou outras substâncias que também atuem como reguladores vegetais; no indireto, ela disputa o microambiente com microrganismos fitopatogênicos por meio de produção de antibióticos e enzimas, parasitismo, competição por nutrientes, indução de resistência sistêmica e outras estratégias (GLICK, 2014; AHEMAD e KIBRET, 2014; GOSWAMI; THAKKER; DHANDHUKIA, 2016).

Neste estudo foram avaliados três mecanismos diretos – fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato inorgânico e produção de ácido indol acético – e um indireto, antagonismo frente a fungos fitopatogênicos.

2.2.1.1 Fixação biológica de nitrogênio

O nitrogênio é um elemento fundamental para os seres vivos, visto que participa da constituição de aminoácidos, ácidos nucleicos, nucleotídeos e outros compostos essenciais à vida, podendo ser um fator tão limitante quanto a água em relação ao desenvolvimento vegetal (SILVA, 2017). Na atmosfera, principal fonte natural de nitrogênio, cerca de 78% de sua composição é formada pelo gás nitrogênio (N_2). Porém, a maioria dos vegetais não é capaz de utilizar o nitrogênio nesta forma dependendo, então, da pequena fração do elemento disponível em formas assimiláveis presentes no solo, principalmente, pela decomposição de matéria orgânica, pela adição de fertilizantes nitrogenados ou pela decorrência da fixação biológica de nitrogênio (SANTOS *et al.*, 2008; TAIZ & ZEIGER, 2013; AHEMAD; KIBRET, 2014).

A fixação é o processo pelo qual o nitrogênio atmosférico é transformado nas formas iônicas amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-), assim, se tornando assimilável aos seres vivos, em especial, as plantas. Na fixação industrial ocorre a queima de combustíveis fósseis em temperaturas de 300 a 400°C para que ocorra o processo de Haber-Bosh, no qual o hidrogênio reage com o nitrogênio formando amônia; esse processo é utilizado industrialmente, entre outras aplicações, para a produção de fertilizantes nitrogenados (KERBAUY, 2008). Uma descarga elétrica de grande intensidade como, por exemplo, um raio, pode quebrar as moléculas de água, oxigênio e N_2 presentes no ar possibilitando que os átomos desses elementos reajam entre si formando ácido nítrico (HNO_3), que atinge o solo sendo precipitado com chuva ou neve; a esse processo dá-se o nome de fixação espontânea, que é responsável por 10% da fixação natural do nitrogênio (TAIZ e ZIEGER, 2013).

Os 90% restantes (TAIZ e ZIEGER, 2013) decorrem da fixação biológica de nitrogênio (FBN) (EADY e POSTGATE, 1974), processo realizado por meio de microrganismos procariontes, em especial as bactérias, que possuem o complexo enzimático nitrogenase, capaz de reduzir o N_2 a NH_3 ; esses microrganismos são chamados diazotróficos. As bactérias

diazotróficas podem ser classificadas em: não-simbióticas (vida livre, associativa ou endófitas), fixando nitrogênio atmosférico mas sem formação de estruturas diferenciadas nos vegetais, sendo representantes dessa classificação os gêneros *Anabaena*, *Nostoc*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Gluconoacetobacter diazotrophicus*, *Azocarus* dentre outros; ou em simbiose, como os gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, que estabelecem uma associação simbiótica com plantas leguminosas formando estruturas especializadas denominadas nódulos e o gênero *Frankia*, associando-se simbioticamente à árvores não-leguminosas (BHATTACHARYYA e JHA, 2012; GUPTA *et al.*, 2015).

Apesar das bactérias diazotróficas serem encontradas naturalmente no solo, são utilizados inoculantes como veículos para multiplicar e favorecer desenvolvimento destes microrganismos (MENDES e HUNGRIA, 2001). A inoculação é o processo no qual bactérias diazotróficas são incutidas na semente antes da semeadura favorecendo o desenvolvimento do vegetal, sendo realizada com o inoculante, um produto biológico que contém microrganismos benéficos ao desenvolvimento das plantas e outros aditivos para aderência e melhor desenvolvimento desses microrganismos (MENDES e REIS-JÚNIOR, 2010). Dessa forma, mitiga-se a quantidade de fertilizante mineral aplicado e conseqüentemente, o produtor economiza (SILVA, 2017).

A utilização de bactérias diazotróficas na agricultura é importante tanto no ponto de vista econômico, quanto ecológico, pois possibilita aumentar a eficiência dos fertilizantes nitrogenados com menores quantidades e até substituí-los com a FBN, possibilitando a viabilização de reflorestamentos e minimizando possíveis impactos ambientais decorrentes da utilização destes agroquímicos (BARBIERI *et al.*, 1998).

2.2.1.2 Produção de ácido indol acético (AIA)

Hormônios vegetais ou fitormônios são reguladores químicos que desencadeiam conseqüências específicas em funções variadas no desenvolvimento das plantas. Dentre os fitormônios relacionados à divisão celular, crescimento e diferenciação, destacam-se: auxinas, giberelinas, etileno, ácido abscísico e citocininas (TAIZ & ZEIGER, 2013).

As auxinas, do grego “crescer”, são uma classe de fitormônios capazes de estimular o desenvolvimento vegetal (GUPTA *et al.*, 2015) sendo que seus principais efeitos são a expansão e alongamento celular e a divisão celular, principalmente nos tecidos das raízes (KRİKORIAN, 1991). Porém, altas concentrações de auxinas podem causar o efeito contrário, prejudicando o desenvolvimento das raízes em algumas culturas (TAIZ e ZEIGER, 2013).

A principal auxina encontrada em baixas concentrações nas plantas é o ácido indol acético, conhecido pela sigla AIA (SHARMA *et al.*, 2003) que, através da promoção da divisão e alongamento celular das raízes proporciona maior absorção de água e nutrientes do solo para a planta. (TAIZ e ZEIGER, 2013).

As bactérias capazes de sintetizar o ácido indol acético geralmente o fazem em seu metabolismo secundário, por diversas vias biossintéticas, utilizando o aminoácido L-triptofano como precursor (PATTEN e GLICK, 1996) e a enzima indol-3-piruvato descarboxilase (ipdC) como principal catalisadora (LEBUHN e HARTMANN, 1993).

As RPCP são bem conhecidas pela capacidade de sintetizar auxinas (QUECINE, BATISTA, LACAVA, 2014). É relatado que 80% dos microrganismos isolados da rizosfera de diversas culturas possuam a habilidade de sintetizar e secretar estes compostos (PARRAY, MIR, SHAMEEM, 2019). Diversos gêneros de bactérias com capacidade de síntese de AIA já foram descritas, tais como *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Kocuria*, *Gluconacetobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Xanthomonas* mostrando grande potencial de promoção de crescimento vegetal através da produção deste fitormônio (LACAVA e AZEVEDO, 2013; AHEMAD e KIBRET, 2014; QUECINE; BATISTA; LACAVA, 2014; GOSWAMI; THAKKER; DHANDHUKIA, 2016; CHEN *et al.*, 2017; BATISTA *et al.*, 2018).

2.2.1.3 Solubilização de fosfato

O fósforo (P), é o segundo elemento mais requerido na nutrição das plantas, perdendo somente para o nitrogênio (VAN RAIJ, 1991), sendo fundamental para praticamente todos o metabolismo vegetal, participando das transferências de energia, fotossíntese, respiração, síntese de ácidos nucleicos, dentre outros (GRANT *et al.*, 2001; SAHARAN e NEHRA, 2011; SANTOYO *et al.*, 2016). O P é encontrado em grandes quantidades no solo, porém, cerca de 95% a 99% está em formas inorgânicas, não assimiláveis pelas plantas, que só conseguem o absorver nas formas solúveis íons monobásicos (H_2PO_4^-) e dibásicos HPO_4^{2-} (AHEMAD e KIBRET, 2014; TEYMOURI *et al.*, 2016; PARRAY, MIR, SHAMEEM, 2019). O fósforo é o fertilizante mais utilizado no Brasil, visto que demanda reaplicações frequentes, já que as plantas absorvem apenas pequenas quantidades e todo o restante é convertido em formas insolúveis no solo, resultando em um processo dispendioso tanto financeiramente quando ambientalmente (SOUCHIE e ABOUD, 2007; LACAVA e AZEVEDO, 2013; AHEMAD e KIBRET, 2014; QIN *et al.*, 2015; MATOS *et al.*, 2017; WALIA *et al.*, 2017; SOLANKI; KUNDU; NEHRA, 2018; PARRAY, MIR, SHAMEEM, 2019).

As RPCP são capazes de solubilizar formas inorgânicas de fosfato, como consequência da liberação de ácidos orgânicos secretados por diferentes gêneros bacterianos, pois esses ácidos competem com o fosfato pelos sítios de adsorção no solo, aumentando a disponibilidade desse elemento para os vegetais (HAYNES, 1984; ROSENBLUETH e MARTÍNEZ-ROMERO, 2006; AHEMAD e KIBRET, 2014; ZAIDI *et al.*, 2015; AWAIS *et al.*, 2017; YU *et al.*, 2019). Bactérias dos gêneros *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus* e *Serratia* já foram descritas pela capacidade de solubilizar fosfato inorgânico (VERMA; LADHA; TRIPATHI, 2001; BHATTACHARYYA e JHA, 2012; GUPTA; PANWAR; JHA, 2013; CASTRO *et al.*, 2014; SINGH *et al.*, 2015; BATISTA *et al.*, 2018).

Portanto, a utilização de RPCP solubilizadoras de fosfato como produtos biológicos para a maximização do aproveitamento de fertilizantes fosfatados químicos ou do fósforo presente no solo é interessante pois, além de incrementar o desenvolvimento vegetal também reduz a necessidade do uso de fertilizantes manufaturados, diminuindo os impactos ambientais (DUARTE *et al.*, 2014; PREININGER *et al.*, 2018).

2.2.1.4 Controle biológico de fungos fitopatogênicos por rizobactérias

A principal causa de perdas de produtividade na agricultura são as pragas e doenças que prejudicam as plantações, sendo fungos os agentes fitopatogênicos de 85% das doenças que acometem culturas de grande importância econômica (BUENO e FISCHER, 2006; ZAMBOLIM, 2016). Podemos citar como exemplos destes fungos *Sclerotinia sclerotiorum*, fitopatógeno em culturas de algodão, feijão, soja, dentre outras (BOLAND e HALL, 1994); *Moniliophthora perniciosa*, agente da doença “vassoura-de-bruxa” nos cacauzeiros (COSTA *et al.*, 2010); *Fusarium solani*, fitopatógeno de soja, pimenta, feijão, dentre outros (NELSON e TOUSSOUN, 1989; COLEMAN, 2016); *Sphaceloma sp.* (CNPUV 102), que causa doenças em culturas de avelãs, citros e uvas (BROOK, 1973; MINUTOLO *et al.*, 2016); *Ceratocystis paradoxa*, fitopatógeno de abacaxi, banana, cana-de-açúcar, etc. (KANNANGARA, DHARMARATHNA, JAYARATHNA; 2017); *Alternaria alternata*, agente causador de doenças em tabaco, citros, maçãs, etc. (HOU *et al.*, 2016); *F. proliferatum*, fitopatógeno de culturas de cebolas, alhos, trigo, dentre outras (STANKOVIC *et al.*, 2007); *Colletotrichum sp.*, agente causador de doenças na manga, abacate e diversos outros frutos (PHOULIVONG *et al.*, 2010); *F. verticillioides*, fitopatógeno de milho (PROCTOR *et al.*, 2006); *Phytophthora sojae*, fitopatógeno da soja (TYLER, 2007); *Rhizopus microsporus*, agente causador de patologias em

milho, girassol, arroz e outros (SHTIENBERG, 1997; SANTIAGO *et al.*, 2008); e *F. oxysporum*, fitopatígeno de algodão, feijão e diversas outras culturas (PASTOR-CORRALES *et al.*, 1987; ASSIGBETSE *et al.*, 1994).

Fungicidas são a opção mais eficiente no controle das doenças ocasionadas por fungos fitopatogênicos, mas devido ao uso indiscriminado e em excesso tem gerado grandes problemas ambientais e de saúde (PAL; GARDENER, 2006). Nas últimas décadas, foram detectados diversos problemas ambientais relacionados a aplicação de fungicidas, como a contaminação de sistemas hídricos, a eliminação de insetos controladores de pragas, microrganismos controladores de fitopatógenos e o desenvolvimento de cepas de patógenos resistentes a antibióticos convencionais (LACAVA e AZEVEDO, 2014; DAS; DEVI; YASMINE, 2015), além de problemas de saúde pública. Segundo o Ministério da Saúde, no Brasil, aproximadamente 400 mil pessoas são intoxicadas por ano pelos agrotóxicos e, destas, 4 mil chegam a óbito (LIMA BOHNER; ARAÚJO; NISHIJIMA, 2013).

Entre as opções para contorno do problema, está o controle biológico (ARAÚJO *et al.*, 2014), que pode ser definido como a redução de uma espécie-alvo danosa à cultura de interesse utilizando outra espécie para este fim, como predadores naturais, parasitas, dentre outros (MELO AZEVEDO, 1998).

A ação de RPCP com potencial de biocontrole consiste na interação entre o agente de biocontrole e o agente fitopatogênico, com a inibição deste último. As RPCP habitam o mesmo nicho que os fitopatógenos, necessitando utilizar estratégias para contornar este conflito e garantir sua sobrevivência, tais como antibiose, competição por espaço e nutrientes, parasitismo, e de indução de resistência sistêmica (HANDELSMAN; STABB, 1996; LACAVA *et al.* 2018; CHENNIAPPAN *et al.*, 2019). Portanto, é de se esperar que atuem na inibição dos patógenos causadores de doenças radiculares (MELO, 1998).

A antibiose é a produção de metabólitos secundários com atividade antibiótica, capazes de matar ou prejudicar o crescimento e a reprodução de fitopatógenos por meio de destruição de componente celulares ou inibição do metabolismo (GRIFFIN, 2014; GUPTA *et al.*, 2015; ZHAO, XU; LAI, 2018). Numa relação de parasitismo, o parasita obtém seus nutrientes do hospedeiro e acaba por prejudicar seu metabolismo e seus componentes estruturais, podendo leva-lo a morte (MELO, 1996).

A penetração ativa da bactéria nas raízes provoca a produção de compostos pela planta que atuam sobre patógenos ou alteram sua morfologia como, por exemplo, o aumento da parede celular por deposição de lignina e glucanas e aumento da espessura da cutícula, bem como a síntese de fitoalexinas. Isso dificulta a entrada do patógeno e o seu desenvolvimento na planta

hospedeira, sendo esse mecanismo nomeado de indução de resistência sistêmica (IRS) (PEIXOTO NETO *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2018).

Muitos estudos já apontaram alguns gêneros de bactérias encontradas na rizosfera como utilizáveis no controle biológico de fitopatogênicos, sendo os gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* os mais relatados como antagonistas destes (AHEMAD e KIBRET, 2014; GRAÇAS *et al.*, 2015; LACAVA *et al.*, 2018).

2.3 Produção de enzimas por rizobactérias

As enzimas são, em sua maioria, proteínas que atuam como catalisadoras de reações químicas de forma específica sendo fundamentais para qualquer processo bioquímico (NELSON e COX, 2014).

O setor industrial está em constante pressão para usar mais processos que beneficiem o meio ambiente e para procurar novos métodos que tornem seus produtos mais competitivos. As enzimas microbianas estão ganhando mercado, substituindo a catálise química convencional em muitos processos industriais devido à pressão por produtos ecologicamente sustentáveis e devido a ampla disponibilidade, baixo custo de produção, ampla especificidade pelo substrato, diferentes características físico-químicas e suscetibilidade de manipulação genética frente as enzimas de origem animal e vegetal (LIU e KOKARE, 2017). As enzimas microbianas vêm sendo utilizadas com maior frequência nas áreas de processamento de alimentos, fabricação de detergentes, têxteis e produtos farmacêuticos, terapia médica e biologia molecular (CARRIM, BARBOSA; VIEIRA, 2006; VERMELHO *et al.*, 2013).

Assim, se torna interessante o estudo de microrganismos com capacidades de quebrar e modificar substratos específicos, com diferentes variáveis em relação à pH, temperatura, etc. e, como há entre os microrganismos associados com as plantas muitas destas capacidades ainda não descritas, acabam por ser objetos perfeitos para o estudo de novas enzimas (LACAVA e AZEVEDO, 2013; GUPTA *et al.*, 2015).

As principais atividades enzimáticas apresentadas pelos microrganismos são as amilases, celulasas, lipases, esterases, pectinases e proteases (MONTEIRO e SILVA, 2009; CASTRO *et al.*, 2014; SILVA, 2015).

Nas células vegetais, microrganismos produzem amilases para degradar o amido, um polímero de glicose, utilizando esta molécula como fonte de energia para seu metabolismo (ARAÚJO e MARTINS, 2018). Sua aplicação industrial pode servir como aditivos em detergentes, na sacarificação de amido e nas indústrias de alimentos, fermentação, papel e têxtil.

Assim, a busca de microrganismos amilolíticos se justifica pelo amplo espectro de utilização de amilases em várias áreas industriais (ANDRADE, 2019).

As lipases e esterases constituem um importante grupo de enzimas que estão associadas ao metabolismo e a hidrólise dos lipídeos. Suas principais aplicações envolvem a produção de detergentes, produção de laticínios, processamento de óleos, biotransformações, produtos farmacêuticos, produção de agroquímicos, pesticidas e inseticidas (LUZ *et al.*, 2016; LIU; KOKARE, 2017; PAMPHILE *et al.*, 2017; PÉREZ *et al.*, 2019).

As proteases catalisam a quebra das ligações peptídicas e participam em inúmeros processos fisiológicos com várias aplicações nas indústrias de detergente e de alimentos. Com intuito de diminuir a quantidade de poluentes relacionados ao tratamento de couro, a utilização de proteases se apresenta como uma saída “ambiental” na substituição da utilização de compostos tóxicos e poluentes (NIGAM, 2013; PAMPHILE *et al.*, 2017).

Celulases de origem microbiana são amplamente utilizadas nas indústrias de papel, vinho, ração animal e têxtil, bem como para produção de biocombustível, processamento de alimentos vegetais tais como suco de frutas, extração de óleo de oliva e carotenoides, além de manejo de efluentes (GUPTA *et al.*, 2011a). Os efluentes gerados em agroindústrias e campos de plantio contêm grande quantidade de celulose não utilizada, o que acaba gerando poluição ambiental caso o descarte não seja adequado. Atualmente, porém, estes rejeitos podem ser utilizados para produção de derivados com elevado valor agregado, como enzimas, açúcares, biocombustíveis e outros compostos químicos (KUHAD *et al.*, 2010; GUPTA *et al.*, 2011a; GUPTA *et al.*, 2011b).

Pectinases são utilizadas na indústria têxtil com diversas atuações tais como degradar a camada de pectina que recobre as fibras de celulose, liberando-as para posterior processamento, tratar o resíduo líquido e a degomagem das fibras naturais, maceração das fibras vegetais, na biopreparação de algodão e, no polimento enzimático de tecidos mistos de juta e algodão. Em algodão cru, nas condições adequadas substitui o uso da soda cáustica e gera produtos de alta qualidade para posterior tingimento e processo de tecelagem com menor consumo de energia (MONTEIRO e SILVA, 2009).

2.4 Antibiose contra patógenos humanos

Originada nas tradições milenares chinesas e indianas e muito utilizada até os dias atuais, a medicina herborística é, por definição, a aplicação de substâncias químicas naturais obtidas de diversos organismos para o tratamento de doenças (DA SILVA ALMEIDA, 2004); dentre estes organismos estão as plantas medicinais, a partir das quais pode-se produzir chás,

pomadas, cápsulas ou tinturas com aplicações clínicas (REMPEL, 2019), sendo umas das maiores fontes para bioprospecção de compostos naturais em conjunto com sua microbiota associada (LING *et al.*, 2015; PIZA *et al.*, 2015; LACAVA e SOUSA, 2016).

Os antibióticos representam uma forma de terapia de grande sucesso na medicina que protegeram a humanidade de doenças antes letais, por isso considerados como ferramentas indispensáveis no combate contra infecções bacterianas. Por definição, antibioticoterapia é o tratamento de pacientes com sintomatologia clínica de infecção microbiana pela administração de substâncias antimicrobianas, com o objetivo de cura da doença infecciosa (cura clínica) ou da erradicação do agente infeccioso situado em um determinado foco de infecção (cura microbiológica). Essa terapia é utilizada após diagnóstico preciso ou presuntivo da etiologia do processo infeccioso, fundamentado nos relatos do paciente e nos exames clínicos e laboratoriais (PIÑEIRO *et al.*, 2019). O uso indiscriminado e irresponsável de antibióticos, terapêutica ou profilaticamente, humano ou veterinário, passando ainda pelo uso no crescimento animal e propósitos agrícolas, tem favorecido uma pressão seletiva, que tem como resultado a seleção e predominância de espécies cada vez mais resistentes, que alteram os níveis de morbidade e mortalidade das doenças infecciosas e elevam o custo dos tratamentos hospitalares, constituindo um grande problema à saúde global (LIN *et al.*, 2015). O resultado disso é a necessidade de novos antibióticos mais potentes para serem empregados no tratamento desses microrganismos resistentes (PAULA *et al.*, 2016).

Na comunidade microbiana do solo estão as actinobactérias, um filo de bactérias filamentosas Gram-positivas, interessantes de serem prospectadas nesse aspecto visto que são reconhecidas por serem produtoras de enzimas, pigmentos, substâncias com ações antibiótica, antitumoral, anti-helmíntica e antifúngica, dentre outras (FERREIRA *et al.*, 2016). Bactérias rizosféricas de plantas medicinais do Cerrado têm sido isoladas e estudadas visando obter variada aplicação biotecnológica, como fonte potencial para a identificação e produção de metabólitos de interesse biotecnológico, incluindo novos antibióticos (ROMANO, 2015; PIMENTEL *et al.*, 2015; PIZA *et al.*, 2015; PIZA *et al.*, 2016).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo geral o isolamento e a caracterização de bactérias rizosféricas associadas à lobeira (*Solanum lycocarpum* st. Hil.) com potencial biotecnológico para promoção de crescimento vegetal e produção de enzimas e agentes antimicrobianos . Para isso, os objetivos específicos foram:

3.2 Objetivos específicos

- Isolar a comunidade bacteriana cultivável associada a rizosfera de *S. lycocarpum* st. Hil.;
- Avaliar *in vitro* o potencial para fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato e produção de ácido indol acético pelos isolados bacterianos rizosféricos obtidos;
- Avaliar *in vitro* o potencial de antagonismo frente a fungos fitopatogênicos;
- Avaliar *in vitro* a produção das enzimas celulase, amilase, protease, lipase e esterase pelos isolados bacterianos;
- Avaliar *in vitro* a antibiose frente à patógenos humanos; ,
- Identificar os isolados bacterianos com melhores resultados, nos testes *in vitro*, por meio do sequenciamento do rDNA 16S.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local da realização do trabalho e coleta do material vegetal

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas - LaMiB, do Departamento de Morfologia e Patologia localizado na Universidade Federal de São Carlos, *campus* São Carlos, São Paulo, Brasil.

Amostras da rizosfera de três indivíduos da espécie *S. lycocarpum* foram coletadas, nas mesmas condições climáticas, na reserva ambiental do cerrado (21°58', 47°52'W) na Universidade Federal de São Carlos, estado de São Paulo, Brasil, no mês de março, pela manhã. Foram coletadas cerca de 50g do solo aderido as raízes de cada indivíduo, a 25cm de profundidade, utilizando sacos de autoclave esterilizados para acondicionamento e transferência imediata para o Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas, onde foram realizados os procedimentos para obtenção das colônias.

4.2 Obtenção, purificação e armazenamento dos isolados de rizobactérias

Para o isolamento das rizobactérias, as três amostras coletadas de diferentes indivíduos foram homogeneizadas e então pesados 10g de cada amostra, sendo adicionados em 90 mL⁻¹ de solução tampão PBS esterilizada (NaCl 8,0g; KCl 0,2g; Na₂HPO₄ 1,44g; KH₂PO₄ 0,2g; 1000 mL⁻¹ de água destilada; pH 7,4) em *erlenmeyers* previamente autoclavados, os quais foram agitados durante 60 minutos a 150 rpm. Procedeu-se então, em tampão PBS, as diluições seriadas, de fator 10, das suspensões de solo obtidas.

Foram adicionadas alíquotas de 0,1mL das diluições seriadas utilizadas e espalhadas com o auxílio de uma alça de Drigalski, em duplicata, em placas de Petri contendo o meio de cultura *Triptona Soja Ágar* (TSA) (Kasvi) e *International Streptomyces Project 2* (ISP2) (que favorece o crescimento de actinobactérias) (suplementados com benlate (50µg.mL⁻¹) para evitar contaminação fúngica) e incubadas invertidas à temperatura de 28°C por 48 horas.

As colônias obtidas foram selecionadas aleatoriamente para purificação, que foi feita por meio de estrias de esgotamento em placas de Petri contendo os mesmos meios de cultura (TSA e ISP2), então incubadas invertidas por mais 48 horas.

Depois de confirmada a pureza das culturas, as linhagens bacterianas foram inoculadas em microtubos de 1,5 mL contendo meio *Tryptic Soy Broth* (TSB) 100% (Kasvi) suplementado com glicerol 50% e armazenados em freezer a -80°C.

As linhagens obtidas receberam códigos para facilitar a apresentação dos dados. Inicialmente, foi atribuída a letra "T" ou "A", relativo ao meio do qual a colônia foi isolada

(sendo “T” remetendo à TSA e “A” à ISP2), seguidas de um número (de um a três) de acordo com a amostra da qual o isolado foi obtido. Todos os isolados receberam a sigla LRZ, cujo significado é “oriundos de rizosfera de lobeira” e números sequenciais para diferenciação das linhagens.

4.3 Seleção de rizobactérias com potencial agrícola e biotecnológico

4.3.1 Ensaio de avaliação de promotores de crescimento vegetal *in vitro*

4.3.1.1 Fixação biológica de nitrogênio (FBN)

A capacidade dos isolados em realizar o processo de FBN foi avaliada qualitativamente *in vitro*. O meio de cultura NFb, livre de nitrogênio, foi preparado contendo a seguinte composição em g.L⁻¹: ácido málico, 5; K₂HPO₄, 0,5; MgSO₄.7H₂O, 0,2; NaCl, 0,1; CaCl₂.2H₂O, 0,02; KOH, 4,5; e em mL: solução de micronutrientes, 2; solução de azul de bromotimol (0,5% em 0,2 KOH), 2; solução de FeEDTA (solução 1,64%), 4; e solução de vitaminas, 1; pH 6,8 (DÖBEREINER *et al.*, 1995). Foram utilizados tubos de ensaio de 13x 100 mm, contendo 4 mL de meio de cultura NFb semissólido, onde as linhagens foram inoculadas com alça de platina, a partir de culturas crescidas em meio NFb semissólido, foram realizadas três repetições para cada isolado (QUECINE *et al.*, 2012; ARAÚJO *et al.*, 2014). A incubação foi realizada por 96 horas a 28°C. Após esse período foi verificada a formação de película de crescimento próximo à superfície dos tubos. Esse procedimento foi realizado mais uma vez. A reinoculação sucessiva das linhagens é realizada para confirmar se o crescimento não está ocorrendo à custa de reservas de nitrogênio das células, bem como para verificar a estabilidade dessa característica das linhagens (CATTELAN, 1999).

4.3.1.2 Produção de ácido indol acético (AIA)

Para a detecção e quantificação da produção de AIA, utilizou-se a metodologia originalmente proposta por Bric *et al.* (1991), que foi adaptado para o método quantitativo (HUSEN, 2003). Os isolados bacterianos foram cultivados em tubos de ensaio contendo 3 mL de meio tripticaseína de soja (TSB) 10% + L-triptofano (5 mM) e incubadas a 28°C no escuro por 72 horas, sob agitação constante. Após este período coletou-se 2 mL da suspensão bacteriana, centrifugou-se por 5 minutos a 10.000 g e 900 µL do sobrenadante foi coletado e colocados em cubetas de 1,5 mL e adicionados 400 µL do Reagente de Salkowski (2 mL de FeCl₃ (0,5 mol L⁻¹) e 98 mL de HClO₄ (35%)). Após 30 minutos de incubação a 28°C foi

realizada a leitura das amostras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 520 nm de absorvância. Como controle negativo utilizou-se apenas o meio de cultura TSB 10% com L^{-1} triptofano (5 mM) acrescido do Reagente de Salkowski. As leituras foram normalizadas por meio de curva padrão, calculada com base em doses conhecidas do hormônio sintetizado (Sigma), nas seguintes concentrações: 1, 5, 25, 50, 75; 100; 125; 150; 175 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A coloração rosa-avermelhada das amostras indicou a produção de auxinas. Os testes foram realizados em triplicata.

4.3.1.3 Solubilização de fosfato inorgânico

Para a análise da capacidade de solubilizar fosfato sessenta e três isolados bacterianos foram inoculados, em quadruplicata, em meio de cultura sólido contendo: 10 g.L^{-1} de glicose; 5 g.L^{-1} de NH_4Cl ; 1 g.L^{-1} de NaCl ; 1 g.L^{-1} de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,8 g.L^{-1} de CaHPO_4 ; 15 g.L^{-1} de ágar; pH 7,2 a 28°C por 120 horas. A presença de halo incolor ao redor das colônias indicou a capacidade dos isolados em solubilizar fosfato inorgânico. Os isolados com melhores resultados foram selecionados visualmente para fins semi-quantitativos, onde foram medidos os diâmetros dos halos claros formados ao redor de cada colônia (Dh), com auxílio de um paquímetro, e os diâmetros das colônias correspondentes (Dc). Com os dados, pôde-se calcular a razão: (Dh)/(Dc). De modo que linhagens que solubilizam mais fosfato, obtêm maiores razões e, portanto, apresentam maiores Índices de Solubilização de Fosfato (ISF) (BERRAQUERO *et al.*, 1976). De acordo com Silva Filho e Vidor (2000), a solubilização pode ser classificada como baixa ($\text{ISF} < 2$), média ($2 < \text{ISF} < 3$) e alta ($\text{ISF} > 3$).

4.4 Atividade enzimática

A atividade enzimática dos isolados bacterianos foi avaliada qualitativamente. Inicialmente, os isolados foram crescidos em meio tripticaseína de soja (TSA) e em seguida semeados em placas de Petri contendo os meios de cultura específicos para cada enzima, após o crescimento microbiano foi observado a presença ou ausência de determinada atividade enzimática, por meio de formação de halo em torno da colônia. Os isolados bacterianos foram analisados quanto a sua capacidade de produzir as enzimas amilases; celulasas; lípases, esterases; proteases e pectinases (pectato liases e poligalacturonase) (ARAÚJO *et al.*, 2014).

4.4.1 Atividade amilolítica

Os isolados foram cultivados em meio mínimo M9 contendo 200 mL^{-1} de solução estoque (64 g.L^{-1} de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 15 g.L^{-1} de KH_2PO_4 ; 2,5 g.L^{-1} de NaCl ; 5 g.L^{-1} de NH_4Cl);

2 mL⁻¹ de MgSO₄ 1M; 0,1 mL⁻¹ de CaCl₂ 1M, 10 g.L⁻¹ de glicose e 15 g.L⁻¹ de ágar, pH 7,2 contendo 0,5% de extrato de levedura e 1% de amido solúvel a 28°C durante 48 horas. Após o crescimento bacteriano foram adicionados 10 mL de solução de Iodo e então lavados quase que imediatamente com água. A presença de um halo incolor em torno da colônia indicou a produção de amilase.

4.4.2 Atividade celulolítica

As bactérias foram cultivadas em meio mínimo M9 contendo: 200mL⁻¹ de solução estoque (64 g.L⁻¹ de Na₂HPO₄.7H₂O; 15 g.L⁻¹ de KH₂PO₄; 2,5 g.L⁻¹ de NaCl; 5 g.L⁻¹ de NH₄Cl); 2 mL⁻¹ de MgSO₄ 1M; 0,1 mL⁻¹ de CaCl₂ 1M, 10 g.L⁻¹ de glicose e 15 g.L⁻¹ de ágar, pH 7,2 contendo 0,5% de extrato de levedura, 1% de carboximetilcelulose (CMC) a 28°C durante 48 horas. Após o crescimento bacteriano foram adicionados 10mL do corante Vermelho Congo, depois de 15 minutos as placas foram lavadas com NaCl 5M segundo a metodologia proposta por Teather e Wood (1982). A presença de um halo amarelado ou incolor em torno da colônia após a adição de NaCl indicou a secreção de celulase.

4.4.3 Atividade lipolítica e esterolítica

As bactérias foram cultivadas em meio de lipase/esterase contendo: 10 g.L⁻¹ de peptona; 5 g.L⁻¹ de NaCl; 0,1 g.L⁻¹ de CaCl₂.2H₂O e 15 g.L⁻¹ de Agar, pH 7,4. Após a esterilização do meio de cultura foi adicionado 1% (v/v) de Tween 20, previamente esterilizado. Após a incubação a 28°C durante 48 horas, a formação de um halo formado por cristais ao redor da colônia bacteriana indicou a secreção de lípases. A metodologia utilizada para a avaliação da produção de esterase foi a mesma utilizada para a lipase, porém após a esterilização do meio de cultura foi adicionado 1% (v/v) de Tween 80, previamente esterilizado. A formação de um halo claro ao redor da colônia bacteriana indicou a secreção de esterases.

4.4.4 Atividade pectinolítica

As bactérias foram cultivadas em meio mínimo M9 contendo: 200 mL⁻¹ de solução estoque (64 g.L⁻¹ de Na₂HPO₄.7H₂O; 15 g.L⁻¹ de KH₂PO₄; 2,5 g.L⁻¹ de NaCl; 5 g.L⁻¹ de NH₄Cl); 2 mL⁻¹ de MgSO₄ 1M; 0,1 mL⁻¹ de CaCl₂ 1M, 10 g.L⁻¹ de glicose e 15 g.L⁻¹ de ágar, pH 5,0 contendo 0,5% de extrato de levedura, 1% de pectina (v/v) a 28°C durante 48 horas. Após o crescimento bacteriano foram adicionados 10 mL de lugol e em seguida efetuou-se a lavagem com água. A presença de um halo incolor em torno da colônia indicou a secreção de pectinases. O pH desse meio pode ser modificado para caracterização de duas diferentes pectinases: o meio

com pH 8,0 é utilizado para caracterização de pectato liase e o meio com pH 5,0 para poligalacturonase.

4.4.5 Atividade proteolítica

As bactérias foram cultivadas em meio Protease contendo: 5 g.L⁻¹ de triptona; 2,5 g.L⁻¹ de extrato de levedura; 1 g.L⁻¹ de glicose; 2,5 g.L⁻¹ de NaCl e 15 g.L⁻¹ de ágar, pH 7,0. Após a esterilização adicionou-se 100mL de leite desnatado. Após a incubação a 28°C durante 48 horas, a formação de um halo ao redor da colônia indicou a secreção de proteases.

4.5 Atividade antagonica contra fungos fitopatogênicos

Para analisar o potencial antagonico dos isolados rizosféricos da lobeira frente à fungos fitopátogenos foram realizados testes de antagonismo *in vitro*. Os fungos fitopatogênicos utilizados nos ensaios foram: *Alternaria alternata*, *Ceratocystis paradoxa*, *Colletotrichum* sp., três cepas de *Fusarium oxysporum* (cepa ATCC 2163, uma cepa isolada de feijão e outra do algodão), *F. proliferatum*, *F. solani*, *F. verticillioides*, *Moniliophthora perniciosa*, *Phytophthora sojae*, *Rhizopus microsporus*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sphaceloma* sp.. (CNPUV 102), pertencentes a Coleção de Culturas Microbianas do Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas - LaMiB, Departamento de Morfologia e Patologia localizado na Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, *campus* São Carlos, São Paulo, Brasil.

Foi realizada uma seleção massal com todos os isolados obtidos, em duplicata, onde as bactérias foram repicados em forma de estrias em quatro pontos equidistantes nas extremidades das placas contendo o meio batata-dextrose-ágar (BDA) (ou *Potato Dextrose Agar* (PDA)) e discos de meio BDA, com as estruturas dos fungos fitopatogênicos medindo 0,5 cm de diâmetro foram depositadas no centro de cada placa (figura 4.6).

As placas foram incubadas a 28°C. Uma placa controle contendo apenas um disco com micélio do fitopatógeno sem o repique de isolados bacterianos foi utilizada para indicar o momento de avaliar a inibição (momento em que o fungo atingiu as extremidades da placa), realizada por meio de análise visual.

4.5.1 Técnica de cultura pareada ou pareamento direto *in vitro*

Nesta segunda etapa do ensaio de antagonismo, discos contendo cerca de 0,5cm de diâmetro cortados de placas de Petri contendo os fungos fitopatogênicos já cultivados em meio BDA foram colocados em um dos lados de uma outra placa de Petri e, do outro lado, os isolados bacterianos rizosféricos selecionados na seleção massal foram inoculados com o auxílio de um

palito descartável e esterilizado, de acordo com o método da cultura pareada ou pareamento direto (MARIANO, 1993; ASSUMPCÃO *et al.*, 2009; SILVA, 2015). O ensaio foi realizado em triplicata. Para a avaliação, foram efetuadas medições do diâmetro das colônias, em três sentidos diametralmente opostos, com auxílio de um paquímetro, definindo-se uma média para cada colônia (Figura 4.1). A percentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) foi calculada pela fórmula de Menten *et al.* (1976), onde: $PIC = [(diâmetro\ médio\ do\ controle - diâmetro\ médio\ do\ tratamento) / diâmetro\ médio\ do\ controle] \times 100$. Os tratamentos onde não houve inibição de crescimento micelial receberam valor igual a zero.

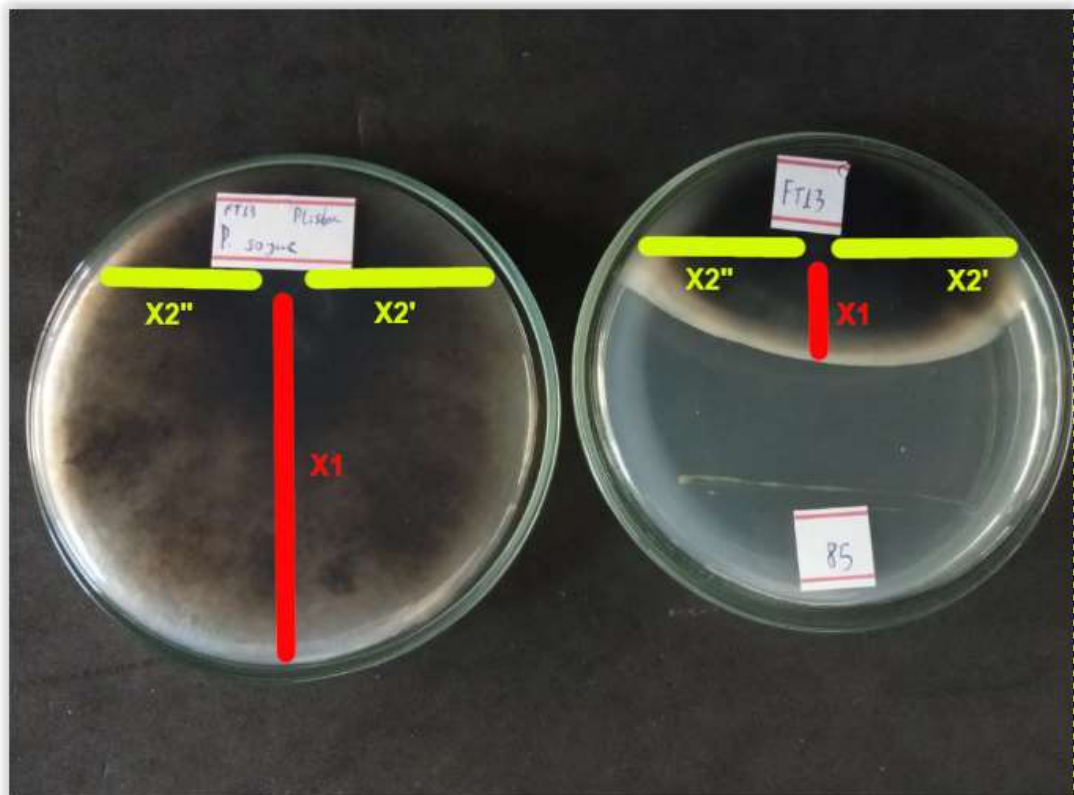


Figura 4.1: Pareamento direto *Burkholderia territorii* (endofítico) vs *Phytophthora sojae* (fitopatígeno), agente causador da “podridão-de-fitóftora” da soja, com as medidas utilizadas para o cálculo de percentual de inibição micelial (PIC), onde: X2' e X2'' (amarelo) correspondem as medidas tomadas para o cálculo do diâmetro micelial médio e X1 (vermelho) corresponde a medida relativa a distância média de inibição do crescimento micelial. Fonte: autor.

4.6 Antibiose frente à patógenos humanos

O método do bloco de gelose é derivado do método sobrecamada (PUGSLEY, 1987) no qual, após a aplicação de blocos de ágar com isolados rizobacterianos ali cultivados, o composto bioativo sintetizado se difunde pelo próprio ágar para o meio de cultura inoculado previamente com um patógeno, a fim de verificar se o microrganismo do bloco de ágar produz ou não antibiose.. Para este ensaio foram utilizados os patógenos clínicos *Staphylococcus aureus* ATCC 25922; *Escherichia coli* ATCC 25923 e *Candida albicans* ATCC 10231, que foram reativados em meio *Tryptona Soja Ágar* (TSA), por 24-48 h a 37 °C. Depois da reativação,

foram espalhados na superfície de placas contendo meio TSA com o auxílio de *swab*. Após o surgimento de uma camada microbiana formada pelas colônias homogêneas do patógeno, foram adicionados os blocos de ágar de vinte e seis isolados, selecionados por seus desempenhos nos testes de promoção de crescimento diretos (FBN, SF e produção de AIA) e, também, por identificação visual de antibiose entre si durante outros testes.

4.7 Identificação molecular dos isolados bacterianos

4.7.1 Extração de DNA bacteriano

Os isolados foram retirados do estoque a -80°C, transferidos para meio de cultura TSA 10% sólido e incubados a 28°C, até o aparecimento de colônias isoladas. Em seguida, os mesmos foram repicados em meio líquido TSB 100% por 48 horas a 28°C, sob agitação constante (150 rpm). A cultura bacteriana foi, então, centrifugada por 10 minutos a 10.000 g e os DNAs extraídos com o *Bacteria DNA Preparation Kit*, da Cellco (Cellco Biotec do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil), de acordo com as especificações do fabricante.

4.7.2 Amplificação do gene 16s rDNA pela reação de PCR

A amplificação do gene 16S rDNA dos isolados foi realizada pela técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR), com volume de 50 µL, com 2 µL de DNA-molde (aproximadamente 20 ng), 0,2 µM dos iniciadores V3F (5' CCAGACTCCTACGGGAGGCAG-3') e V6R (5' ACATTTTCACAACACGAGCTGACGA-3'), 200 µM de cada dCTP, dGTP, dATP e dTTP; 3,75 mM de MgCl₂, 2,5 U de Taq DNA polimerase e 1x tampão de Taq DNA polimerase. A PCR será realizada em termociclador, que será programado para gerar desnaturação inicial de 4 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 1 minuto a 62,5°C, 1 minuto a 72°C, e uma extensão final de 7 minutos a 72°C. A amplificação do fragmento de aproximadamente 1.400 pb será confirmada por eletroforese em gel de agarose (1,2%) juntamente com o marcador de peso molecular 1 Kb DNA.

4.7.3 Purificação do DNA, sequenciamento, edição e análise das sequências

Os fragmentos do gene 16S rDNA amplificados foram purificados por meio do *QIAquick® PCR purification Kit* (QIAGEN, Hilden, Germany), de acordo com as especificações do fabricante e encaminhadas para o sequenciamento, no laboratório Multiusuários Biomol, localizado no Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, *campus* Araraquara. As sequências obtidas a partir do gene

16S rDNA foram utilizadas para identificação dos isolados nos bancos de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information – <http://ncbi.nlm.nih.gov>), por meio do *Blastn*. Serão consideradas sequências com dissimilaridade menor ou igual a 3% com as do banco de dados. As sequências obtidas a partir do sequenciamento serão utilizadas para identificação dos isolados, em análise realizada pelo software MEGA X (KUMAR *et al.*, 2018), onde as sequências são comparadas à sequências-tipo com base nos resultados observados no *BLASTn*. Estas sequências foram obtidas nas bases de dados do NCBI. O dendograma foi construído com base no alinhamento realizado pelo *Muscle* (EDGAR, 2004) que, posteriormente, foi convertido numa matriz de distância determinada pelo parâmetro *Maximum Composite Likelihood* (TAMURA, NEI, KUMAR, 2004), sendo agrupada pelo método de *Neighbor-Joining* (SAITOU; NEI, 1987).

5. RESULTADOS

5.1 Seleção de rizobactérias com potencial para promoção de crescimento vegetal

Foram obtidos 131 isolados, os quais foram avaliados quanto à capacidade de fixação de nitrogênio, produção de AIA e solubilização de fosfato, conforme apresentado na Tabela 5.1. Para os ensaios de antibiose a patógenos de importância clínica foram selecionados os melhores isolados nestes testes anteriores (fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de AIA e atividade enzimática). Para o ensaio de pareamento direto frente a fungos fitopatogênicos foram selecionados os melhores isolados do teste de seleção massal.

Tabela 5.1 Avaliação de indicadores de promoção de crescimento vegetal *in vitro* analisados para os isolados rizobacterianos associados à *Solanum lycocarpum* St. Hil.

Identificação	Código dos isolados	NFb	Fosfato Quantitativo (ISF)	Fosfato Qualitativo	AIA ($\mu\text{G.mL}^{-1}$)
1	T1LRZ1	-	3,143	+	106,04
2	T1LRZ2	-	-	-	7,23
3	T1LRZ3	-	-	-	4,62
4	T1LRZ4	-	-	-	4,47
5	T1LRZ5	-	-	-	2,90
6	T1LRZ6	-	3	+	81,86
7	T1LRZ7	+	-	-	3,20
8	T1LRZ8	-	-	-	4,62
9	T1LRZ9	-	-	-	16,71
10	T1LRZ10	-	-	-	5,29
11	T1LRZ11	-	-	-	8,95
12	T1LRZ12	-	-	-	2,75
13	T1LRZ13	-	-	-	14,69
14	T1LRZ14	-	-	+	13,20
15	T1LRZ15	-	-	-	1,63

Continua

Tabela 5.1: Avaliação de indicadores de promoção de crescimento vegetal *in vitro* analisados para os isolados rizobacterianos associados à *Solanum lycocarpum* St. Hil. (continuação)

Identificação	Código dos isolados	NFb	Fosfato Quantitativo (ISF)	Fosfato Qualitativo	AIA ($\mu\text{G.mL}^{-1}$)
16	T1LRZ16	+	-	+	6,86
17	T1LRZ17	-	-	-	2,68
18	T1LRZ18	+	-	-	9,84
19	T1LRZ19	-	-	-	5,29
20	T1LRZ20	-	-	-	4,17
21	T1LRZ21	-	-	+	6,86
22	T1LRZ22	-	1,167	+	14,69
23	T1LRZ23	+	-	-	3,35
24	T1LRZ24	-	-	-	6,71
25	T1LRZ25	-	-	-	0,07
26	A1LRZ1	-	2,571	+	11,93
27	A1LRZ2	-	-	+	2,46
28	A1LRZ3	-	2,75	+	7,23
29	A1LRZ4	+	3,143	+	108,72
30	A1LRZ5	+	-	+	0,96
31	A1LRZ6	-	-	-	0,51
32	A1LRZ7	-	3,167	+	106,71
33	A1LRZ8	+	-	-	0,29
34	A1LRZ9	-	-	-	5,89
35	A1LRZ10	-	-	-	32,98
36	A1LRZ11	-	2,91	+	0,51
37	A1LRZ12	-	-	-	0,66
38	A1LRZ13	-	-	+	3,50

Continua

Tabela 5.1: Avaliação de indicadores de promoção de crescimento vegetal *in vitro* analisados para os isolados rizobacterianos associados à *Solanum lycocarpum* St. Hil. (continuação)

Identificação	Código dos isolados	NFb	Fosfato Quantitativo (ISF)	Fosfato Qualitativo	AIA ($\mu\text{G.mL}^{-1}$)
39	A1LRZ14	-	3,571	+	134,10
40	A1LRZ15	+	1,25	+	33,95
41	A1LRZ16	+	-	+	9,99
42	A1LRZ17	-	1,571	+	11,71
43	A1LRZ18	-	-	-	0,51
44	A1LRZ19	-	-	+	22,98
45	A1LRZ20	-	-	-	5,59
46	A1LRZ21	-	1,143	+	33,35
47	T2LRZ1	+	-	-	3,87
48	T2LRZ2	-	-	+	6,26
49	T2LRZ3	-	-	+	0,51
50	T2LRZ4	-	-	-	7,23
51	T2LRZ5	+	-	-	2,90
52	T2LRZ6	-	-	-	4,32
53	T2LRZ7	-	-	+	4,47
54	T2LRZ8	-	-	-	1,49
55	T2LRZ9	-	1,125	+	3,87
56	A2LRZ1	-	-	-	5,74
57	A2LRZ2	+	2,714	+	24,02
58	A2LRZ3	-	-	-	3,95
59	A2LRZ4	-	-	+	0,51
60	A2LRZ5	-	-	-	5,51
61	A2LRZ6	-	-	-	5,96

Continua

Tabela 5.1: Avaliação de indicadores de promoção de crescimento vegetal *in vitro* analisados para os isolados rizobacterianos associados à *Solanum lycocarpum* St. Hil. (continuação)

Identificação	Código dos isolados	NFb	Fosfato Quantitativo (ISF)	Fosfato Qualitativo	AIA ($\mu\text{G.mL}^{-1}$)
62	A2LRZ7	-	2,222	+	15,96
63	A2LRZ8	+	4,571	+	1,93
64	T3LRZ1	+	-	+	1,26
65	T3LRZ2	+	-	-	8,13
66	T3LRZ3	+	-	-	6,93
67	T3LRZ4	-	4,77	+	78,13
68	T3LRZ5	-	-	-	83,05
69	T3LRZ6	-	-	+	90,96
70	T3LRZ7	+	1,125	+	4,25
71	T3LRZ8	+	-	-	0,51
72	T3LRZ9	+	2,667	+	2,46
73	T3LRZ10	+	-	-	5,89
74	T3LRZ11	+	-	+	3,20
75	A3LRZ1	-	-	-	0,51
76	A3LRZ2	+	3,285	+	3,50
77	A3LRZ3	-	-	-	31,26
78	A3LRZ4	-	-	+	2,60
79	A3LRZ5	+	4,833	+	2,46
80	A3LRZ6	-	-	+	4,47
81	A3LRZ7	-	-	+	7,16
82	A3LRZ8	-	-	-	10,59
83	A3LRZ9	-	-	-	4,47
84	A3LRZ10	+	-	-	3,65

Continua

Tabela 5.1: Avaliação de indicadores de promoção de crescimento vegetal *in vitro* analisados para os isolados rizobacterianos associados à *Solanum lycocarpum* St. Hil. (continuação)

Identificação	Código dos isolados	NFb	Fosfato Quantitativo (ISF)	Fosfato Qualitativo	AIA ($\mu\text{G.mL}^{-1}$)
85	A3LRZ11	+	4	+	5,29
86	T1LRZ26	+	-	-	3,13
87	T1LRZ27	+	-	-	5,29
88	T1LRZ28	-	-	-	1,26
89	T1LRZ29	-	-	-	4,47
90	T2LRZ10	+	-	+	7,01
91	T2LRZ11	+	1,423	+	9,02
92	T2LRZ12	-	-	+	10,81
93	T3LRZ12	-	-	+	15,22
94	T3LRZ13	-	-	-	0,51
95	T3LRZ14	-	-	-	1,26
96	A1LRZ22	+	3,143	+	3,57
97	A1LRZ23	-	-	-	8,35
98	A1LRZ24	-	1,143	+	81,86
99	A1LRZ25	+	1,115	+	84,10
100	A1LRZ26	-	-	-	0,51
101	A1LRZ27	+	1,167	+	4,40
102	A2LRZ29	-	-	-	10,51
103	A2LRZ30	-	-	+	0,51
104	A2LRZ31	-	-	-	0,96
105	A2LRZ32	-	-	-	0,51
106	A3LRZ16	-	-	-	0,51
107	A2LRZ33	+	-	+	5,89

Continua

Tabela 5.1: Avaliação de indicadores de promoção de crescimento vegetal *in vitro* analisados para os isolados rizobacterianos associados à *Solanum lycocarpum* St. Hil. (continuação)

Identificação	Código dos isolados	NFb	Fosfato Quantitativo (ISF)	Fosfato Qualitativo	AIA ($\mu\text{G.mL}^{-1}$)
108	A1LRZ29	-	-	+	17,75
109	A3LRZ12	+	-	+	29,77
110	A3LRZ13	-	-	-	9,47
111	A3LRZ14	-	-	-	0,51
112	A3LRZ15	+	1,117	+	5,07
113	A1LRZ28	+	1,333	+	6,11
114	A3LRZ17	+	1,5	+	8,05
115	T2LRZ13	-	-	-	9,47
116	T3LRZ15	+	1,143	+	5,14
117	T3LRZ16	-	-	-	81,86
118	A1LRZ30	+	1,25	+	11,19
119	A1LRZ31	+	1,167	+	38,57
120	A1LRZ32	+	4,384	+	4,32
121	A2LRZ34	-	-	-	0,51
122	A3LRZ18	+	-	-	56,49
123	A3LRZ19	-	-	+	7,68
124	A1LRZ33	-	-	-	0,51
125	A1LRZ34	-	-	-	7,01
126	T2LRZ14	-	-	-	0,37
127	A2LRZ35	-	-	-	3,05
128	T3LRZ17	-	-	-	5,81
129	A3LRZ20	-	-	-	3,43
130	A3LRZ21	-	-	-	0,51
131	A2LRZ36	-	-	-	0,51

Fonte: tabela elaborada pelo autor.

5.1.1 Fixação biológica de nitrogênio - FBN

Dentre os cento e trinta e um isolados rizobacterianos avaliados, quarenta e dois (32,1%) foram capazes de crescer e formar película em meio de cultura semissólido livre de nitrogênio, como demonstrado na Figura 5.1, indicando o potencial de FBN.

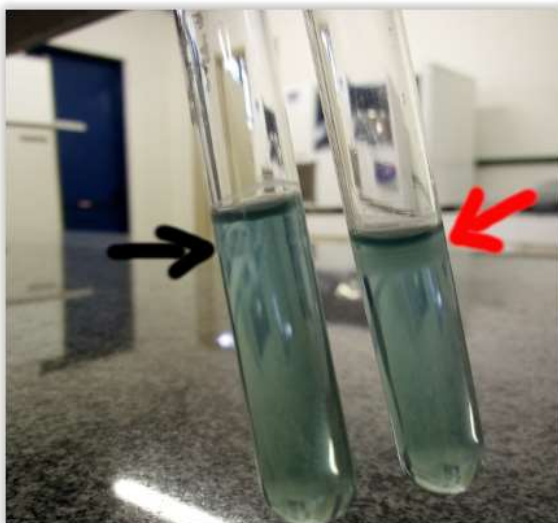


Figura 5. 1 Controle negativo (à esq.) e isolado positivo pra FBN (à dir.). A presença da película (indicada pela seta vermelha) mostra a realização de FBN pelo microrganismo. Sua falta (seta preta) indica a ausência dessa capacidade. Fonte: autor

5.1.2 Produção de ácido indol acético

Todos os isolados rizobacterianos avaliados foram capazes de produzir AIA, tornando a coloração do sobrenadante vermelho-rósea (Figura 5.2), com valores variando de $0,07 \mu\text{g.mL}^{-1}$ até $134,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (tabela 1). Os valores obtidos neste estudo foram comparados com os resultados obtidos por meio de curva padrão, calculada com base em doses conhecidas do hormônio sintetizado (Sigma), nas concentrações de 5, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.



Figura 5. 2 Quantificação de ácido indol acético em isolados positivos para a síntese. Fonte: autor.

5.1.3 Solubilização de fosfato

Dos cento e trinta e um isolados rizobacterianos avaliados quanto à capacidade de solubilização de fosfato em meio sólido contendo CaHPO_4 , sessenta isolados apresentaram halo em torno das colônias (Figura 5.3) representando 45,8% do total de isolados testados e indicando o potencial de solubilização de fosfato pelos mesmos. Destes, foram selecionados os isolados que possuíam os halos mais robustos para a avaliação quantitativa da solubilização de fosfato, de acordo com Silva Filho e Vidor (2000), classificando os isolados em três classes: Isolados com baixo potencial de solubilização ($\text{ISF} < 2$), com médio potencial de solubilização ($2 < \text{ISF} < 3$) e com alto potencial de solubilização ($\text{ISF} > 3$). Os isolados T1LRZ1, T1LRZ6, T3LRZ4, A1LRZ4, A1LRZ7, A1LRZ14, A1LRZ22, A1LRZ32, A2LRZ8, A3LRZ2, A3LRZ5 e A3LRZ11 apresentaram alto potencial de solubilização ($\text{ISF} > 3$). Os isolados T3LRZ29, A1LRZ1, A1LRZ3, A1LRZ11, A2LRZ2 e A2LRZ7 potencial médio. O restante dos isolados apresentou baixo potencial.

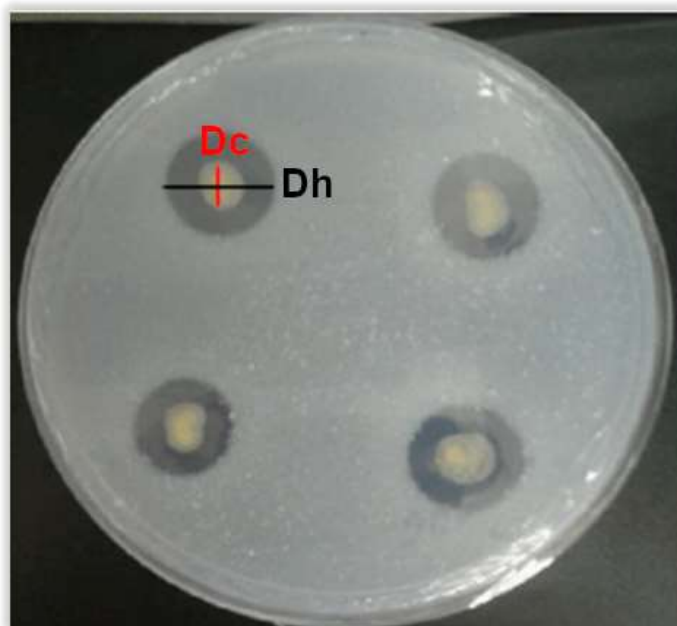


Figura 5. 3 Halo translúcido ao redor da colônia indica processo de solubilização de fósforo. Dc: diâmetro da colônia. Dh: diâmetro do halo. Fonte: Abreu (2016).

5.2 Produção enzimática

Devido a perdas no processo de armazenamento, foram avaliados quanto ao potencial de produção enzimáticas apenas cento e doze isolados. Foram considerados positivos aqueles que apresentaram halos de degradação característicos para cada enzima (Figura 5.4), conforme descrito no item 4.4.

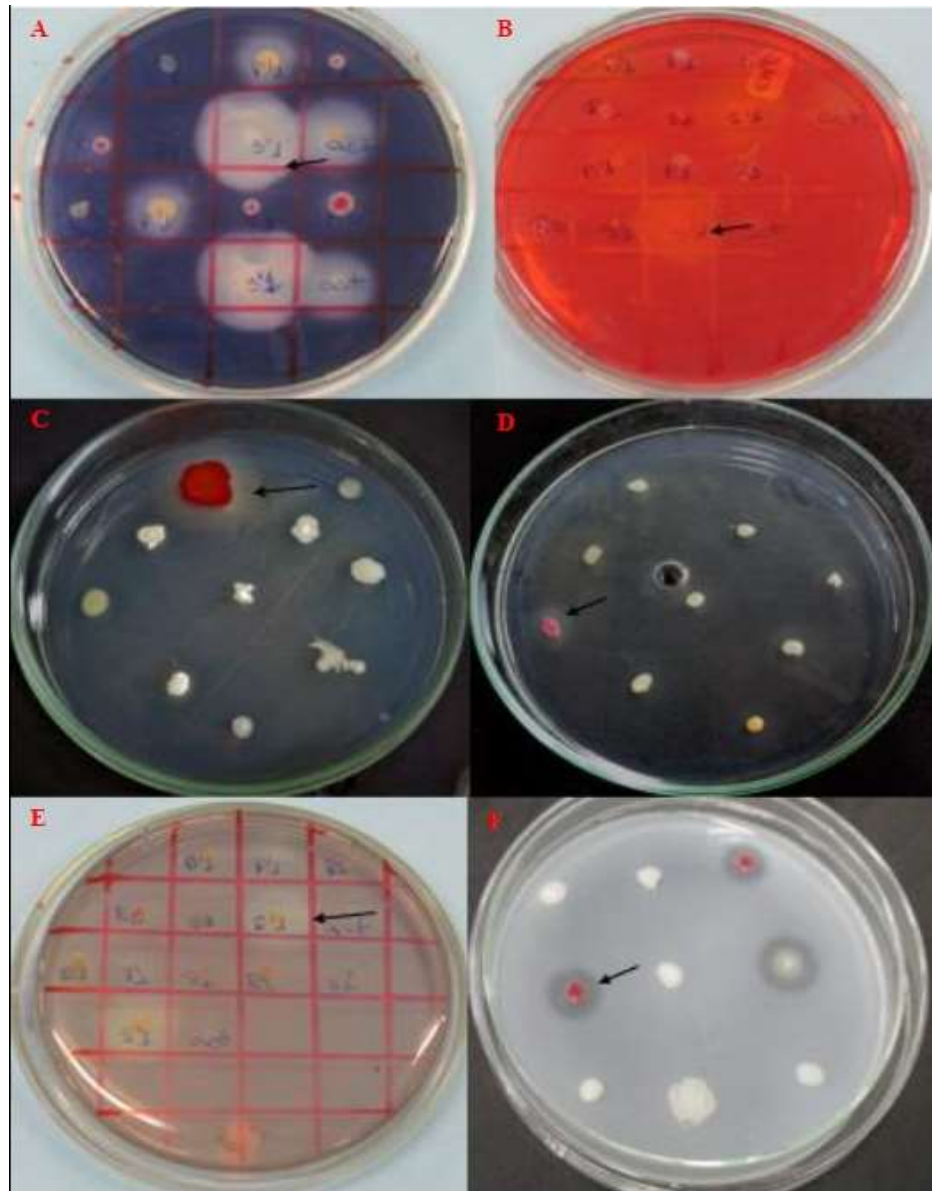


Figura 5.4 As setas indicam a atividade enzimática, com formação de halo; sendo A) produção de amilase, B) de celulase, C) de esterase, D) de lipase, E) de pectinase e F) de protease. Fonte: Machado (2015).

Dentre os isolados bacterianos avaliados, quarenta e oito (42,9% dos isolados avaliados) apresentaram atividade amilolítica, quarenta e oito (42,9% dos isolados avaliados) apresentaram atividade celulolítica, cinquenta e três (47,3% dos isolados avaliados) apresentaram atividade esterolítica, trinta e um (27,7% dos isolados avaliados) apresentaram atividade lipolítica, para a atividade pectinolítica vinte e cinco (22,3% dos isolados avaliados) apresentaram atividade enzimática da poligalacturonase, quarenta e cinco isolados para pectato liase (40,2% dos isolados avaliados) e sessenta e oito (60,7% dos isolados avaliados) apresentaram atividade proteolítica conforme descrito na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 Perfil enzimático dos isolados rizobacterianos associados a *Solanum lycocarpum* St. Hil.

Nº do isolado	Código do isolado	Protease	Lipase	Esterase	Pectato liase	Poli-galacturonase	Celulase	Amilase
1	T1LRZ1	+	-	-	-	-	-	-
2	T1LRZ2	+	-	-	-	-	+	-
3	T1LRZ3	+	-	-	+	-	-	+
4	T1LRZ4	+	-	-	+	-	+	+
5	T1LRZ5	+	+	-	+	-	+	-
6	T1LRZ6	-	-	-	+	-	+	-
7	T1LRZ7	-	+	+	+	-	-	+
8	T1LRZ8	+	-	-	-	-	+	+
9	T1LRZ9	+	+	-	+	-	+	+
10	T1LRZ10	+	-	+	+	-	+	+
11	T1LRZ11	+	-	+	+	-	+	+
12	T1LRZ12	+	-	+	+	-	+	+
13	T1LRZ13	+	-	-	-	-	+	-
14	T1LRZ14	-	+	+	+	+	-	+
15	T1LRZ15	+	-	-	-	-	+	-
16	T1LRZ16*							
17	T1LRZ17	+	-	+	+	-	+	+
18	T1LRZ18	-	-	-	-	-	-	-
19	T1LRZ19	+	-	+	+	+	+	+
20	T1LRZ20	+	-	-	-	-	+	-
21	T1LRZ21	+	-	+	+	+	-	+
22	T1LRZ22	+	+	+	+	-	-	+
23	T1LRZ23	+	-	-	-	-	+	-
24	T1LRZ24	+	-	+	+	+	+	-
25	T1LRZ25	+	-	-	+	+	+	-
26	A1LRZ1	+	+	+	+	-	-	-
27	A1LRZ2	-	+	-	+	-	-	-
28	A1LRZ3	-	-	-	-	-	-	-
29	A1LRZ4	-	+	+	-	-	-	-
30	A1LRZ5*							
31	A1LRZ6*							
32	A1LRZ7	+	-	-	-	-	-	-
33	A1LRZ8	-	-	+	-	-	-	-
34	A1LRZ9	+	-	+	+	-	-	-

Continua

Tabela 5.2: Perfil enzimático dos isolados rizobacterianos associados a *Solanum lycocarpum* St. Hil.

(continuação)

Nº do isolado	Código do isolado	Protease	Lipase	Esterase	Pectato liase	Poli-galacturonase	Celulase	Amilase
35	A1LRZ10	+	-	+	-	-	-	-
36	A1LRZ11	+	+	+	-	-	-	-
37	A1LRZ12*							
38	A1LRZ13	-	-	+	-	-	-	-
39	A1LRZ14	-	-	+	-	-	-	-
40	A1LRZ15	-	-	-	-	-	+	-
41	A1LRZ16*							
42	A1LRZ17	+	-	-	-	+	-	-
43	A1LRZ18*							
44	A1LRZ19	-	+	-	+	+	+	+
45	A1LRZ20	-	-	-	-	-	-	-
46	A1LRZ21	-	-	-	-	-	-	-
47	T2LRZ1	+	+	-	+	+	+	-
48	T2LRZ2	+	-	-	+	-	+	-
49	T2LRZ3*							
50	T2LRZ4	+	-	-	-	-	+	-
51	T2LRZ5	+	-	-	+	-	-	-
52	T2LRZ6	+	-	-	-	-	-	-
53	T2LRZ7	+	-	+	+	+	-	+
54	T2LRZ8	+	-	+	-	+	+	-
55	T2LRZ9	+	+	+	-	+	+	+
56	A2LRZ1	-	-	-	-	-	-	+
57	A2LRZ2	+	-	+	-	-	-	-
58	A2LRZ3	+	-	-	+	-	-	-
59	A2LRZ4*							
60	A2LRZ5	+	-	-	-	-	-	-
61	A2LRZ6	+	-	-	+	-	-	+
62	A2LRZ7	-	+	+	+	+	-	+
63	A2LRZ8	+	+	+	-	-	-	-
64	T3LRZ1*							
65	T3LRZ2	-	+	+	-	-	-	-
66	T3LRZ3*							
67	T3LRZ4	+	-	-	+	-	-	-

Continua

Tabela 5.2: Perfil enzimático dos isolados rizobacterianos associados a *Solanum lycocarpum* St. Hil.

(continuação)

Nº do isolado	Código do isolado	Protease	Lipase	Esterase	Pectato liase	Poli-galacturonase	Celulase	Amilase
68	T3LRZ5	-	-	-	-	-	-	-
69	T3LRZ6*							
70	T3LRZ7	+	+	+	-	+	+	+
71	T3LRZ8*							
72	T3LRZ9	+	-	+	+	+	+	+
73	T3LRZ10	+	-	-	-	-	+	-
74	T3LRZ11	+	+	+	+	+	+	+
75	A3LRZ1*							
76	A3LRZ2	-	-	+	-	-	-	-
77	A3LRZ3*							
78	A3LRZ4	-	+	+	+	+	-	+
79	A3LRZ5	-	+	+	-	-	-	-
80	A3LRZ6	+	+	-	+	+	+	-
81	A3LRZ7	-	-	-	-	-	-	-
82	A3LRZ8	-	-	-	-	-	-	+
83	A3LRZ9	+	-	+	-	-	+	+
84	A3LRZ10	+	-	+	-	-	+	+
85	A3LRZ11	+	+	+	-	-	-	-
86	T1LRZ26	+	-	-	-	-	+	-
87	T1LRZ27	+	-	-	-	-	+	-
88	T1LRZ28	+	-	+	-	+	+	+
89	T1LRZ29	-	-	-	-	-	-	-
90	T2LRZ10	-	-	+	-	-	-	-
91	T2LRZ11	-	+	-	+	+	+	+
92	T2LRZ12	-	-	-	-	-	-	-
93	T3LRZ12	-	-	+	-	-	-	+
94	T3LRZ13*							
95	T3LRZ14	+	-	+	+	-	+	+
96	A1LRZ22	+	+	+	+	-	+	+
97	A1LRZ23	-	-	-	-	+	-	-
98	A1LRZ24	+	-	-	+	-	+	+
99	A1LRZ25	+	-	-	-	-	-	-

Continua

Tabela 5.2: Perfil enzimático dos isolados rizobacterianos associados a *Solanum lycocarpum* St. Hil.

(continuação)

Nº do isolado	Código do isolado	Protease	Lipase	Esterase	Pectato liase	Poli-galacturonase	Celulase	Amilase
100	A1LRZ26	-	-	-	-	-	+	+
101	A1LRZ27	-	-	-	-	-	-	-
102	A2LRZ29	-	+	+	-	-	-	-
103	A2LRZ30	+	-	+	+	-	+	+
104	A2LRZ31	-	-	-	-	-	-	-
105	A2LRZ32	+	-	-	+	-	+	+
106	A3LRZ16	+	-	+	+	-	+	+
107	A2LRZ33	+	-	-	+	-	+	+
108	A1LRZ29	-	-	+	-	+	+	+
109	A3LRZ12	-	-	-	-	+	-	+
110	A3LRZ13	-	-	-	-	-	-	-
111	A3LRZ14	-	+	+	+	-	-	+
112	A3LRZ15	-	+	+	+	+	-	+
113	A1LRZ28	+	+	+	+	-	+	+
114	A3LRZ17	+	-	+	-	-	-	-
115	T2LRZ13	-	+	+	-	-	-	+
116	T3LRZ15	-	-	+	-	-	+	+
117	T3LRZ16	-	-	-	-	-	-	-
118	A1LRZ30	+	-	+	-	+	+	+
119	A1LRZ31	-	-	-	-	-	-	-
120	A1LRZ32	+	+	+	-	-	-	-
121	A2LRZ34	-	-	-	-	-	-	-
122	A3LRZ18	-	-	-	-	-	-	-
123	A3LRZ19	+	+	+	+	+	-	+
124	A1LRZ33*							
125	A1LRZ34	+	-	-	-	-	-	-
126	T2LRZ14	+	-	-	-	-	-	-
127	A2LRZ35	+	+	-	+	-	-	+
128	T3LRZ17*							
129	A3LRZ20*							
130	A3LRZ21	+	-	+	-	-	+	+
131	A2LRZ36*							

*Isolados perdidos durante o processo de armazenamento.

Fonte: tabela elaborada pelo autor.

As porcentagens totais de atividade enzimática de todos os isolados rizobacterianos testados são apresentados na figura 5.5.

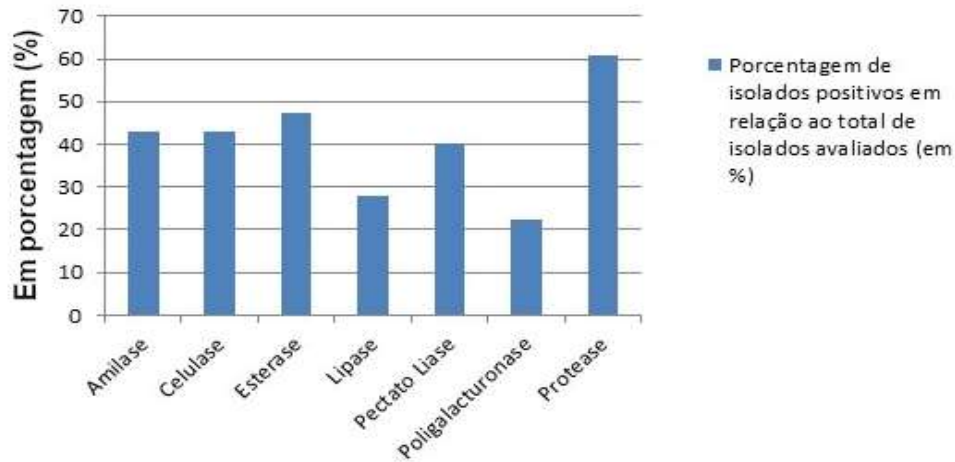


Figura 5. 5 Perfil enzimático das rizobactérias associadas a *Solanum lycocarpum* st. Hil. Fonte: autor.

5.3 Antagonismo contra fungos fitopatogênicos

Dos cento e trinta e um isolados avaliados contra os fungos fitopatogênicos, 50% apresentaram alguma atividade antagônica (Figura 5.6) contra o fungo FP1, 58% contra FP2, 38% contra FP3, 40% contra FP4, 52% contra FP5, 61% contra FP6, 23% contra FP7, 46% contra FP8, 50% contra FP9, 31% contra FP10, 33% contra FP11, 47% contra FP12, 32% contra FP13 e 46% contra FP14.

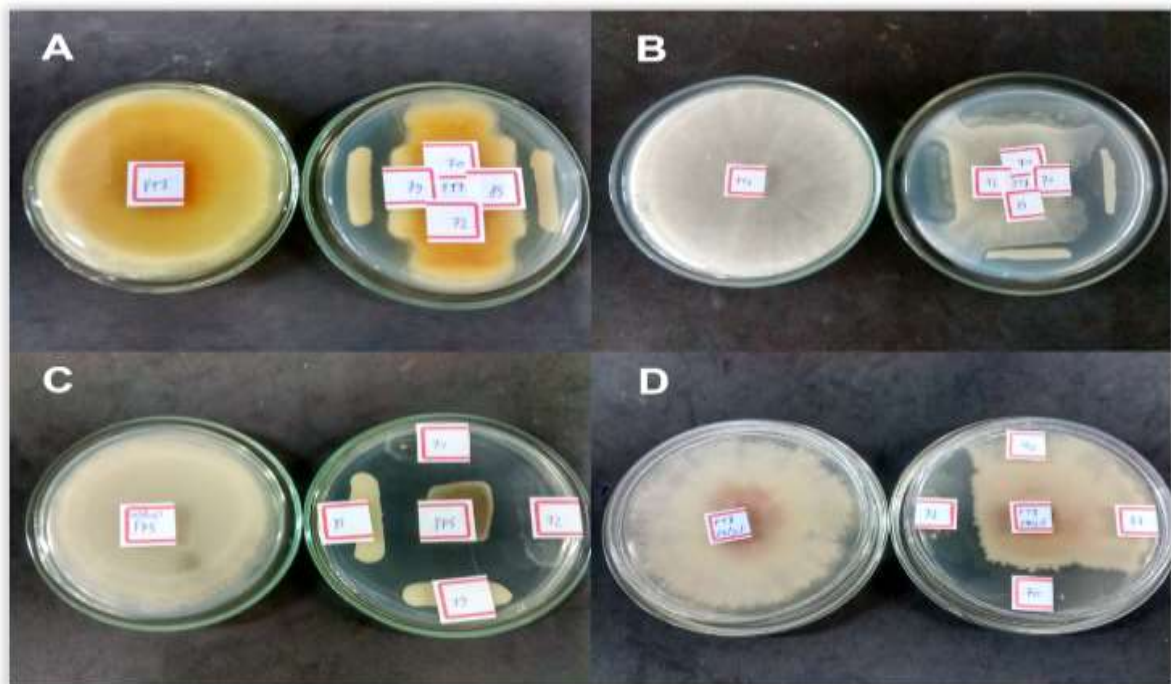


Figura 5. 6 Seleção massal, mostrando controle (no qual somente o micélio do fungo foi inoculado na placa, à esquerda de cada imagem) e tratamento (inoculação do fungo juntamente com os isolados bacterianos, à direita de cada

imagem), evidenciando atividade antagônica. A: *Alternaria alternata*. B: *Sclerotinia sclerotiorum*. C: *Sphaceloma* sp. D: *Fusarium proliferatum*. Fonte: autor.

Os dez isolados que apresentaram atividade antagônica contra o maior número de fungos fitopatogênicos foram selecionados para a etapa de pareamento direto. Os resultados da porcentagem de inibição micelial são mostrados na tabela 5.3.

Tabela 5.3 Porcentagem de inibição micelial (PIC) em %. Nas ordenadas, FP1: *Sclerotinia sclerotiorum*, FP2: *Moniliophthora perniciososa*, FP3: *Fusarium solani*, FP4: *Fusarium oxysporum* (ATTCC 2163), FP5: *Sphaceloma* sp. (CNPUV 102), FP6: *Ceratocystis paradoxa*, FP7: *Alternaria alternata*, FP8: *Fusarium proliferatum* FP9: *Colletotrichum* sp., FP10: *Fusarium verticillioides*, FP11: *Fusarium oxysporum* (isolado de feijão), FP12: *Fusarium oxysporum* (isolado de algodão), FP13: *Phytophthora sojae* e FP14: *Rhizopus microsporus*. Na abscissa estão o código dos dez isolados selecionados para o teste.

	T1LRZ14	A1LRZ4	A1LRZ19	A2LRZ7	T3LRZ7	T3LRZ9	A3LRZ5	A3LRZ11	A1LRZ30	A1LRZ32
FP1	0,0	40,0	25,0	25,0	46,7	48,3	46,7	33,3	46,7	43,3
FP2	1,3	32,9	45,4	1,3	34,9	42,8	42,8	40,8	46,7	42,8
FP3	36,4	46,6	49,5	43,2	49,0	49,5	44,7	49,0	47,6	47,6
FP4	21,1	35,5	21,1	27,0	32,9	49,3	46,7	46,7	46,7	41,4
FP5	33,3	45,0	30,0	50,0	46,7	45,0	41,7	41,7	45,0	50,0
FP6	0,0	40,0	25,0	25,0	46,7	48,3	46,7	33,3	46,7	43,3
FP7	34,4	43,8	43,8	46,9	36,3	6,3	47,5	43,8	49,4	45,6
FP8	25,0	43,3	33,3	36,7	45,0	50,0	41,7	46,7	48,3	50,0
FP9	43,3	33,3	36,7	45,0	40,0	45,0	41,7	48,3	46,7	48,3
FP10	40,8	36,7	41,7	41,7	50,0	43,3	38,3	31,7	48,3	41,7
FP11	43,3	33,3	36,7	45,0	40,0	45,0	41,7	48,3	46,7	48,3
FP12	16,7	46,7	50,0	45,0	16,7	33,3	48,3	41,7	48,3	38,3
FP13	21,1	47,4	47,4	11,2	29,6	29,6	49,3	29,6	25,7	46,7
FP14	21,1	47,4	47,4	11,2	29,6	29,6	49,3	29,6	25,7	46,7

Fonte: tabela elaborada pelo autor.

5.4 Antibiose frente a patógenos de interesse clínico

Vinte e seis isolados foram avaliados quanto ao potencial de antibiose frente à *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Foram considerados positivos os isolados bacterianos que apresentaram halo de inibição visível nas placas-teste (Figura 5.7).

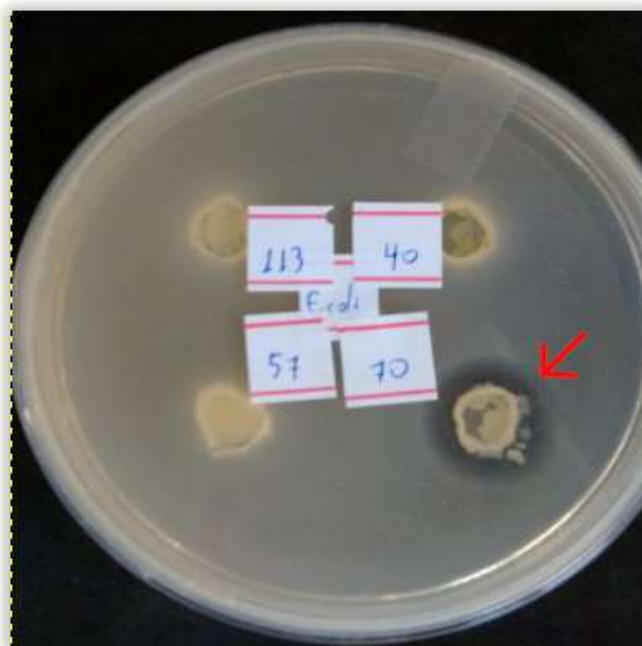


Figura 5.7 Antibiiose de *Bacillus subtilis* contra *Escherichia coli*, evidenciada pelo halo em volta do bloco de gelose indicado pela seta vermelha. Fonte: autor.

Destes, dois isolados (7,7% do total de isolados testados) apresentaram antibiiose contra *C. albicans*, três (11,5%) contra *S. aureus* e doze (46%) contra *E. coli*, como mostrado na Tabela 5.4.

Tabela 5.4 Antibiiose contra patógenos de interesse clínico

Código do isolado	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Escherichia coli</i>
T1LRZ14	-	-	-
A1LRZ4	+	+	+
A1LRZ15	-	-	-
A1LRZ19	-	-	+
A2LRZ2	-	-	-
A2LRZ7	-	-	-
T3LRZ7	-	-	+
T3LRZ9	-	-	+

Continua

Tabela 5.4: Antibiose contra patógenos de interesse clínico (continuação)

Código do isolado	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Escherichia coli</i>
A3LRZ2	-	-	-
A3LRZ5	-	-	+
A3LRZ11	-	-	+
T2LRZ11	-	-	-
A1LRZ22	-	-	-
A1LRZ25	-	-	-
A1LRZ27	-	-	-
A2LRZ29	-	-	-
A2LRZ30	-	-	+
A3LRZ16	-	-	+
A3LRZ15	-	-	-
A1LRZ28	-	-	-
A3LRZ17	-	-	-
A1LRZ30	+	-	+
A1LRZ31	-	-	-
A1LRZ32	+	+	+
A3LRZ19	-	-	+
A2LRZ35	-	-	+

Fonte: tabela elaborada pelo autor.

5.5 Sequenciamento

Sete isolados foram sequenciados e identificados, após amplificação da sequência do gene 16S rDNA (Figura 5.8) pelo critério de melhor desempenho nos ensaios de promotores de crescimento vegetal.

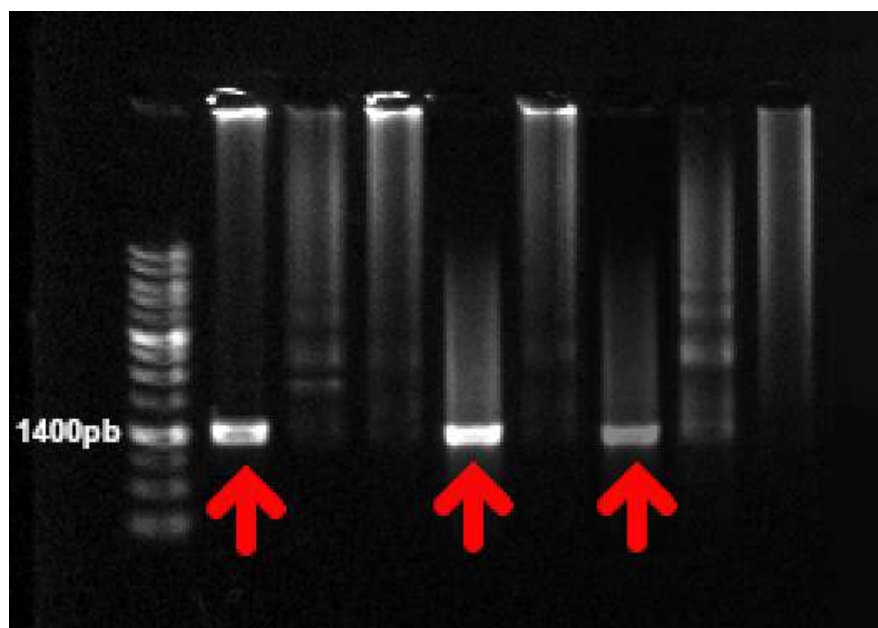


Figura 5.8 Gel de confirmação da amplificação do fragmento do gene 16S, indicados pelas setas. Fonte: autor.

As sequências obtidas foram comparadas com sequências do *GenBank* através do programa *BLASTn* (NCBI – www.ncbi.nih.gov). As linhagens correspondentes são mostradas na Tabela 5.5.

Tabela 5.5 Identificação dos melhores isolados por sequenciamento parcial do gene 16S

Código do isolado bacteriano	Espécie
A3LRZ11	<i>Burkholderia territorii</i>
A1LRZ27	<i>Microbacterium lemovicicum</i>
T3LRZ7	<i>Bacillus subtilis</i>
A2LRZ35	<i>Bacillus toyonensis</i>
A2LRZ2	<i>Bacillus toyonensis</i>
A2LRZ30	<i>Bacillus bingmayongensis</i>
A1LRZ22	<i>Bacillus marcorestinctum</i>

Fonte: tabela elaborada pelo autor.

6. DISCUSSÃO

6.1 Ensaios de promoção de crescimento por mecanismos diretos

Rizobactérias já são descritas como promotoras de crescimento vegetal devido à capacidade em fixar nitrogênio atmosférico, solubilizar fosfato e produzir auxinas (VERMA; LADHA; TRIPATHI, 2001; BRADER *et al.*, 2014; GUPTA *et al.*, 2015; BATISTA *et al.*, 2018).

Diante de um grande número de isolados rizobacterianos obtidos, o presente estudo foi baseado em técnicas *in vitro* para a seleção de linhagens promissoras para promoção de crescimento e produção de enzimas. Tais técnicas fornecem uma base para a seleção inicial de bactérias promotoras de crescimento de plantas e que poderão ser utilizadas testes futuros sob condições *in vivo* (CASTRO, 2011; SILVA, 2015; BATISTA *et al.*, 2018).

Na agricultura, a FBN é explorada e se encontra comercialmente disponível para muitas culturas, como a soja, o feijão e o milho, na forma de inoculantes. Estima-se uma economia mundial de US\$ 6 bilhões anuais pela exploração da FBN em substituição à adubação nitrogenada mineral (BRASIL, 2017). A utilização dessas bactérias na agricultura possibilita, também, a viabilização de reflorestamentos e minimiza impactos ambientais decorrentes da utilização destes agroquímicos, como contaminação de águas superficiais e subterrâneas pela lixiviação de nitrato (BARBIERI *et al.*, 1998; RAMBO *et al.*, 2004).

No presente estudo foi constatado que 32,1 % dos isolados bacterianos avaliados apresentaram a capacidade de fixar nitrogênio (Tabela 5.1), pela formação de película em meio semissólido de NFb devido à migração das colônias fixadoras para a localização onde o oxigênio dissolvido não prejudica a atividade na nitrogenase, sensível a este elemento. (BRASIL, 2005; PELZER, 2010).

Szilagyi-Zecchin *et al.*, (2014), avaliaram sete isolados bacterianos endofíticos associados ao milho, onde todos os isolados apresentaram resultado positivo para a formação de película em meio NFb semissólido, sendo um dos gêneros *Enterobacter* e seis do gênero *Bacillus*. Em estudos realizados por Machado (2015) com bactérias rizosféricas associadas ao pinhão-mansão foram encontradas dez linhagens de *Bacillus* sp. com habilidade de fixar nitrogênio *in vitro*. Linhagens bacterianas tais como *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, e *Pseudomonas* têm sido isoladas da rizosfera e também de raízes e partes aéreas do pinhão-mansão. Tais gêneros vêm sendo relatado de forma recorrente como fixadores de nitrogênio (AHEMAD e KIBRET, 2014; MOREIRA *et al.*, 2010; XIE e YOKOTA, 2005), corroborando com os gêneros encontrados neste estudo.

Mais de 80% das bactérias isoladas da rizosfera são aptas a produzir o ácido indol acético (AIA) a partir do precursor triptofano presente nos exsudatos liberados pelas raízes, estimulando a síntese de auxinas na rizosfera (GRAÇAS *et al.*, 2015). No presente estudo foi observado que todas as rizobactérias avaliadas foram capazes de sintetizar o AIA, destacando-se os isolados A1LRZ14, A1LRZ4, A1LRZ7 e T1LRZ1 com valores de 134,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 108,7 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 106,7 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 106, $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.

Não se conhece uma faixa de quantidade de AIA benéfica ou tóxica que seja comum à todas as plantas e o efeito dessas quantidades pode ser variável (TAIZ e ZAIGER, 2009).

Batista *et al.* (2018) isolou duas linhagens da rizosfera do guaraná, uma de *Bacillus* sp. (produzindo 67,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e outra de *Burkholderia* sp. (produzindo 175 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) sendo que ambas foram capazes de promover o crescimento do milho. Etesami, Alikhani e Hosseini (2015) discutiram sobre rizobactérias promotoras de crescimento vegetal encontradas na rizosfera, rizoplano e nichos endofíticos que podem produzir AIA e apoiar o crescimento das plantas. Machado (2015) relatou sobre duas linhagens de *Bacillus* sp. produzindo valores de 47,07 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 48,45 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, e duas linhagens de *Microbacterium* sp. com valores de 51,90 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 56,34 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, evidenciando novamente a confiabilidade dos gêneros identificados no presente estudo.

Entre os gêneros bacterianos que são conhecidos pela capacidade de solubilização de fosfato inorgânico, estão os gêneros *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus* e *Serratia* (VERMA; LADHA, 2001; GRAÇAS *et al.*, 2015).

Machado (2015) avaliou linhagens bacterianas endofíticas, isoladas do pinhão-mansão, pertencentes ao gênero *Bacillus* e *Citrobacter* e essas linhagens mostraram um alto índice de solubilização de fosfato. Andrade (2012), relata seis diferentes espécies de *Bacillus* sp. capazes de solubilizar fosfato de cálcio com índices de solubilização de fosfato (ISF) variando de 0,42 a 2,28. Chauhan *et al.* (2013) avaliaram, *in vivo*, o efeito positivo de quatro linhagens de rizobactérias solubilizadoras de fosfato (dos gêneros *Bacillus* sp. e *Pseudomonas* sp.) sobre o desenvolvimento de cana-de-açúcar pelo aumento da germinação (55 %), número de colmos (20 %), altura (18 %), circunferência e peso de colmos (8 e 51 %, respectivamente), produtividade (39 %) e a porcentagem de açúcares disponíveis (6 %), quando comparados ao controle.

A importância das bactérias solubilizadoras de fosfato não está apenas no fato de contribuir para o crescimento das plantas, mas também para reduzir a necessidade ou maximizar

o uso de fertilizantes manufaturados (QUECINE; BATISTA; LACAVA, 2014). No presente estudo, 45,8 % dos isolados avaliados foram positivos para o ensaio de fosfato qualitativo e 12 isolados (9,2 %) apresentaram alto potencial de solubilização (ISF>3) (entre eles, os isolados identificados pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Burkholderia* e *Microbacterium* sp.) demonstrando, assim, seu potencial uso na agricultura.

6.2 Ensaio enzimáticos

A produção de enzimas microbianas é considerada um dos principais setores da atual biotecnologia industrial (ORLANDELLI *et al.*, 2012). Bonatelli (2012) analisou bactérias endofíticas isoladas de guaranazeiro da Amazônia para atividade enzimática e verificou um total de 13,4 % dos isolados produzindo amilases, 14,8 % celulases, 19,9 % lípases, 20,8 % esterases, 22,7 % pectinases e 44 % proteases. Para efeitos de comparação, neste estudo a atividade de amilase apareceu em 42,9 % dos isolados avaliados; de celulase, em 42,9 %; esterase, 47,3 %; de lipase, 27,7 %; de poligalacturonase, 22,3 %; de pectato liase; 40,2 %; e, por fim, 60,7 % dos isolados avaliados apresentaram atividade proteolítica.

Vários gêneros como *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Propionibacterium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Streptococcus* têm se destacado na produção de lipases (LUZ *et al.*, 2016; LIU e KOKARE, 2017; PAMPHILE *et al.*, 2017; PÉREZ *et al.*, 2019), corroborando com o estudo, já que as linhagens de *Bacillus subtilis* e *Burkholderia territorii* demonstraram essa atividade enzimática.

As α -amilases secretadas por bactérias são mais termoestáveis que as de origem fúngica, sendo as secretadas pelo gênero *Bacillus* as mais termoestáveis, aumentando ainda mais a sua aplicabilidade industrial (DELATORRE *et al.*, 2010). No presente estudo, foi encontrada uma linhagem de *B. subtilis* que demonstrou atividade amilolítica e que se mostra interessante para estudos mais profundos.

O presente estudo do perfil enzimático, *in vitro*, da microbiota rizosférica associada à lobeira revelou que dentre as cento e doze rizobactérias avaliadas, noventa e nove (88,4 %) foram capazes de mostrar pelo menos algum tipo das atividades enzimáticas testadas (Tabela 5.2), evidenciando a utilidade de rizobactérias encontradas no Cerrado como fonte de bioprospecção de enzimas de interesse industrial, clínico e agrícola, sendo interessante o estudo mais aprofundado dessas enzimas, isolando-as, purificando-as e testando-as em parâmetros específicos e sob diversas condições, para verificação da aplicabilidade biotecnológica.

6.3 Antagonismo a fungos fitopatogênicos

Cerca de 85 % das doenças que atingem culturas de grande importância econômica são causadas por fungos (ZAMBOLIM, 2016). O gênero *Fusarium* compreende um grande e heterogêneo grupo de fungos que provoca doenças em diversas plantas, tais como a soja (*Glycine max*), tabaco (*Nicotiana tabacum*) e feijão (*Phaseolus vulgaris*), reduzindo tanto a qualidade como a quantidade dos seus produtos sendo, portanto, economicamente prejudicial (MATARESE et al., 2012). Mendes et al. (2007) discorreu sobre bactérias endofíticas do gênero *Burkholderia*, isoladas de cana-de-açúcar que inibiam o crescimento de *Fusarium verticillioides*; estudos *in vitro* demonstraram a atividade antagonista de *Bacillus subtilis*, um dos isolados obtidos neste estudo, contra o mesmo fitopatógeno (FIGUEIREDO et al., 2010).

O uso de *Bacillus subtilis*, foi eficiente para o controle de *F. oxysporum* em *Cicer arietinum* L. (grão-de-bico), *in vivo* (MORADI et al., 2012) e *F. solani* em *Lycopersicon esculento* L. (tomate), *in vitro* e *in vivo* (MORSY et al., 2009). Maciel et al., (2014) relatou uma linhagem do gênero *B. subtilis* (UFV3918) promissora no biocontrole *in vivo* de *F. sambucinum*. Em estudos realizados por Abdalla et al. (2014), foram encontrados vinte e sete isolados de *Bacillus* com capacidade antagônica contra o fitopatógeno *A. alternata*.

Várias espécies de *Bacillus* são descritas como antagonistas de fungos fitopatogênicos podendo ser usadas em programas de controle biológico (JUNIOR et al., 2002; VIEIRA et al., 2016; FANTINEL et al., 2018). O gênero *Bacillus* apresenta grandes vantagens à outros gêneros bacterianos por seu rápido crescimento, sua ausência de patogenicidade (na maioria das espécies) e sua capacidade de formar esporos termotolerantes resistentes contra variações de pH, a agroquímicos, fertilizantes e ao tempo de estocagem permitindo, portanto, sua utilização na formulação de bioprodutos estáveis e viáveis (BACKMAN; WILSON; MURPHY, 1997; BATISTA et al., 2018).

No presente estudo, os isolados identificados como *Bacillus subtilis* (código T3LRZ7) e *Burkholderia territorii* (código A3LRZ11) demonstraram ótimos resultados de inibição micelial dos fungos fitopatogênicos testados (Tabela 5.3).

6.4 Antibiose a patógenos clínicos

O uso indevido de antibióticos, em termos de aplicação e dosagem, é um fator que contribui para o desenvolvimento linhagens de patógenos resistentes à medicamentos. O desafio no desenvolvimento de novos antibióticos eficazes contra estes patógenos é identificar novos compostos que possam neutralizar as funções de efluxo (LIN et al., 2015).

No presente estudo, o isolado identificado como *Burkholderia territorii* apresentou antibiose contra *E. coli*, sendo que esse gênero demonstra um potencial biotecnológico

significativo como fonte de novos antibióticos e metabólitos secundários bioativos já descritos pela literatura (DEPOORTER *et al.*, 2016). Muthulakshmi e Uma (2019), estudaram a atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata produzidas por *Bacillus subtilis* contra diversos patógenos multirresistentes à antibióticos, obtendo resultados positivos contra *E. coli* e *S. aureus*, corroborando com os resultados apresentados pela linhagem de *B. subtilis* isolada neste trabalho.

Bactérias rizosféricas e endofíticas de plantas medicinais do Cerrado constituem um grande reservatório de biodiversidade, mas não existem muitos estudos avaliando o potencial destes microrganismos para a produção de novos antibióticos, apesar de se saber que várias espécies já descritas como produtoras de compostos bioativos possam ser encontradas neste nicho (PIZA *et al.*, 2015; PIZA *et al.*, 2016; LACAVA SOUSA, 2016). Com os resultados obtidos, destacando-se isolados que demonstraram antibiose frente aos três patógenos avaliados que são comumente associados a infecções hospitalares, espera-se estimular trabalhos mais aprofundados nessa linha de pesquisa, até mesmo com estes isolados, de forma a desenvolver soluções para este grande problema da saúde mundial.

7. CONCLUSÕES

As bactérias pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Burkholderia* e *Microbacterium* isoladas da rizosfera de *Solanum lycocarpum* st. Hil. possuem potencial *in vitro* para a promoção do crescimento vegetal tanto direto quanto indireto (antagonismos);

Do total de cento e doze isolados avaliados, 88,4 % mostraram algum tipo de atividade enzimática, destacando-se as atividades de protease, amilase, esterase e celulase que ocorreram em mais de 40% dos isolados;

Neste estudo foram obtidos isolados capazes de mostrar antibiose contra *C. albicans*, *S. aureus* e *E. coli*, patógenos frequentemente encontrados em infecções hospitalares.

8. REFERÊNCIAS

ABDALLA S.A., ALGAM S.A.A., IBRAHIM E.A., NAIM A.M.E. *In vitro* screening of *Bacillus* isolates for biological control of early blight disease of tomato in Shambat soil. **World Journal of Agriculture Research** 2(1): 47–50. 2014.

ABREU, C. D. de et. al. Efeito da adubação fosfatada sobre a população de microrganismos solubilizadores e mineralizadores de fósforo isolados em rizosfera de milho. **XXXI Congresso Nacional de Milho e Sorgo**. Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul, 2016.

ALVES, A. A et. al. Medicina Popular e Diabetes Mellitus Tipo 1: uma Perspectiva de Tratamento Através da Fruta da Lobeira. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 20, p.38-42, 2016.

AHMAD, R., M. ARSHAD, Z.A. ZAHIR, M. NAVEED, M. KHLAID AND H.N. ASGHAR. Integrating N-enriched compost with biologically active substances for improving growth and yield of cereals. **Pakistan Journal of Botany**, v.40, p. 283-293, 2008.

AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal of King Saud University - Science**, v.26, p. 1-20, 2014.

ANDRADE, L. F. Bactérias endofíticas de bananeira “Prata-Anã”: fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato de cálcio e produção de ácido indol-3-acético. 69 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal no Semiárido) - **Universidade Estadual de Montes Claros**, Janaúba, 2012.

ANDRADE, P. H. M. de. Análise da diversidade genética e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana associada a *Coffea arabica* L. de cultivo convencional e orgânico. Tese de doutorado. **Universidade Federal de São Carlos**, São Carlos, 2019.

ARAÚJO, J. M. Estratégias para isolamento seletivo de actinomicetos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa, 1998. P. 351-367.

ARAÚJO, F. F.; HUNGRIA, M. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum* / *Bradyrhizobium elkanii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.34, n.9, Sept., 1999. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X1999000900014>.

ARAÚJO N.D.; COELHO V.P.D.M.; AGRA M.D.F. The pharmacobotanical comparative study of leaves of *Solanum crinitum* Lam., *Solanum gomphodes* Dunal and *Solanum lycocarpum* A. St-Hil,(Solanaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.5, p. 666-674. 2010.

ARAÚJO, W. L. *et al.* 2001. Variability and interaction between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, 47: 229-236, 2001.

ARAÚJO, W. L.; QUECINE, M. C.; LACAVA, P. T.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; MARCON, J.; LIMA, A. O. S.; KUKLINSKY-SOBRAL, J.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Micro-organismos endofíticos: aspectos teóricos e práticos de isolamento e caracterização. 1. ed. **Santarém: UFOPA**, v. 1, p. 257, 2014.

ARAÚJO, A. S.; MARTINS, E. DA S. Produção de α -amilases por *Rhizomucor miehei* e *Syncephalastrum racemosum* em diferentes condições fermentativas. **Nucleus**, v. 15, n. 2, p. 583–592, 2018.

ASSIGBETSE, K. B. *et al.* Differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races on cotton by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. **Phytopathology**, v. 84, n. 6, p. 622-626, 1994.

AWAIS, M. *et al.* Isolation, characterization and inter-relationship of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of sugarcane and rice. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, n. September 2015, p. 312–321, 2017.

BABALOLA, O. O., OSIR, E. O., SANNI, A., ODHAIMBO, G. D. & BULIMO, W. D. Amplification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic ACC) deaminase from plant growth promoting rhizobacteria in Striga-infested soils. **African Journal of Biotechnology**, 2, 157-160. 2003.

BACKMAN, P.A.; WILSON, M.; MURPHY, J.F. Bacteria for biological control of plant diseases. In- Environmentally Safe Approaches to Crop Disease Control, Eds. N. A. Rechcigl and J. E. Rechcigl. Boca Rota : **CRC Press**. pp. 95-109. 1997.

BAEZ-ROGELIO, A. *et al.* Next generation of microbial inoculants for agriculture and bioremediation. **Microbial biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 19-21, 2017.

BAILÃO, E.F.L.C.; DEVILLA, I.A.; CONCEIÇÃO, E.C.; BORGES, L.L. 2015. Bioactive compounds found in Brazilian Cerrado fruits. **International journal of molecular sciences**, v16, n.10, p.23760-23783, 2015.

BAILEY J.E., OLLIS D.F. Biochemical Engineering Fundamentals. **2nd Ed. McGraw-Hill Book Co.**, New York: 115–116, 1986.

BAR, T.; OKON, Y. Tryptophan conversion to indole-3-acetic acid via indole-3-acetamide in *Azospirillum brasilense* Sp7. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa v.39, p. 81-86, 1993.

BARBOSA M., SOUSA C.P. de, HOKKA C.O. Preparation of clavulanate salt using a tertiary octylamine as an intermediate. In: Antonio Mendez-Vilas. (Org.). Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. 1ed.: **World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.**, v. 1, p. 754-759. 2009.

BENEDUZI, A., PERES, D., VARGAS, L. K., BODANESE-ZANETTINI, M. H. & PASSAGLIA, L. M. P. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing *Bacillus* isolated from rice fields in South Brazil. **Applied Soil Ecology**, 39, 311-320. 2008.

BERNABEU, P. R., PISTORIO, M., TORRES-TEJERIZO, G., ESTRADA-DE LOS SANTOS, P., GALAR, M. L., BOIARDI, J. L. & LUNA, M. F. Colonization and plant growth-promotion of tomato by *Burkholderia tropica*. **Scientia Horticulturae**, 191, 113-120. 2015.

BHATTACHARYYA, P. N[†]; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327-1350, 2012.

BARBIERI, A.; CARNEIRO, M.A.C.; MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Nodulação em leguminosas florestais em viveiros no sul de Minas Gerais. **CERNE**, v.4, n.1, p.145-153, 1998.

BATISTA, B. D.; LACAVA, P. T.; FERRARI, A.; TEIXEIRA-SILVA, N. S.; BONATELLI, M. L.; TSUI, S.; MONDIN, M.; KITAJIMA, E. W.; PEREIRA, J. O.; AZEVEDO, J. L.; QUECINE, M. C. Screening of tropically derived, multi-trait plant growth-promoting rhizobacteria and evaluation of corn and soybean colonization ability. **Microbiological Research**, v. 206, p. 33-42, 2018.

BHARTI, P. et al. Heat stable antimicrobial activity of *Burkholderia gladioli* OR1 against clinical drug resistant isolates. **The Indian journal of medical research**, v. 135, n. 5, p. 666, 2012.

BERRAQUERO, F.R.; BAYA, A.M.; CORMENZANA, A.R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **Ars Pharmaceutica**, Granada, v.17, p. 399-406, 1976.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.28, p. 1327-1350, 2012.

BONATELLI, M.L. Bactérias endofíticas e epifíticas cultivadas e não cultivadas do guaranazeiro e o controle da antracnose. 84 p. Dissertação (Mestrado em Genética e

Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2012.

BRADER, G.; COMPANT, S.; MITTER, B.; TROGNITZ, F.; SESSITSCH, A. Metabolic potential of endophytic bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v.27, p. 30–37, 2014.

BRASIL. Lei nº 11.097, de 13 de Janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, Seção 1, p.8, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Fixação biológica de nitrogênio**. Brasília, 6 p. Disponível em: < <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sustentabilidade/plano-abc/arquivo-publicacoes-plano-abc/fixacao-biologica-do-nitrogenio.pdf>>. Acesso: 23/02/2020. 2017.

BRIC, J.M.; BOSTOCK, R.M.; SILVERSTONE, S.E. Rapid *in situ* assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, p. 535-538, 1991.

BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 16, n. 2, p. 93-108, 1994.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia**. Produção Aplicações e Mercado. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.

BROEK, A.V.; LAMBRECHT, M.; EGGERMONT, K.; VANDERLEYDEN, J. Auxins upregulate expression of indole-3-pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasiliense*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 181, p. 1338-1342, 1999.

BROECKLING, C. D.; BROZ, A. K.; BERGELSON, J.; MANTER, D. K.; VIVANCO, J. M. Root exudates regulate soil fungal community composition and diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, p. 738-744, 2008.

BROOK, P. J. Epidemiology of grapevine anthracnose, caused by *Elsinoe ampelina*. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, 16(3), 333-342. 1973.

BROWN, M.E. Seed and root bacterization. **Annual Review of Phytopatology**, Palo Alto, v.12, p. 181-197, 1974.

BUENO, C. J.; FISCHER, I. H. Manejo de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 3, n. 2, p. 1–9, 2006.

BULEN, W. A.; LECOMTE, J. R. Nitrogenase complex and its components. **Methods in Enzymology**, v.24, p. 456-470, 1972.

CARRIM, A. J. I.; BARBOSA, E. C.; VIEIRA, J. D. G. Enzymatic Activity of Endophytic Bacterial Isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). **Brazilian arch. of biology and Technology**. Viçosa, v.49, p. 353-359, 2006.

CARVALHO, I. P. S. Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas no carreamento de extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum* e avaliação biológica in vitro em células de câncer de bexiga. Tese de Doutorado. **Universidade de São Paulo**. 2017.

CASTELLANOS D.; CUBILLOS R.; ARGUELLO, H.; Selección de Microorganismos Promotores de Crecimiento Vegetal (Ácido Indol Acético) a partir de Muestras de Suelo Rizosferico, como Primera Etapa en el Desarrollo de un Biofertilizante. *Rev. Bras. De Agroecologia/nov.* Vol. 4 No. 2. 2009.

CASTRO, A.H.F.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A.A.; VITOR, S.M.M. Calogênese e teores de fenóis e taninos totais em barbatimão *Stryphnodendron adstringens* (mart.) coville; Callogenesis and contents of total phenols and tannins in barbatimão *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville. **Ciência e Agrotecnologia**, v.33, n.2, p.385-390, 2009.

CASTRO, R. A. Estudo da comunidade bacteriana endofítica cultivável associada aos manguezais de Cananéia e Bertioga - SP. 2011. 93p. Dissertação Mestrado em Ciências (Biologia na Agricultura e no Ambiente) - **Centro de energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo**, Piracicaba, 2011.

CASTRO, R. A.; QUECINE, C. Q.; LACAVALA, P. T.; BATISTA, B. D.; LUVIZOTTO, D. M.; MARCON, J.; FERREIRA, A.; MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Isolation and enzyme bioprospection of endophytic bacteria associated with plants of Brazilian mangrove ecosystem. **Springerplus**, v.3, p. 1-9, 2014.

CATTELAN, A.J. Screening and characterization of soil and rhizosphere bacteria for traits that promote early soybean growth. 89p. Tese de Doutorado - **University of Georgia**, Georgia, 1998.

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

CAVAGLIERI, L. et al. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. **Research in Microbiology**, v. 156, n. 5-6, p. 748-754, 2005.

CHAMANGASHT, S., ARDAKANI, M. R., KHAVAZI, K., ABBASZADEH, B. & MAFAKHERI, S. Improving lettuce (*Lactuca sativa* L.) growth and yield by the application of biofertilizers. **Annals of Biological Research**, 3, 1876-1879. 2012.

CHAUHAN, H.; BAGYARAJ, D.J.; SHARMA, A. Plant growth promoting bacterial endophytes from sugarcane and their potential in promoting growth of the host under field conditions. **Experimental Agriculture**, Cambridge, v.49, p. 43-52, 2013.

CHEN, B., LUO, S., WU, Y., YE, J., WANG, Q., XU, X., ... & YANG, X. The effects of the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* sasm05 and IAA on the plant growth and cadmium uptake of *Sedum alfredii* hance. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–13, 2017.

CHENNIAPPAN, C. et al. Biocontrol efficiency of native plant growth promoting rhizobacteria against rhizome rot disease of turmeric. **Biological Control**, v. 129, n. July 2018, p. 55–64, 2019.

COELHO, M. A. Zarur; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. Tecnologia enzimática. **Editora EPUB**, 2008.

COLEMAN, Jeffrey J. The *Fusarium solani* species complex: ubiquitous pathogens of agricultural importance. **Molecular plant pathology**, v. 17, n. 2, p. 146-158, 2016.

COSTA, J. de C. B. et al. Indução de resistência em mudas de cacaueteiro contra *Moniliophthora perniciosa* por produto à base de mananoligossacarídeo fosforilado. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, n. 5, p. 285-294, 2010.

COSTA, H. B. Desenvolvimento de processo para a purificação de bromelina a partir de resíduos de abacaxizeiro (*Ananas comosus* var. *comosus*) cv. Vitória. Tese (Doutorado em Biotecnologia). 150p. **Universidade Federal do Espírito Santo- UFES**, Vitória-ES. 2014.

CRAWFORD, D. et. al. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v.59, n. 11, p.3899-3905, 1993.

DA SILVA ALMEIDA, J. R. G. et al. PLANTAS MEDICINAIS COMO FONTE DE PRODUTOS BIOLÓGICAMENTE ATIVOS. **Revista de Ciências da Saúde Nova Esperança**, v. 2, n. 1, p. 58-65, 2004.

DAS, M.P.; DEVI, P. V; YASMINE, Y. Assessment of *in vitro* anti-diabetic activity of *Ficus glomerata*. **Der Pharmacia Lettre**, v. 8, n. 3, p. 267-272, 2016.

DELATORRE, A. B.; LADEIRA, S. A.; ANDRADE, M. V. V.; BARBOSA, J. B.; MARTINS, M. L. L. Microrganismos termofílicos e enzimas termoestáveis de importância comercial. **Perspectivas online**, v.4, p. 132-145, 2010.

DEPOORTER, Eliza et al. *Burkholderia*: an update on taxonomy and biotechnological potential as antibiotic producers. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 12, p. 5215-5229, 2016.

DEVAPPA, R. K.; ANGULO-ESCALANTE, M. A.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Potential of using phorbol esters as an insecticide against *Spodoptera frugiperda*. **Industrial Crops and Products**, v.38, p. 50– 53, 2012.

DIAS A.C.F, COSTA F.E.C., ANDREOTE F.D., LACAVA P.T., TEIXEIRA M.A., ASSUMPÇÃO L.C., ARAÚJO W.L., AZEVEDO J.L., MELO I.S. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v.25, p. 189-195, 2009.

DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and Economic contributions. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, p. 771-774, 1997.

DOS SANTOS, P. S. et al. Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: uma revisão sistemática. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 4, n. 2, p. 0181-0188, 2018.

DUARTE, G.M.; CERIBELLI, M. G. A.; CARDOSO, A. M.; DORNELLES, M. S.; SOUCHIE, E. L. População de micro-organismos solubilizadores de fosfato de cálcio na rizosfera de milho transgênico e crioulo, cultivados com solo de agroecossistemas em Urutaí, GO. In: Resumos do IV Seminário de Agroecologia do Distrito Federal e Entorno - Brasília/DF. **Cadernos de Agroecologia**, v. 9, 2014.

EADY, R. R.; POSTGATE, J. R. Nitrogenase. **Nature EMBO Reports**, London, v.249, p. 805-810, 1974.

ESPÓSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: Uma introdução a Biologia, Bioquímica e Biotecnologia**. Editora: EDUCS, pg. 528, 2010.

ETESAMI H.; ALIKHANI H.A., HOSSEINI H.M. Indole-3-acetic acid (IAA) production trait, a useful screening to select endophytic and rhizosphere competent bacteria for rice growth promoting agents. **MethodsX**, v.2, p. 72-78, 2015.

FALCH. E. Industrial enzymes- developments in production and application. **Biotechnology Advances**, v.9, p. 643-658, 1991.

FANTINEL V.S., MUNIZ M.F.B., POLETTO T., DUTRA A.F., KRAHN J.T., FAVARETTO R.F., SARZI J.S. Biocontrole *in vitro* de *Colletotrichum siamense* utilizando *Trichoderma* spp. e *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. **Revista Ciência Agrícola**, 16(3), 43-50. 2018.

FARINA, F. Diversidade de bactérias promotoras do crescimento vegetal associadas à cultura de canola (*Brassica napus* L.) cultivada no município de Vacaria, Rio Grande do Sul.

2012. 104 p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 2012.

FAVORETTO, N. B. Produção de substâncias bioativas por micro-organismos endofíticos isolados do Cerrado de São Carlos-SP. Dissertação de mestrado, **Universidade Federal de São Carlos**, São Carlos. 2010.

FERREIRA H. K. L., MACHADO S. E. F., SANTANA R. C. F. D., ALBUQUERQUE L. E. F. D., SILVA I. D., SILVA-LACERDA G. R. D., ... e LIMA G. M. D. S. Avaliação *in vitro* do potencial antimicrobiano de *Streptomyces* sp G-27 contra microrganismos de interesse clínico. *Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade*, **3(6)**, 367-373. 2016.

FIGUEIREDO J.E., TEIXEIRA M.A., LIMA G.V., BRESSAN W., DE PINTO N.F.J., CASELA C.R. Atividade antagonista *in vitro* de *Bacillus subtilis* contra fungos fitopatogênicos do milho e sorgo. In Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em anais de congresso (ALICE). **In: Congresso Nacional de milho e sorgo, 28.; Simpósio Brasileiro sobre a lagarta do cartucho, 4., 2010, Goiânia. Potencialidades, desafios e sustentabilidade: resumos expandidos.** Sete Lagoas: ABMS, 2010.

FIGUEROA-LÓPEZ, A. M.; CORDERO-RAMÍREZ, J. D.; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, J. C.; LÓPEZ-MEYER, M.; LIZÁRRAGA-SÁNCHEZ, G. J.; FÉLIX-GASTÉLUM, R.; MALDONADO-MENDOZA, I. E. Rhizospheric bacteria of maize with potential for biocontrol of *Fusarium verticillioides*. **SpringerPlus**, v.5, p. 330, 2016.

FRANCHE, C.; LINDSTROM, K.; ELMERICH, C. Nitrogen fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. **Plant Soil**, v.321, p. 35-59, 2009.

FRANÇOSO, R.D.; BRANDÃO, R.; NOGUEIRA, C.C.; SALMONA, Y.B.; MACHADO, R.B.; COLLI, G.R. Habitat loss and the effectiveness of protected areas in the Cerrado Biodiversity Hotspot. **Natureza & Conservação**, v.1, n.1, p.35-40, 2015.

FREITAS, S. S. & PIZZINATTO, M. A. Interações de *Pseudomonas* sp. e *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* na rizosfera de tomateiro (*Lycopersi conesculentum*). **Summa Phytopathologica**, 17, 105-112. 1991.

GALLON, M. E., et al. Determinação dos parâmetros anatômicos, físico-químico e fitoquímicos das folhas de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hill. **Rev. bras. plantas med** 17.4, supl. 2: 937-944. 2015.

GARCIA, T. V.; KNAACK, N.; FIUZA, L. M. Bactérias endofíticas como agentes de controle biológico na orizicultura. **Agricultural Microbiology**, v.82, p. 01-09, 2015.

GARG, A.; GARG, S.; ZANEVELD, L. J.; SINGLA, A. K. Chemistry and Pharmacology of the Citrus Bioflavonoid Hesperidin. **Phytotherapy Research**, v.15, p. 655-669, 2001.

GEETHA, K.; VENKATESHAM, E.; HINDUMATHI, A.; BHADRAIAH, B. Isolation, screening and characterization of plant growth promoting bacteria and their effect on *Vigna Radita* (L.) R.Wilczek. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v.3, p. 799-809, 2014.

GHODSALAVI, B.; AHMADZADEH, M.; SOLEIMANI, M.; MADLOO, P. B.; TAGHIZAD-FARID, R. Isolation and characterization of rhizobacteria and their effects on root extracts of *Valeriana officinalis*. **Australian Journal of Crop Science**, v.7, p. 338-344, 2013.

GHOLAMI, A., SHAHSAVANI, S. & NEZARAT, S. The effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on germination, seedling growth and yield of maize. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, 49, 19-24. 2009.

GLICK B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological Research**, v.169, p. 30-39, 2014.

GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Hindawi Publishing Corporation**, Scientifica, 2012.

GOMES, A. M. A., MARIANO, R. L. R., SILVEIRA, E. B., MESQUITA, J. C. P. Isolamento, seleção de bactérias e efeito de *Bacillus* spp. na produção de mudas orgânicas de alface. **Horticultura Brasileira**, 21, 699-703. 2003.

GONÇALVES, J. L. M.; SANTARELLI, E. G.; MORAES NETO, S. P.; MANARA, M. P. Produção de mudas de espécies ativas: substrato, nutrição, sombreamento e fertilização. In: Gonçalves, J. L. M; Benedetti, V (Ed.). **Nutrição e fertilização florestal**. Piracicaba: IPEF, p. 310-350, 2000.

GOSWAMI, D.; THAKKER, J. N.; DHANDHUKIA, P. C. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. **Cogent Food & Agriculture**, v.2, p. 1-19, 2016.

GRAÇAS, J. P.; RIBEIRO, C.; COELHO, F. A. A.; CARVALHO, M. E. A.; CASTRO, P. R. C. Microrganismos estimulantes na agricultura. Piracicaba-SP: **Divisão de Biblioteca-ESALQ/USP**, 61 p, 2015.

GRANT, C. A., PLATEN, D. N., TOMAZIEWICZ, D. J., SHEPPARD, S. C., MERCER-GRANT, C., & SHEPPARD, S. C. A Importância do fósforo no desenvolvimento inicial da planta. **Informações Agronômicas**, v. 95, n. 19, p. 1-5, 2001.

GRAY, E. J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. **Soil Biology e Biochemistry**, Elmsford, n. 37, p. 395 - 412, 2005.

GRIFFIN, M. R. Biocontrol and bioremediation: two areas of endophytic research which hold great promise. In: **Advances in Endophytic Research**. Springer, New Delhi, p. 257-282. 2014.

GROTH, I. et.al. Actinomycetes in Karstic caves of northern Spain (Altamira and Tito Bustillo). **Journal of microbiological methods**, Amsterdam, v.36, p. 115-122, 1999.

GUPTA, G.; PANWAR, J.; JHA, P. N. Natural occurrence of *Pseudomonas aeruginosa*, a dominant cultivable diazotrophic endophytic bacterium colonizing *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. **Applied Soil Ecology**, v. 64, p. 252-261, 2013.

GUPTA, G.; PARIHAR, S. S.; AHIRWAR, N. K.; SNEHI, S. K.; SINGH, V. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v.7, p. 96-102, 2015.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1599-1616, 2003.

GUPTA, R.; KHASA, Y. P.; KUHAD, R. C. Evaluation of pretreatment methods in improving the enzymatic saccharification of cellulosic materials. **Carbohydrate Polymers**, v.84, p. 1103-1109, 2011a.

GUPTA, R.; KHASA, Y. P.; KUHAD, R. C. Fungal delignification of lignocellulosic biomass improves the saccharification of cellulose. **Biodegradation**, v.22, p. 797-804, 2011b.

HANDELSMAN, J.; STABB, E. V. Biocontrol of soilborne plant pathogens. **The Plant Cell**, v. 8, p. 1855–1869, 1996.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p. 235-251, 2006.

HAYNES, R.J. Lime and phosphate in the soil plant system. *Adv. Agron.*, 37:249-315, 1984.

HENDRICKSON, H.S. Lipases part A: biotechnology. **Methods in Enzymology**, Amsterdam, v.284, p. 146-146, 1997.

HOU, Y. et al. Comparative genomics of pathogens causing brown spot disease of tobacco: *Alternaria longipes* and *Alternaria alternata*. **PloS one**, v. 11, n. 5, 2016.

HUNGRIA, M. et al. Interação entre microrganismos do solo, feijoeiro e milho em monocultura ou consórcio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.32, p. 807-818, 1997.

HUSEN, E. Screening of soil bacteria for plant growth promotion activities *in vitro*. **Indonesian Journal of Agricultural Science**, Cibinong, v.4, p. 27-31, 2003.

ISLAM, S.; AKANDA, A. M.; PROVA, A.; ISLAM, M.D.T.; HOSSAIN, M. Isolation and identification of plant growth promoting rhizobacteria from cucumber rhizosphere and their effect on plant growth promotion and disease suppression. **Frontiers in Microbiology**, v.6, 1360, 2015.

JAEGER, K. E.; SCHNEIDINGER, B.; ROSENAU, F.; WERNER, M.; LANG, D.; DIJAKSTRA, B. W.; SCHIMOSSEKE, K.; ZONTA, A.; REETZ, M. T. Bacterial lipases for biotechnological applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, The Netherlands, v.3, p. 3-12, 1997.

JEPSON, W. A disappearing biome? Reconsidering land-cover change in the Brazilian savanna. **The Geographical Journal** 171.2: 99-111. 2005.

JUNIOR B., BRASIL C., ALBINO U.B., MARTINES A.M., SARIDAKIS D.P., MATSUMOTO L.S., ANDRADE G. Efeito fungistático de *Bacillus thuringiensis* e de outras bactérias sobre alguns fungos fitopatogênicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 37(8), 1189-1194. 2002.

KANNANGARA, S.; DHARMARATHNA, R.M.G.C.S; JAYARATHNA, D.L. Isolation, identification and characterization of Trichoderma species as a potential biocontrol agent against *Ceratocystis paradoxa*. **Journal of Agricultural Sciences–Sri Lanka**, v. 12, n. 1, 2017.

KANDRA, L. α -Amilases of medical and industrial importance. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v.487, p. 666- 667, 2003

KAUR, G.; REDDY, M. S. Influence of P-solubilizing bacteria on crop yield and soil fertility at multilocal sites. **European Journal of Soil Biology**, v. 61, p. 35-40, 2014.

KAZLAUKAS, R.J. BORNSCHEUER, U.T.. Biotransformations with lipases. **Biotechnology: Biotransformations I**, v. 8, p. 36-191, 1998.

KERBAUY, G.B. Fisiologia vegetal. 2. ed. **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, 431 p. 2008.

KENNEDY, A. C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture ecosystems e environment**, Amsterdam, v. 74, p. 65-76, 1999.

KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; WANI, P. A. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture – a review. **Agronomy for Sustainable Development**, v.27, p. 29–43, 2006.

KIRK, O., BORCHERT, T.V., FUGLSANG, C.C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, p. 34351, 2002.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A **conservação do Cerrado brasileiro**. Megadiversidade 1.1: 147-155. 2005.

KLOPPER, J. W.; SCHROTH, M. N. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: **Station de Pathologie Végétale et Phyto-Bactériologie** (Ed.), Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, vol. II, Gilbert-Clarey, Tours, France, p. 879-882, 1978.

KOCHAR, M.; UPADHYAY, A.; SRIVASTAVA, S. Indole-3-acetic acid biosynthesis in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Psd and plant growth regulation by hormone overexpression, **Research in Microbiology Granada**, v.162, p. 426-425, 2011.

KRIKORIAN, A.D. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In: Roca, W.M.; Mroginsky, L.A. (Eds.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, p.41-77, 1991.

KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; KHASA, Y. P. Bioethanol production from lignocellulosic biomass: an overview. In: **Wealth from Waste (ed Lal B.) Teri Press**, New Delhi, India, 2010.

KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; SINGH, A. Microbial cellulases and their industrial applications. **Enzyme Research**, 2011.

KUMAR S., STECHER G., LIM M., KNYAZ C., and TAMURA K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution** 35:1547-1549. 2018.

LACAVA, P. T.; AZEVEDO, J. L. Endophytic bacteria: a biotechnological potential in agrobiological system. In: Maheshwari D. K.; Sarah M.; Aeron A. (eds.), **Bacteria in Agrobiological: Crop Productivity**, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p. 1-44, 2013.

LACAVA, P. T.; AZEVEDO, J. L. Biological control of insect-pest and diseases by endophytes. In: Verma, V. C.; Gange A. C. (eds.), **Advances in Endophytic Research**, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p. 231-256, 2014.

LACAVA P. T., SOUSA, C. P. Role of endophytic actinomycetes in crop protection: plant growth promotion and biological control. *Plant Growth Promoting Actinobacteria*. 1ed. Telangana, India: **Springer Singapore**, v. 1, p. 147-160. 2016.

LACAVA, P. T.; MELO, I. S.; PEREIRA, J. O. Controle biológico e simbiótico de insetos-pragas e doenças por micro-organismos endofíticos. In: AZEVEDO, J. L. et al. (Eds.). **Biotecnologia Microbiana Ambiental**. 1. ed. Maringá: Eduem, p. 83–104. 2018.

LADHA, J. K.; BRUIJN, F. J.; MALIK, K. A. Introduction: assessing opportunities for nitrogen fixation in rice-a frontier project. *Plant Soil*, v.124, p. 1–10, 1997.

LEBUHN, M; HARTMANN, A. Method for the determination of indole-3-acetic acid and related compounds of L-tryptophan catabolism in soils. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v.629, p.255-266, 1993.

LEINHOS, V.; VACEK, O. Biosynthesis of auxins by phosphate-solubilizing rhizobacteria from wheat (*Triticum aestivum*) and rye (*Secale cereale*). **Microbiological Research**, Jena, v.149, p. 31-35, 1994.

LI, Z. et al. Biosynthesis of rare hexoses using microorganisms and related enzymes. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 9, p. 2434–2445, 2013.

LIMA BOHNER, T. O.; ARAÚJO, L. E. B.; NISHIJIMA, T. O impacto ambiental do uso de agrotóxicos no meio ambiente e na saúde dos trabalhadores rurais. **Revista Eletrônica do Curso de Direito da UFSM**, v. 8, p. 329, 2013.

LIN, J., NISHINO, K., ROBERTS, M. C., TOLMASKY, M., AMINOV, R. I., AND ZHANG, L. Mechanisms of antibiotic resistance. *Front. Microbiol.* 6:34. doi: 10.3389/fmicb.2015.00034. 2015.

LING L.L., SCHNEIDER T., PEOPLES A.J., SPOERING A.L., ENGELS I., CONLON B.P. et al. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. **Nature** 517:455–459, 2015.

LIU, X.; KOKARE, C. Microbial Enzymes of Use in Industry. In: **Biotechnology of Microbial Enzymes**. [s.l.] Elsevier, p. 267–298. 2017.

LOPES, R. B.; MIOLA, D. T. B. Sequestro de carbono em diferentes fitofisionomias do cerrado. **SYNTHESIS Revista Digital FAPAM**, v.2,n. 2, p.127-143, 2010.

LOPEZ-BUCIO, J.; CAMPOS-CUEVAS, J. C.; HERNANDEZ-CALDERON E.; VELASQUEZBECERRA, C.; FARIAS-RODRIGUEZ, R.; MACIAS-RODRIGUEZ, L. I.; VALENCIA-CANTERO, E. *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root system architecture through an auxin- and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.20, p. 207-217, 2007.

LÓPEZ-VALDEZ, F.; FERNÁNDEZ-LUQUEÑO, F.; CEBALLOS-RAMÍREZ, J. M.; MARSCH, R.; OLALDE-PORTUGAL, V.; DENDOOVEN, L. A strain of *Bacillus subtilis* stimulates sunflower growth (*Helianthus annuus* L.) temporarily Scientia XXX Congresso

Nacional de Milho e Sorgo “Eficiência nas cadeias produtivas e o abastecimento global” **Horticulturae, Mission**, v.128, p. 499-505, 2011.

LUZ, W. C. Evaluation of plant growth-promoting and bioprotecting rhizobacteria on wheat crop. **Fitopatologia Brasileira**, 26, 597-600. 2001.

LUZ, J. S.; SILVA, R. L. O.; SILVEIRA, E. B.; CAVALCANTE, U. M. T. Atividade enzimática de fungos endofíticos e efeito na promoção do crescimento de mudas de maracujazeiro-amarelo. **Revista Caatinga**, Mossoró, v.19, p. 128-134, 2006.

LUZ, B. D. DA S. et al. bioprospecção de microrganismos produtores de enzimas de interesse industrial realizada no Parque Estadual Serra do Ouro Branco, Brasil bioprospecting microorganisms enzymes producers of industrial interest held on Serra Do Ouro Branco State Park, Brazil. **Interbio**, v. 10, p. 14–24, 2016.

MACHADO, P. C. Identificação molecular e caracterização bioquímica de bactérias endofíticas associadas à cultura do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) com potencial biotecnológico. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). **Universidade Federal de São Carlos**, São Carlos, 2015.

MACIEL, C. G., WALKER, C., MUNIZ, M. F. B., & ARAÚJO, M. M. Antagonismo de *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* (UFV3918) a *Fusarium sambucinum* em *Pinus elliottii* Engelm. **Revista árvore**, 38(3), 505-512. 2014.

MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção in vitro para o controle microbiológico de patógenos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 1, p. 369–409, 1993.

MATARESE, F., SARROCCO, S., GRUBER, S., SEIDL-SEIBOTH, V., & VANNACCI, G. Biocontrol of *Fusarium* head blight: interactions between *Trichoderma* and mycotoxigenic *Fusarium*. *Microbiology*, 158(1), 98-106. 2012.

MATOS, A. D. M. et al. Phosphate solubilization by endophytic bacteria isolated from *Oryza sativa*. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 6, n. 10, p. 2713–2721, 2017.

MCCARTHY, A. J.; WILLIAMS, S. T. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environmental – a review. **Gene**, Viena, v. 115, p. 189-192, 1992.

MCKENZIE, R.H.; ROBERTS, T.L., Soil and fertilizers phosphorus update. **In: Proceedings of Alberta Soil Science Workshop Proceedings**, Feb. 20–22, Edmonton, Alberta, p. 84–104, 1990.

MELO, I.S. de. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. **Controle biológico**, v. 1, p. 17-30, 1998.

MELO, I.S. de; AZEVEDO, J. L. Controle biológico. v. 1. **Ed. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP**, p. 69-96, 1998.

MENDES, I. de C.; HUNGRIA, M. Resposta da soja à adubação nitrogenada na semeadura. **Embrapa Cerrados-Artigo de divulgação na mídia (INFOTECA-E)**, 2001.

MENDES, R.; AZEVEDO, J. L. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. **Micologia: Avanços no Conhecimento. (Maia LC, Malosso E and Yano-Melo AM, eds.). Ed. Universitária da UFPE, Recife**, p. 129-140, 2007.

MENDES, I. de C.; REIS JUNIOR, Fábio B. Microrganismos do solo e sustentabilidade dos agroecossistemas. **Planaltina, DF: Embrapa Cerrados**, 2010.

MENDES, R.; GARBEVA, P.; RAAIJMARKERS, J.M. The rizhosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. **Federation of European Microbiological Societies**, Oxford, v.37, p. 634-663, 2013.

MESSIAS, M.M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G.; GIESE, E. G.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v.32, p. 213-234, 2011.

MILLER, J. Experiment in molecular genetics, **New York: Cold Springs Harbor Laboratories**. 1972.

MINOTTO, E. Caracterização de compostos produzidos por actinomicetos para o biocontrole de *Bipolaris sorokiniana*. Dissertação de doutorado. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 2014.

MINUTOLO, M. et al. *Sphaceloma coryli*: a reemerging pathogen causing heavy losses on hazelnut in southern Italy. **Plant disease**, v. 100, n. 3, p. 548-554, 2016.

MIRANDA, M. A. et al. Evaluation of the schistosomicidal activity of the steroidal alkaloids from *Solanum lycocarpum* fruits. *Parasitology research* 111.1: 257-262. 2012.

MONCIARDINI, P. et. al. New PCR primers for the selective amplification of 16S rDNA from different groups of actinomycetes. **FEMS microbiology ecology**, Amsterdam, v. 1414, p. 1-11, 2002.

MONTEIRO, V.N.; SILVA, R.N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista Processos Químicos**, v.3, p. 9-23, 2009.

MORADI H., BAHRAMNEJAD B., AMINI J., SIOSEMARDEH A., HAJI-ALLAHVERDIPOOR K. Suppression of chickpea (*Cicer arietinum* L.) *Fusariums* wilt by *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum*. **Plant Omics**, 5(2), 68. 2012.

MOREIRA, F. M. S.; DA SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; DE CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v.1, p.74-99, 2010.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Rizosfera In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2. Ed. Lavras: Editora UFLA, p. 407-447, 2006.

MORGANTE, P. G. **Fixação biológica e assimilação de nitrogênio**. Disponível em: <<http://www.ciagri.usp.br/~lazaropp/FisioVegGrad/NetNitro.htm>>. Acesso: 20/02/2020. 2003.

MORSY E.M., ABDEL-KAWI K.A., KHALIL M.N.A. Efficiency of *Trichoderma viride* and *Bacillus subtilis* as biocontrol agents against *Fusarium solani* on tomato plants. **Egyptian Journal of Phytopathology**, 37(1), 47-57. 2009.

MOURA, T. M. de; OLIVEIRA G. C. X.; CHAVES L. J. Correlação entre floração, frutificação e variáveis ambientais em *Solanum lycocarpum*. A. St. Hil, **Solanaceae.Bioscience Journal** 26.3 .2010.

MUNARI, C. C., et al. Antiproliferative activity of *Solanum lycocarpum* alkaloidic extract and their constituents, solamargine and solasonine, in tumor cell lines. **Journal of natural medicines** 68.1: 236-241. 2014.

MUNEES, A.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal of King Saud University - Science**, v. 26, p. 1-20, 2014.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; VADIVELU, M.; ARUN, K. Isolation of bacterial strains possessing nitrogen-fixation, phosphate and potassium-solubilization and their inoculation effects on sugarcane. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 55, n. 3, p. 161-170, 2017.

MUTHULAKSHMI K; UMA C. Antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* silver nanoparticles. **Front Biosci** (Elite Ed). Jan 1;11:89-101. PubMed PMID:30468640. 2019.

NAKKEERAN, S.; DILANTHA FERNANDO, W.G.; SIDDIQUI, Z.A. Plant growth promoting rhizobacteria formulations and its scope in commercialization for the management of pests and diseases. In: Siddiqui, Z.A. (Ed.). **PGPR: biocontrol and biofertilization**. Amsterdam: Springer, p. 257-296. 2005.

NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A. Frequency and pathogenicity of *Fusarium solani* recovered from soybeans with sudden death syndrome. **Plant Dis**, v. 73, p. 581-584, 1989.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 3.ed. São Paulo: Sorvier, 975p. 2002.

NIGAM, P. S. Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications. **Biomolecules**, v. 3, p. 597–611, 2013.

NIHORIMBERE, V., ONGENA, M., CAWOY, H., BROSTAU, Y., KAKANA, P., JOURDAN, E., AND THONART, P. Beneficial effects of *Bacillus subtilis* on field-grown tomato in Burundi: Reduction of local *Fusarium* disease and growth promotion. **African Journal of Microbiology Research**, v.4, p. 1135-1142, 2010.

NINGTHOUJAM, D. S.; SHOVARANI, N. Isolation and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* strain DN1 Degrading p-Nitrophenol. **Research Journal of Microbiology**, v.5, p. 345-351, 2008.

OLIVEIRA-FILHO A.T.; RATTER J.A. Vegetation physiognomies and woody flora of the Cerrado biome. **The Cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna**, 91-120. 2002.

OLIVEIRA JUNIOR, et al. Alterações pós-colheita da “Fruta-de-Lobo” (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) durante o amadurecimento: análises físico-químicas, químicas e enzimáticas. **Revista Brasileira de Fruticultura** 26.3: 410-413. 2004.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, v.7, p.97-109, 2012.

PAL, K. K.; GARDENER, B. M. Biological control of plant pathogens. **The Plant Health Instructor**, p. 1–25, 2006.

PAMPHILE, J. A. et al. aplicações biotecnológicas de metabólitos secundários extraídos de fungos endofíticos: o caso do *Colletotrichum* sp. biotechnological applications of secondary metabolites extracted from endophytic fungi: the case of *Colletotrichum* sp. **Revista UNINGÁ**, v. 53, n. 1, p. 113–119, 2017.

PANDEY, P. K.; SINGH, M. C.; SINGH, S.; SINGH, A.; KUMAR, M.; PATHAK, M.; SHAKYWAR, R. C.; PANDEY, A. K. Inside the plants: endophytic bacteria and their functional attributes for plant growth promotion. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, Tamil Nadu, v. 6, n. 2, p. 11 -21, 2017.

PARMAR, N.; DUFRESNE, J. beneficial interactions of plant growth promoting rhizosphere microorganisms A. Singh et al. (eds.), **Bioaugmentation, Biostimulation and Biocontrol, Soil Biology** Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 27-42, 2011.

PARRAY, J. A.; MIR, M. Y.; SHAMEEM, N. Sustainable Agriculture: Biotechniques in Plant Biology. **Springer Nature**. 2019.

PAULA, V. G. et al. Enterobactérias produtoras de carbapenemase: prevenção da disseminação de superbactérias em UTI's. **Universitas: Ciências da saúde**, v. 15, nº2. 2016.

PASTOR-CORRALES, M. A. et al. Reactions of selected bean germ plasms to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Plant disease**, v. 71, n. 11, p. 990-993, 1987.

PATEL, G. Isolation and characterization of starch degrading bacteria from garden soil, Ganpat University, Gujarat, India. **Indian Journal of Microbiology Research**, v.2, p. 111-114, 2015.

PATIL, N. B.; GAJBHIYE, M.; AHIWALE, S. S.; GUNJAL, A. B.; KAPADNIS, B. P. Optimization of indole 3-acetic acid (IAA) production by *Acetobacter diazotrophicus* L1 isolated from sugarcane. **International Journal of Environmental Sciences**, v.2, p.295-302, 2011.

PATIL, P.; SABALE, S.; DEVALE, A. Isolation and characterization of protease producing bacteria from rhizosphere soil and optimization of protease production parameters. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v.2, p. 58-64, 2015.

PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.42, p. 207-220, 1996.

PEIXOTO NETO, P. A de S.; AZEVEDO, J. L.; CAETANO L. C. Micro-organismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. **Boletim Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas** 3.4: 69-72. 2004.

PELZER, G. Q. Mecanismos de controle da murcha-de-esclerócio e promoção de crescimento em tomateiro mediados por rizobactérias. 78p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – **Universidade Federal de Roraima**, Boa Vista, 2010.

PÉREZ, M. M., GONÇALVES, E. C. S., VICI, A. C., SALGADO, J. C. S., & DE MORAES, M. D. L. T. Fungal Lipases: versatile tools for white biotechnology. in recent advancement in white biotechnology through fungi (pp. 361-404). **Springer, Cham**. 2019.

PHOULIVONG, Sittisack et al. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. **Fungal Diversity**, v. 44, n. 1, p. 33-43, 2010.

PIMENTEL M.R. et al. The use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in the biotransformation process. **Biotechnology Research International**, v. 2011, 2011.

PIÑEIRO, M. Z. V.. Ocurrence of antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistant genes in water filtration plants in Puerto Rico. Tese de Doutorado. **Universidad del Turabo (Puerto Rico)**. 2019.

PIZA, A.C.M.T.; HOKKA, C.O.; SOUSA, C.P. Endophytic actinomycetes from *Miconia albicans* (sw.) Triana (*Melastomataceae*) and evaluation of its antimicrobial activity. **Journal of Scientific Research and Reports**, v. 4, p. 281-291, 2015.

PIZA A.C.M.T., LIMA L.C.P.S., HOKKA C.O., SOUSA, C.P. Endophytic *Nocardiosis dassonvillei* and *Amycolatopsis orientalis* isolated from Brazilian tropical savannah presented antibiosis against pathogens. **Microbes in the spotlight: recent progress in the understanding of beneficial and harmful microorganisms**. 1ed. Dublin: BrownWalker Press, v. 1, p. 264-266. 2016.

POLITZER, K.; BOM, E. P. S. Enzimas Industriais e Especiais- Visão geral e área de enzimas, conclusões e recomendações. **CGEE- Centro de Gestao e Estudos Estratégicos**. Ciencia, Tecnologia e Inovação. Rio de Janeiro, p. 580. 2006.

PRASAD, M. P.; DAGAR, S. Identification and characterization of Endophytic bacteria from fruits like Avacado and Black grapes. **International Journal Microbiology and Applied Sciences**, v.3, p. 937-947, 2014.

PREININGER, C. et al. Concepts and applications of foliar spray for microbial inoculants. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 102, n. 17, p. 7265-7282, 2018.

PREVEDELLO, J. A.; CARVALHO C. J. B. Conservação do Cerrado brasileiro: o método pan-biogeográfico como ferramenta para a seleção de áreas prioritárias. **Natureza e Conservação** 4.1: 39-57. 2006.

PROCTOR, R. H. et al. Fumonisin production in the maize pathogen *Fusarium verticillioides*: genetic basis of naturally occurring chemical variation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 6, p. 2424-2430, 2006.

PUGSLEY, A. P.; B. Oudega. Methods for studying colicins and their plas-mids. Plasmids, a practical approach. **Press**, Oxford, United Kingdom. p. 105-161, 1987.

QUECINE, M. C.; ARAÚJO, W. L.; ROSSETO, P. B.; FERREIRA, A.; TSUI, S.; LACAVAL, P. T.; MONDIN, M.; AZEVEDO, J. L.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. Sugarcane growth promotion by yhe endophytic bacterium *Pantoea agglomerans* 33.1. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.78, p. 7511- 7518, 2012.

QUECINE, M.C.; BATISTA, B. D.; LACAVAL, P. T. Diversity and biotechnological potential of plant-associated endophytic bacteria. In: Kumar, P. Ananda.; Govil, J. N. **Biotechnology: Plant Biotechnology**, v.2, p. 377-424, 2014.

QIN, S. et al. Biodiversity and plant growth promoting traits of culturable endophytic actinobacteria associated with *Jatropha curcas* L. growing in Panxi dry-hot valley soil. **Applied Soil Ecology**, v. 93, p. 47–55, 2015.

RAIJ, B. van. Fertilidade do solo e manejo de nutrientes. Piracicaba: **International Plant Nutrition Institute**, 420 p, 2011.

RAMBO, L., SILVA, P. R. F. D., ARGENTA, G., & SANGOI, L. Parâmetros de planta para aprimorar o manejo da adubação nitrogenada de cobertura em milho. **Ciência Rural**, 34(5), 1637-1645. 2004.

RAMOS, A. P. S. Estudo de bactérias potencialmente promotoras de crescimento em *Citrus* sp. Tese (Doutorado em Ciência do solo). 110p. **Universidade Federal Rural de Pernambuco- UFRPE**. 2016.

RAO, M. B.; TANKSALE A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPAND, V. V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62 p. 597-635. 1998.

RATTI R.P., SOUSA, C.P. *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA) e infecções nosocomiais. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, 30(2):137-143, 2009.

RATZ, R. J. et al. Potencial biotecnológico de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas no cultivo de milho e soja. **Engvista**, v. 19, n. 4, p. 890-905, 2017.

REED, G. Enzymes in food processing. 2 ed. **Wisconsin: Academic Press**, 573p. 1975.

REED S. C.; CLEVELAND, C. C.; TOWNSEND, A. R. Microbial community shifts influence patterns in tropical forest nitrogen fixation. **Oecologia**, v.164, p.521-531, 2010.

REMPEL, C. et al. Efeito antimicrobiano de plantas medicinais: uma revisão de estudos científicos. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 10, n. 4, p. 57-82, 2019.

RODRIGUES, E. P., RODRIGUES, L. S., DE OLIVEIRA, A L. M., BALDANI, V. L. D., TEIXEIRA, K. R. S., URQUIAGA, S. & REIS, V. M. *Azospirillum amazonense* inoculation: effects on growth, yield and N₂ fixation of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant and Soil**, 302, 249-261. 2008.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v.17, p. 319-339, 1999.

ROMANO LH. Bioprospecção de endofíticos isolados de *Tabebuia* spp. e *Hymenae courbaril* e identificação da produção de metabólitos de interesse biotecnológico. Tese de Doutorado. 2015.

ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. / **827 MPMI**, v. 19, n. 8, p. 827–837, 2006.

SAHARAN, B. S.; NEHRA, V. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. v. 2011, p. 1–30, 2011.

SAITOU N.; NEI M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution** 4:406-425. 1987.

SANTIAGO, A. L. C. M. de et al. Isolation of Mucorales from processed maize (*Zea mays* L.) and screening for protease activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 698-700, 2008.

SANTOS, T. M. A. DOS. Diversidade genética de bactérias endofíticas associadas a frutos de café (*Coffea arabica* L.). Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa, 2008.

SANTOS, S. S. "Otimização multiobjetivo aplicada ao planejamento sistemático de conservação para espécies de plantas do cerrado brasileiro." *Dissertação de doutorado*, Universidade de Brasília, Brasília (2015).

SANTOYO, G. et al. Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological Research**, v. 183, p. 92–99, 2016.

SHARMA, A. et al. Plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas* sp. strain GRP3 influences iron acquisition in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 35, n. 7, p. 887-894, 2003.

SHTIENBERG, D. Rhizopus head rot of confectionery sunflower: effects on yield quantity and quality and implications for disease management. **Phytopathology**, v. 87, n. 12, p. 1226-1232, 1997.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Atividade de micro-organismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, p. 1495-1508, 2001.

SILVA, M. C. S. Bioprospecção e caracterização de micro-organismos endofíticos de isolados de sementes de guaranazeiro e o controle da antracnose (*Colletotrichum* spp.). 78p. Dissertação Mestrado em Ciências (Biologia na Agricultura e no Ambiente) - **Centro de energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo**, Piracicaba, 2015.

SILVA, V. de N. Estratégias para a conservação das espécies de lagartos (squamata) endêmicas do cerrado brasileiro. Dissertação de doutorado, **Universidade de Brasília**, Brasília 2014.

SILVA, A. A. Fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar cultivada em diferentes condições edafoclimáticas do nordeste brasileiro. Tese de doutorado. **Universidade Federal de Pernambuco**. 2017.

SILVA, C. de F. et al. Soil microbiological activity and productivity of maize fodder with legumes and manure doses. **Revista Caatinga**, v. 31, n. 4, p. 882–890, 2018.

SILVEIRA, A. P. D., FREITAS, S. S., SILVA, L. R. C., LOMBARDI, M. L. C. O. & CARDOSO, E. J. B. N. Interações de micorrizas arbusculares e rizobactérias promotoras do crescimento em plantas de feijão. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 19, 205-211. 1995.

SINGH, V. et al. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. **J Microb Biochem Technol**, v. 7, n. 2, p. 96–102, 2015.

SOLANKI, M.; KUNDU, B. S.; NEHRA, K. Molecular diversity of phosphate solubilizing bacteria isolated from the rhizosphere of chickpea, mustard and wheat. **Annals of Agrarian Science**, n. May 2017, p. 0–1, 2018.

SOUCHIE, E. L.; ABOUD, A. C. D. S. Solubilização de fosfato por microrganismos rizosféricos de genótipos de Guandu cultivados em diferentes classes de solo. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 1, p. 11–18, 2007.

SOUSA C.P. Mecanismos de patogenicidade de células bacterianas: resistência a agentes antimicrobianos. **Laes & Haes**, 171:130-142, 2008.

SOUZA R.; AMBROSINI A.; PASSAGLIA L. M. P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 4, p. 401-419, 2015.

SOUSA C.P.; SERRANO N.F.G.; LACAVA P.T. Endophytic microorganisms of the tropical savannah: a promising source of bioactive molecules. **Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics**. Springer, Cham, p. 57-70, 2017.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Auxin and plant-microbe interactions. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2011.

STANKOVIC, S. et al. Pathogenicity and mycotoxin production by *Fusarium proliferatum* isolated from onion and garlic in Serbia. **European Journal of Plant Pathology**, v. 118, n. 2, p. 165-172, 2007.

STRYER, L.; BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L. **Biochemistry** (5th ed.). San Francisco: W.H. Freeman. 2002.

SZILAGYI-ZECCHIN, V. J.; IKEDA, A. C.; HUNGRIA, M.; ADAMOSKI, D.; KAVA-CORDEIRO, V.; GLIENKE, C.; GALLI-TERASAWA, L. V. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. **AMB Express**. 2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 559p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4.ed Porto Alegre: Artmed, 2009. 848p

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

TAMURA K., NEI M., KUMAR S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. **Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)** 101:11030-11035. 2004.

TAO G. C.; TIAN S. J.; CAI M. Y.; XIE G. H. Phosphate solubilizing and -mineralizing abilities of bacteria isolated from. **Pedosphere**, v.18, p. 515-523, 2008.

TEATHER R. M.; WOOD P.J. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from bovine rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 43, p. 777-780, 1982.

TEYMOURI, M. et al. Assessment of phosphate solubilization activity of Rhizobacteria in mangrove forest. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 5, p. 168–172, 2016.

TIOSSI R. F. J., et. al. A validated reverse phase HPLC analytical method for quantitation of glycoalkaloids in *Solanum lycocarpum* and its extracts. **Journal of analytical methods in chemistry**. 2012.

TORRES, F. L. Isolamento, caracterização e potencial biotecnológico de fungos endofíticos associados à plantas do cerrado. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). **Universidade Federal de São Carlos**, São Carlos, 2018.

TYLER, B. M. *Phytophthora sojae*: root rot pathogen of soybean and model oomycete. **Molecular plant pathology**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2007.

VAN RAIJ, B. Fertilidade do solo e adubação. Piracicaba: Ceres; Potafos, 1991.

VANCURA, V.; KUNC, E. Interrelations between micro-organisms and plants in soil. **Developments in soil Science** 18. Amsterdam: Elsevier, p.492. 1989.

VEGA, N. O. W. A review on beneficial effects of rhizosphere bacteria on soil nutrient availability and plant nutrient uptake. **Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín**, v.60, p. 3621-3643, 2007.

VERMA, S.C.; LADHA, J.K.; TRIPATHI, A.K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep-water rice. **Journal of Biotechnology**, v.91, p. 127-141, 2001.

VERMELHO, A.B.; MEIRELLES, M. N. L.; LOPES, A.; PETINATE, S. D. G.; CHAIA, A. A.; BRANQUINHA, M. H. Detection of extracellular proteases from microorganisms on agar plates. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.91, p. 755-76, 1996.

VIDAL, M. C.; STACCIARINI-SERAPHIN E.; CÂMARA H. H. L. L. Crescimento de plântulas de *Solanum lycocarpum* St. Hil. (lobeira) em casa de vegetação. **Acta Botanica Brasilica** 13.3: 271-274. 1994.

VIEIRA, B. S. et al. Potencial antagonístico de *Bacillus subtilis* (bsv-05) contra os patógenos radiculares do feijoeiro: *Fusarium* spp., *Macrophomina phaseolina* e *Rhizoctonia solani*. **Ciência Agrícola**, v. 14, n. 1, p. 59–66, 2016.

WACHINGER, G. et. al. Identification of mycelium-associated cellulase from *Streptomyces reticuli*. **Applied and environmental microbiology**, v.55, n. 10, p.253-265, 1989.

WALIA, A. et al. Endophytic bacteria: role in phosphate solubilization. In: MAHESHWARI, D. K.; ANNAPURNA, K. (Eds.). **Endophytes: Crop Productivity and Protection**. Haryana: Springer International Publishing, v. 16p. 61–93. 2017.

XIE, C. H.; YOKOTA, A. *Pleomorphomonas oryzae* gen. nov., sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from paddy soil of *Oryza sativa*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 1233–1237, 2005.

YOSHIKAWA M., et al. Structures of steroidal alkaloid oligoglycosides, robeneosides A and B, and antidiabetogenic constituents from the Brazilian medicinal plant *Solanum lycocarpum*. **Journal of natural products** 70.2: 210-214. 2007.

YU, L. et al. Effects of competition and phosphorus fertilization on leaf and root traits of late-successional conifers *Abies fabri* and *Picea brachytyla*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 162, p. 14–24, jun. 2019.

ZAIDI A., KHAN M.S., AHMAD M., OVES M., WANI P.A. et al. Recent advances in plant growth promotion by phosphate-solubilizing microbes. In: Khan M. S, et al., editors. **Microbial Strategies for Crop Improvement**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; p. 23-50. 2009.

ZAIDI, A. et al. Scientia Horticulturae: Role of plant growth promoting rhizobacteria in sustainable production of vegetables. Current perspective. **Scientia Horticulturae**, v. 193, p. 231–239, 2015.

ZAMBOLIM, L. Doenças do cafeeiro. **Manual de Fitopatologia, Doenças das Plantas Cultivadas**, n. Figura 1, p. 193–213, 2016.

ZAMBUDIO, S.; FERREIRA, A. L. Fixação Biológica de Nitrogênio. **XXI Ciência para a Vida**, n. 1, p. 10-15, 2012.

ZHAO, L.; XU, Y.; LAI, X. Antagonistic endophytic bacteria associated with nodules of soybean (*Glycine max* L.) and plant growth-promoting properties. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 269–278, 2018.