



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE (CCBS)  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E PATOLOGIA (DMP)

Ana Beatriz de Sousa Ansanello

**Isolamento e caracterização de bactérias  
epifíticas e endofíticas isoladas de Bromélias do  
gênero *Tillandsia***

São Carlos - SP

2025



Ana Beatriz de Sousa Ansanello

**Isolamento e caracterização de bactérias  
epifíticas e endofíticas isoladas de Bromélias do  
gênero *Tillandsia***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
para obtenção do título de Bacharel em  
Biotecnologia pela Universidade Federal de  
São Carlos.

Orientação: Prof. Dr. Clovis W. O. de Souza

São Carlos - SP

2025

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo caminho em que me colocou e por estar comigo a cada passo dessa caminhada. Pela fé e pelo amor que me sustentam, me renovam a cada dia e me trouxeram até aqui.

Aos meus pais, por terem me ensinado no caminho desde pequena. Pela dedicação, esforço e incentivo para que eu pudesse ter a melhor educação, e pelo amor e conselhos que me fizeram quem eu sou hoje.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza, pelo acolhimento no grupo de pesquisa e por todos os ensinamentos que vão além do que os livros ensinam. Pela paciência, conselhos, broncas e conversas que contribuíram para o meu crescimento e formação.

À Zélia, por todo o cuidado e paciência e pelo trabalho fundamental que realiza no laboratório, sempre nos ajudando e ensinando de forma acolhedora.

Ao técnico Dr. Paulo Andrade, do DMP, pelo auxílio com reagentes e condução de experimentos necessários a esse trabalho.

Aos amigos que fiz no LMP, pelas conversas, incentivos, risadas e aprendizados durante os dias de trabalho. Por fazerem os meus dias mais divertidos e me ensinarem muitas coisas de áreas que eu não conhecia.

Às amigas que fiz graças à Biotecnologia, que foram minhas companheiras de trabalhos desde o primeiro semestre e caminharam comigo durante toda a graduação. Pelas conversas, desabafos e risadas e pela força que compartilhamos para chegar até aqui juntas.

Ao meu irmão, pela companhia e incentivo e por sempre estar ao meu lado e pronto para me ouvir, mesmo com a distância.

Ao curso de Bacharelado em Biotecnologia e à Universidade Federal de São Carlos, pela formação de excelência e oportunidades para o meu desenvolvimento acadêmico.

Aos membros da banca, Profa. Dra. Nathália Gonsales da Rosa Garzon e Dra. Amanda Carolina Prado de Moraes, por aceitarem fazer parte desse momento.

## RESUMO

A família Bromeliaceae é nativa de regiões neotropicais e inclui uma ampla variedade de gêneros e espécies, sendo altamente adaptadas devido à presença dos tricomas foliares, estruturas essenciais para a absorção de água e nutrientes. O gênero *Tillandsia* contém o maior número de espécies dentro da família e é completamente epífito, apresentando um padrão de interação com microrganismos crucial para a proteção, crescimento vegetal e nutrição, especialmente quanto à fixação de nitrogênio e solubilização de fosfato. Assim, a importância das comunidades bacterianas nas espécies de *Tillandsia* torna-se um amplo campo de pesquisa focado na diversidade microbiana em bromélias brasileiras, o qual até o momento tem sido negligenciado. Este estudo teve como objetivo o isolamento e a caracterização de bactérias endofíticas e epifíticas encontradas em espécies de *Tillandsia* do sudeste brasileiro, dada a escassez de estudos focados nestas interações e suas potenciais aplicações biotecnológicas. Para isso, foram coletadas em árvores e cercas amostras das espécies *Tillandsia pohliana*, *Tillandsia tricholepsis* e *Tillandsia recurvata* no campus da Universidade Federal de São Carlos em São Carlos (SP). As plantas foram devidamente desinfetadas para o isolamento de bactérias de interesse, com alíquotas semeadas em placas de Petri contendo meios TSA a 10% e Caseína Glicerol e incubadas a 30°C durante 30 dias. Os microrganismos foram isolados em culturas puras, com as quais foram realizados testes de fixação de nitrogênio em meio NFb, solubilização de fosfato inorgânico em meio de cultura sólido contendo fosfato de cálcio tribásico, produção de Ácido Indol-Acético e atividade antimicrobiana contra patógenos de interesse médico. A partir de 7 amostras vegetais coletadas, foram obtidas 54 culturas bacterianas isoladas, das quais 46% foram obtidas das coletas de árvores e, o restante, de cercas. Ao todo, 46% das bactérias foram positivas para fixação de nitrogênio, 59% foram capazes de solubilizar fosfato e todas produziram AIA *in vitro*. Um isolado apresentou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*. As análises estatísticas demonstraram destaque do meio ACG para isolamento, e revelaram não haver diferença significativa nas médias dos valores obtidos nos ensaios quanto à espécie de bromélia e o local de coleta. Esses resultados demonstram a grande diversidade microbiana presente na superfície foliar e no interior dos tecidos das bromélias do gênero *Tillandsia*, indicando a importância crucial desses isolados na nutrição e no crescimento vegetal e comprovando o interesse na potencial utilização dessas bactérias como bioinsumos.

Palavras-chave: bioprospecção; isolamento; Bromeliaceae; fixação de nitrogênio; solubilização de fosfato; AIA.

## ABSTRACT

### *Isolation and characterization of endophytic and epiphytic bacteria isolated from Tillandsia* *genus*

The Bromeliaceae family is native to neotropical regions and includes a wide variety of genera and species, being highly adapted due to the presence of foliar trichomes, structures essential for the absorption of water and nutrients. The genus *Tillandsia* contains the largest number of species within the family and is completely epiphytic, exhibiting a pattern of interaction with microorganisms that is crucial for protection, plant growth, and nutrition, especially regarding nitrogen fixation and phosphate solubilization. Thus, the importance of bacterial communities in *Tillandsia* species represents a broad research field focused on microbial diversity in Brazilian bromeliads, which has so far been largely neglected. This study aimed to isolate and characterize endophytic and epiphytic bacteria found in *Tillandsia* species from southeastern Brazil, given the scarcity of studies focused on these interactions and their potential biotechnological applications. For this purpose, samples of *Tillandsia pohliana*, *Tillandsia tricholepsis*, and *Tillandsia recurvata* were collected from trees and fences on the campus of the Federal University of São Carlos (São Carlos, SP). The plants were properly disinfected for the isolation of bacteria of interest, with aliquots plated on Petri dishes containing 10% TSA and Casein Glycerol media, and incubated at 30°C for 30 days. Microorganisms were isolated in pure cultures, which were then subjected to tests for nitrogen fixation in NFb medium, inorganic phosphate solubilization in solid culture medium containing tricalcium phosphate, indole-3-acetic acid (IAA) production, and antimicrobial activity against medically relevant pathogens. From the seven plant samples collected, 54 bacterial isolates were obtained, of which 46% came from tree collections and the remainder from fences. Overall, 46% of the bacteria were positive for nitrogen fixation, 59% were capable of phosphate solubilization, and all of them produced IAA *in vitro*. One isolate exhibited antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*. Statistical analyses highlighted the efficiency of the ACG medium for bacterial isolation and revealed no significant differences in the mean values obtained from the assays regarding bromeliad species or collection site. These results demonstrate the high microbial diversity present on the leaf surfaces and within the tissues of bromeliads from the genus *Tillandsia*, indicating the crucial role of these isolates in plant nutrition and growth, and confirming their potential use as bioinoculants.

Keywords: bioprospecting; isolation; Bromeliaceae; nitrogen fixation; phosphate solubilization; IAA

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Espécies de <i>Tillandsia</i> encontradas em galhos de árvores (A) e fixadas em cerca metálica.....	16
Figura 2 - Estrutura dos tricomas foliares de <i>Tillandsia usneoides</i> sob aumento a 20x no microscópio.....	17
Figura 3 – Bromélias coletadas para o isolamento de bactérias. Da esquerda para a direita: <i>Tillandsia pohliana</i> (A, D), <i>Tillandsia recurvata</i> (B, E) e <i>Tillandsia tricholepsis</i> (C, F) .....	22
Figura 4 – Esquema das etapas de desinfecção, conforme descritas na metodologia .....	24
Figura 5 – Esquema das etapas de isolamento, separadas por amostras destinadas à obtenção de bactérias epifíticas e endofíticas .....	25
Figura 6 – Esquema do teste de fixação biológica de nitrogênio .....	26
Figura 7 – Esquema do teste de solubilização de fosfato .....	26
Figura 8 – Esquema das etapas do teste de produção de AIA pelos isolados .....	27
Figura 9 – Reação do reagente Salkowski com concentrações de AIA de 0 a 100 µg/mL .....	28
Figura 10 – Curva padrão relacionando a absorbância a 520 nm com as concentrações AIA .....	28
Figura 11 – Esquema das etapas dos ensaios de atividade antimicrobiana .....	29
Figura 12 – Bactérias isoladas de <i>Tillandsia pohliana</i> . A) Coletadas de árvores. B) Coletadas de cercas .....	32
Figura 13 – Bactérias isoladas de <i>Tillandsia tricholepsis</i> . A) Coletadas de árvores. B) Coletadas de cercas .....	32
Figura 14 – Bactérias isoladas de <i>Tillandsia recurvata</i> . A) Coletadas de árvores. B) Coletadas de cercas .....	33
Figura 15 – Em A, B, C: Culturas de bactérias em meio NFb positivas com película de crescimento indicado pelas setas e mudança de coloração. Em D, resultado negativo para fixação de nitrogênio .....	34
Figura 16 – Placas de Petri contendo meio com fosfato de cálcio tribásico, sendo os halos translúcidos em volta das colônias indicadores de solubilização .....	36

Figura 17 – Gráfico de barras contendo os valores médios dos índices de solubilização de fosfato e desvio padrão obtidos pelos isolados com resultados positivos nos testes em meio contendo fosfato de cálcio tribásico.....	<b>37</b>
Figura 18 – Amostras do teste de produção de Ácido Indol-Acético, com intensidade de coloração indicando maior concentração .....	<b>38</b>
Figura 19 – Gráfico de barras contendo as concentrações de AIA (µg/mL) obtidas pelos isolados que apresentaram alta produção desse composto. ....	<b>39</b>
Figura 20 – Placas de Petri contendo resultados dos testes antimicrobianos por difusão em poço, com setas indicando halos de inibição do crescimento de <i>S. aureus</i> por clorexidina a 0,2% e pelo isolado TP009 .....	<b>40</b>
Figura 21 – Gráfico de barras comparando os números de bactérias obtidos em cada meio de isolamento quanto a FBN, solubilização de fosfato e alta produção de AIA .....	<b>42</b>
Figura 22 – Box-plot contendo uma visualização dos resultados obtidos nos diferentes meios de isolamento utilizados. A) Teste de solubilização de fosfato, meios com resultados estatisticamente semelhantes. B) Teste de produção de AIA, apresentando diferença significativa nos resultados obtidos entre os meios TSA e ACG .....	<b>43</b>
Figura 23 – Box-plot contendo uma visualização dos resultados obtidos nos isolamentos quanto às diferentes espécies de <i>Tillandsia</i> e locais de coleta. A) Testes de solubilização de fosfato, condições com resultados estatisticamente semelhantes. B) Testes de produção de AIA, condições com resultados estatisticamente semelhantes .....	<b>44</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Visão geral no número de bactérias isoladas por local de coleta, espécie de <i>Tillandsia</i> , meio de cultura e método de isolamento epifítico ou endofítico .....	<b>28</b>
Tabela 2 – Resultados da atividade de fixação de nitrogênio pelos isolados, com (+) indicando resultado positivo e (-), resultado negativo .....	<b>32</b>

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ACG – Ágar Caseína-Glicerol

AIA – Ácido Indol-Acético

ATCC – American Type Culture Collection

FBN – Fixação Biológica de Nitrogênio

PBS – Phosphate-Buffered Saline

TSA – Tryptone Soya Agar

TSA 10% – Tryptone Soya Agar diluído em 10 vezes

TSB – Tryptone Soya Broth

TSB 10% – Tryptone Soya Broth diluído em 10 vezes

UFSCar – Universidade Federal de São Carlos

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>7</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>	<b>10</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>16</b>
2.1 O Gênero Tillandsia.....	16
2.2 Bioprospecção de microrganismos de interesse biotecnológico.....	17
2.3 Fixação Biológica de Nitrogênio.....	18
2.4 Solubilização Biológica de Fosfato.....	19
2.5 Ácido Indol-3-Acético.....	19
2.6 Substâncias antimicrobianas produzidas por microrganismos.....	20
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
3.1. Objetivo Geral.....	21
3.2. Objetivos específicos.....	21
<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>22</b>
4.1 Coleta.....	22
4.2 Desinfecção das amostras.....	22
4.3 Isolamento de bactérias endofíticas e epifíticas.....	24
4.4 Ensaios de fixação biológica de nitrogênio.....	25
4.5 Ensaios de solubilização de fosfato inorgânico.....	26
4.6 Testes de produção de Ácido Indol-acético (AIA).....	27
4.7 Ensaios de atividade antimicrobiana contra microrganismos de interesse médico.....	28
4.8 Análise estatística dos resultados.....	30
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>31</b>
5.1 Isolamento e caracterização dos isolados.....	31
5.2 Fixação biológica de nitrogênio (FBN).....	33
5.3 Solubilização de fosfato inorgânico.....	36
5.4 Testes de produção de AIA.....	38
5.5 Ensaios de atividade antimicrobiana contra microrganismos de interesse médico.....	40
5.6 Comparações entre meios utilizados, locais de coleta e espécies de Tillandsia na obtenção de isolados com potencial no estímulo do crescimento vegetal.....	41
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>45</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>46</b>
<b>APÊNDICE A - Caracterização Morfológica dos isolados.....</b>	<b>51</b>
<b>APÊNDICE B – Resultados dos testes de fatores de crescimento vegetal.....</b>	<b>54</b>
<b>ANEXO 1 - Composição de meios de cultura e soluções.....</b>	<b>57</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A família Bromeliaceae é característica de regiões neotropicais, apresentando grande quantidade de gêneros e espécies que podem ser encontrados em diferentes tipos de nichos ambientais, desde florestas a desertos. Uma característica fundamental dessa família vegetal é a presença de tricomas na superfície foliar, estruturas especializadas em absorver umidade e nutrientes disponíveis na atmosfera ou em reservatórios (Benzing, 1990).

Devido à existência dos tricomas, as bromélias apresentam adaptações essenciais ao epifitismo, uma relação cujos mecanismos de aquisição de sais essenciais e captação de água em situações de estresse hídrico são fundamentais para a sobrevivência. O padrão de distribuição de espécies epífitas da família Bromeliaceae é influenciado por vários fatores ambientais. Assim, existe uma variação temporal na criação e modificação de micro-habitats entre os forófitos que as sustentam, com condições particulares para o desenvolvimento vegetal de acordo com a disponibilidade e captação de recursos (Benzing, 1990).

Entre a família Bromeliaceae, o gênero *Tillandsia* contém o maior número de espécies de bromélias, das quais todas são essencialmente epífitas, devido à total perda de contato com o solo (Smith & Downs, 1977; Brighigna *et al.*, 1992). O epifitismo nesse gênero é muito particular, principalmente devido à alta funcionalidade e adaptação morfológica dos tricomas presentes na região foliar, dispensando a necessidade de absorção radicular. Logo, é possível observar a presença de espécies de *Tillandsia* em estruturas inertes como cercas e cabos elétricos de alta tensão, nas quais as raízes apresentam apenas a função de adesão (Brighigna *et al.*, 1992).

Considerando esses fatores, Brighigna e colaboradores (1992) descreveram a importância em investigar como as espécies de *Tillandsia* são capazes de atender suas demandas nutricionais em condições de desenvolvimento tão diversas, considerando principalmente a obtenção de nitrogênio. Em especial, as comunidades de microrganismos epifíticos e endofíticos podem ser a chave para a sobrevivência desses vegetais, sobretudo com atividades relativas à fixação de nitrogênio e à solubilização de fosfato.

Como definido por Lindow e Brandi (2003), epifíticos são microrganismos que habitam e se reproduzem na superfície foliar, dos quais os mais abundantes são as bactérias. A grande variação de fatores físicos, como umidade e temperatura, somada às condições de disponibilidade de nutrientes, ocasiona alterações nos padrões populacionais dos epifíticos ao longo do tempo. Por compartilharem o mesmo nicho que alguns patógenos foliares, esses microrganismos competem por nutrientes e assim têm a capacidade de produzir substâncias

antimicrobianas contra os invasores, tornando-as benéficas ao seu hospedeiro (Blakeman & Brodie, 1997).

As bactérias endofíticas estão presentes no interior da maioria das plantas vasculares, colonizando o meio intra ou intercelular sem causar danos aparentes ou alterações físicas e fisiológicas na planta hospedeira (Firáková *et al.*, 2007; Joo *et al.*, 2020). Na literatura, os endofíticos têm sido caracterizados por sua capacidade de produzir compostos promotores de crescimento vegetal e metabólitos antimicrobianos, além da proteção contra patógenos, fixação de nitrogênio atmosférico e solubilização e assimilação de fosfato (Neto *et al.*, 2002; Rosenblueth & Martínez-Romero, 2007). Comparado aos epifíticos, esse grupo apresenta vantagem ecológica devido ao ambiente mais protegido de condições adversas no interior vegetal, como mudanças de temperatura, potencial osmótico, radiação ultravioleta e competição com outros microrganismos (Hallmann *et al.*, 1997).

Em pesquisas realizadas com espécies desérticas de *Tillandsia*, foram observadas nas superfícies foliares comunidades bacterianas distintas altamente adaptadas ao modo de vida epífita dos hospedeiros (Hakobyan, 2023). Essa relação é facilitada principalmente pelas características estruturais das bromélias, as quais permitem o acúmulo de serapilheira entre as folhas, criando um microambiente rico em fonte de matéria orgânica para várias comunidades microbianas (Ospina-Bautista & Varón, 2016). Ademais, também são encontradas diversas bactérias endofíticas nos tecidos internos de espécies de *Tillandsia*. Conforme demonstrado por Giongo *et al.* (2013), os benefícios da associação dessas bactérias com as bromélias envolvem a solubilização de fosfato e produção de fito-hormônios vitais ao crescimento vegetal.

Ainda existem poucos estudos demonstrando a diversidade microbiana em bromélias nativas da região sudeste do Brasil, sendo a maior parte deles focados em espécies de fungos endofíticos. Porém, as pesquisas com destaque em bactérias têm caracterizado a alta diversidade de espécies epifíticas e endofíticas, que colabora com a adaptação vegetal em ambientes cujas condições nutricionais são limitadas e promove o crescimento do hospedeiro (Ambrosini *et al.*, 2007; Giongo *et al.*, 2013; Viana *et al.*, 2020). Logo, trata-se de um campo de estudo com alto potencial para a bioprospecção de microrganismos e definição de características como fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato e produção de hormônios vegetais.

Pesquisas recentes destacam a importância de explorar os microbiomas únicos das espécies vegetais diversas para a caracterização de microrganismos e metabólitos de interesse

biotecnológicos, os quais podem ser úteis para a agricultura, formulação de fármacos e conservação da biodiversidade (Aghdam & Brown, 2021; Strobel, 2003). Portanto, o presente trabalho tem como justificativa o grande potencial no isolamento e estudo de características das bactérias endofíticas e epifíticas presentes em espécies de *Tillandsia* típicas do sudeste brasileiro, considerando o baixo número de estudos que descrevem as relações estabelecidas entre os microrganismos e o gênero de bromélias em questão.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 O Gênero *Tillandsia*

A família Bromeliaceae abrange aproximadamente 56 gêneros e 3.010 espécies epífitas ou terrestres (Brown; Gilmartin, 1987; Luther, 2004). Suas subfamílias são divididas em Pitcairnioideae, Tillandsioideae e Bromelioideae, as quais são classificadas de acordo com tipo de tricoma e fruto, posição do ovário e modo de crescimento (Smith & Downs, 1979).

Um padrão de epifitismo interessante pode ser encontrado na subfamília Tillandsioideae, cujas espécies não demonstram qualquer contato com o solo, crescendo em árvores ou até estruturas inertes (Brighigna *et al.*, 1992) (Figura 1). O gênero *Tillandsia* é o maior da família Bromeliaceae, com mais de 650 espécies registradas (Estrella-Parra *et al.*, 2019). Essas plantas se destacam pela sua habilidade em absorver água e nutrientes diretamente do ar, tornando-se bioindicadores de poluição e presença de metais como chumbo, cobre e cádmio no ambiente (Brighigna *et al.*, 1997).



Figura 1 - Espécies de *Tillandsia* encontradas em galhos de árvores (A) e fixadas em cerca metálica. Fonte: autoria própria (2025).

Uma adaptação crucial à sobrevivência dessas plantas em condições ambientais consideradas extremas ao nicho epífito é o refinamento da forma e função dos tricomas foliares, visto que as raízes são incapazes de absorver água e têm função exclusiva de fixação ao substrato (Papini *et al.*, 2010; Smith & Downs, 1974). Os tricomas têm a função de melhorar a camada de captura de nutrientes na superfície foliar, reduzindo a perda de água para o ambiente e facilitando o transporte para o interior da planta (Figura 2). A morfologia e

densidade dessas estruturas varia não somente entre espécies, mas também entre indivíduos a depender da localização da folha e da idade da planta (Benz & Martin, 2006).



Figura 2 - Estrutura dos tricomas foliares de *Tillandsia usneoides* sob aumento a 20x no microscópio. Fonte: Mark Smith (2016).

Por conta dessas características particulares, o gênero *Tillandsia* desperta grande interesse de autores que buscam estudar as interações ecológicas dessas bromélias com o ambiente. Além disso, possui relevância cultural e econômica por conta de sua diversidade morfológica que se destaca no paisagismo e também é utilizado na medicina tradicional para o tratamento de diversas condições, como tosse, bronquite, febre e dor de ouvido (Estrella-Parra *et al.*, 2019).

## 2.2 Bioprospecção de microrganismos de interesse biotecnológico

O Brasil detém cerca de 20% da biodiversidade mundial, porcentagem que pode ser considerada também para microrganismos. A diversidade biológica é uma implicação da diversidade química adquirida evolutivamente para garantir a sobrevivência dos ecossistemas. Dessa forma, existe um grande potencial para bioprospecção de microrganismos que apresentem propriedades de interesse derivadas de vias bioquímicas relacionadas a interações que estes apresentam com o ambiente (Strobel & Daisy, 2003; Val *et al.*, 2022).

Atualmente, substâncias bioativas produzidas por microrganismos são investigadas para aplicação biotecnológica em áreas distintas, como a industrial, agrícola e da saúde. Sabe-se, por exemplo, que diversos microrganismos podem promover o crescimento de plantas às quais se associam, assim sendo considerados bioinsumos capazes de substituir os sintéticos que causam impactos negativos no meio ambiente (Chagas *et al.*, 2017). Além

disso, microrganismos são capazes de produzir moléculas antimicrobianas, o que se destaca na atualidade em que cepas resistentes a antibióticos têm surgido e se tornado cada vez mais difíceis de controlar com os medicamentos disponíveis no mercado (Strobel & Daisy, 2003).

O número de espécies de microrganismos conhecidos descritos na literatura representa apenas uma pequena parte da diversidade microbiana total encontrada na natureza. Estudos de diversidade de bactérias em ecossistemas brasileiros ainda são escassos, tanto pela limitação na classificação em comparação à plantas e animais quanto pela dificuldade de definição das condições ideais de cultivo em laboratório (Manfio, 2003). Dessa forma, mais estudos de isolamento e caracterização microbiana são necessários para dimensionar a biodiversidade de microrganismos encontrados nos biomas brasileiros, tanto para fins de conservação quanto para a prospecção de características de interesse biotecnológico (Chagas *et al.*, 2017).

### **2.3 Fixação Biológica de Nitrogênio**

O nitrogênio é o principal nutriente limitante do crescimento vegetal, sendo essencial para a síntese de biomoléculas como proteínas, ácidos nucleicos e metabólitos primários e secundários. Apesar da abundância do nitrogênio na atmosfera, as plantas são incapazes de assimilá-lo diretamente, sendo necessária a ação de microrganismos fixadores que tornem esse composto disponível no solo em formas que possam ser absorvidas, como amônio, nitrito e nitrato. Dessa forma, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) é, após a fotossíntese, o processo biológico mais importante para as plantas (Gallo & Basso, 2012; Rezende *et al.*, 2021).

As bactérias fixadoras de nitrogênio podem estabelecer associação simbiótica com leguminosas, como é o caso dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, e podem também ser espécies de vida livre ou endofíticas, como as do gênero *Azospirillum*. A FBN é comum a todas elas por meio da ação da enzima nitrogenase, cujas subunidades são compostas por proteínas codificadas pelo grupo de “operons” *nif*. O uso de inoculantes naturais capazes de realizar FBN é um grande campo de interesse para a agricultura, pois pode reduzir o uso de fertilizantes nitrogenados e aumentar a disponibilidade de nitrogênio no solo de forma sustentável (Chang *et al.*, 2015; Rezende *et al.*, 2021).

## 2.4 Solubilização Biológica de Fosfato

O fósforo é o segundo nutriente limitante ao crescimento das plantas, associado a processos fisiológicos essenciais para o desenvolvimento vegetal como fotossíntese e respiração (compondo o ATP e NADPH) além da formação da membrana celular (bicamada fosfolipídica). Esse composto é encontrado em minerais e matéria orgânica, sendo necessária a ação de microrganismos capazes de absorvê-lo em sua forma insolúvel e convertê-lo para formas orgânicas de fosfato, que podem ser incorporadas por células vivas (Khan *et al.*, 2014). Bactérias capazes de solubilizar fosfato, como espécies pertencentes aos gêneros *Agrobacterium*, *Pseudomonas* e *Bacillus*, secretam ácidos orgânicos, quelando os íons minerais e acidificando o meio. Esse processo permite a solubilização do fósforo e, conseqüentemente, sua absorção e processamento no ambiente (Marra *et al.*, 2012; Rezende *et al.*, 2021).

## 2.5 Ácido Indol-3-Acético

O hormônio vegetal ácido indol-3-acético (AIA) é uma auxina responsável pela regulação de vários processos celulares no desenvolvimento vegetal, como a divisão celular, alongamento e diferenciação de tecidos, crescimento das raízes, folhas e frutos, e modulação das respostas à luz e às condições de estresse (Glick, 2012).

Alguns microrganismos são capazes de produzir AIA, sendo as vias de biossíntese mais utilizadas dependentes de triptofano, como as vias do indol-3-acetamida (IAM), indol-3-acetonitrila (IAN), cadeia lateral da triptofano oxidase (TSO), indol-3-piruvato (IPA) e triptamina (TA) (Estenson *et al.*, 2018). A síntese exógena dessa auxina é ainda mais significativa quando as condições para produção vegetal são desfavoráveis, beneficiando a planta ao favorecer a proliferação das raízes, e conseqüente aumento da capacidade de absorção de água e nutrientes (Lambrecht *et al.*, 2000).

Dentre bactérias conhecidas capazes de realizar a produção de AIA, estão gêneros como *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus* e *Pseudomonas*. A aplicação de bactérias produtoras de fito-hormônios na agricultura, pode ser útil para melhorar a fisiologia, biomassa e rendimento de culturas vegetais, aumentando o tamanho, número de ramos e área de superfície das raízes (Rezende *et al.*, 2021).

## 2.6 Substâncias antimicrobianas produzidas por microrganismos

O desenvolvimento de mecanismos de resistência aos compostos antimicrobianos existentes por microrganismos patogênicos é um grande problema de saúde pública. Esse cenário traz urgência à busca por novos antibióticos que apresentem resposta eficaz no tratamento de doenças infecciosas. Na última década, produtos naturais foram utilizados como as principais fontes de agentes antimicrobianos, sendo biomoléculas produzidas por plantas, fungos e bactérias altamente exploradas na medicina, veterinária, agricultura e biotecnologia (Amaning Danquah *et al.*, 2022; O'Neill, 2014).

Microrganismos são reconhecidos como produtores de compostos bioativos com atividade antibacteriana e fungicida por conta da riqueza funcional dos metabólitos secundários que produzem para sobreviver às diversas condições ambientais e ter sucesso na competição por nutrientes contra outros microrganismos (Swift *et al.*, 2021). Dessa forma, são considerados reservatórios de biomoléculas promissoras inexploradas que possuem atividade antimicrobiana e estrutura variável em comparação aos compostos tipicamente utilizados na medicina, fato que torna a bioprospecção e identificação de novas moléculas bioativas altamente desejável (Amaning Danquah *et al.*, 2022).

Em especial, microrganismos associados às plantas são um alvo significativo para a bioprospecção de antimicrobianos, pois desempenham um papel importante na proteção de seu hospedeiro contra fitopatógenos (Crawford *et al.*, 1993). Atualmente, existem registros significativos na literatura de compostos antimicrobianos obtidos de bactérias isoladas de amostras vegetais, como por exemplo metabólitos bioativos incluindo alcalóides, esteroides, terpenos e fenóis. Isso demonstra que esses microrganismos são fontes valiosas para a busca de biomoléculas com essas características (Eshboev *et al.*, 2024; Sharma & Sharada, 2022).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Isolar e caracterizar bactérias endofíticas e epifíticas de bromélias das espécies *Tillandsia recurvata*, *Tillandsia tricholepsis* e *Tillandsia pohliana*.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar *in vitro* bactérias com capacidade de fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato e produção do hormônio vegetal Ácido Indol-acético.
- Quantificar a solubilização de fosfato e a produção do hormônio vegetal Ácido Indol-acético pelas culturas isoladas.
- Testar a atividade antimicrobiana das suspensões bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.
- Comparar estatisticamente as diferentes condições de isolamento para a obtenção de bactérias de interesse biotecnológico.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Coleta

Foram realizadas saídas de campo para os jardins localizados na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), em São Carlos, no estado de São Paulo, para a coleta de bromélias das espécies *Tillandsia recurvata*, *Tillandsia tricholepsis* e *Tillandsia pohliana*, identificadas visualmente com o auxílio de técnicos do Departamento de Botânica (DB) da UFSCar. Foram coletados no total 7 exemplares, dos quais 3 correspondem às árvores localizadas nos arredores do estacionamento do Departamento de Morfologia e Patologia (Figura 3 A-C) e 4 às cercas localizadas próximas à Portaria Sul (Figura 3 D-E). A coleta foi realizada diretamente em sacos plásticos transparentes esterilizados, evitando contato com as mãos, e as plantas foram transportadas em caixas isotérmicas até o laboratório para o início das análises, sem ocorrer mistura de modo a garantir a identificação das amostras.



Figura 3 - Bromélias coletadas para o isolamento de bactérias. Da esquerda para a direita: *Tillandsia pohliana* (A, D), *Tillandsia recurvata* (B, E) e *Tillandsia tricholepsis* (C, F). **Fonte:** autoria própria (2025).

### 4.2 Desinfecção das amostras

Com as amostras no laboratório, foi realizada a adaptação da técnica de desinfecção superficial demonstrada por Qin *et al.* (2009). As plantas foram lavadas com água autoclavada

dentro dos sacos plásticos utilizados na coleta para a retirada de resíduos de poeira e terra, e então foram separados pedaços de caule e folhas de cada unidade de amostra, utilizando pinças e bisturi esterilizados. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em tubos de 50 mL com solução tampão fosfato (PBS - Phosphate-Buffered Saline) e agitadas durante 1 minuto para a total remoção de resíduos e alguns microrganismos epifíticos não adaptados à superfície foliar.

Uma parte das folhas foi separada para o isolamento de bactérias epifíticas, sendo inoculada em solução tampão PBS e não seguindo com as técnicas de desinfecção subsequentes para conservar os microrganismos de interesse. Já o restante do material coletado foi submerso em álcool 70% durante 3 minutos e, em seguida, em solução de hipoclorito de sódio 5% (m/v) por 7 minutos. Finalizando o procedimento, as amostras foram neutralizadas em solução de tiosulfato de sódio 2,5% por 10 minutos e submersas novamente em álcool 70% por 30 segundos. Em seguida, foi realizada a lavagem das amostras com água destilada autoclavada por 3 vezes, submergindo-as então em solução de bicarbonato de sódio 10% durante 10 minutos para impedir e retardar o crescimento de fungos. Todo o procedimento foi realizado em cabine de segurança biológica, e as amostras foram deixadas para secar em placas de Petri esterilizadas.

Para verificar a eficácia do processo de desinfecção completo, foram realizados 2 testes como proposto por Qin *et al.* (2009). A superfície do tecido vegetal esterilizado foi impresso em meio de cultura Ágar Triptona de Soja (TSA) a 10% (Araújo *et al.*, 2010), e incubando a 28°C. Essas amostras também foram adicionadas a tubos com 5mL de água esterilizada, agitando durante 1 minuto para então inocular 200 µL em meio de cultura e incubar na mesma temperatura. Foi verificada a presença de crescimento microbiano durante os próximos dias, a fim de confirmar se as amostras realmente foram devidamente esterilizadas. A Figura 4 esquematiza as etapas do procedimento de desinfecção realizadas nessa etapa.

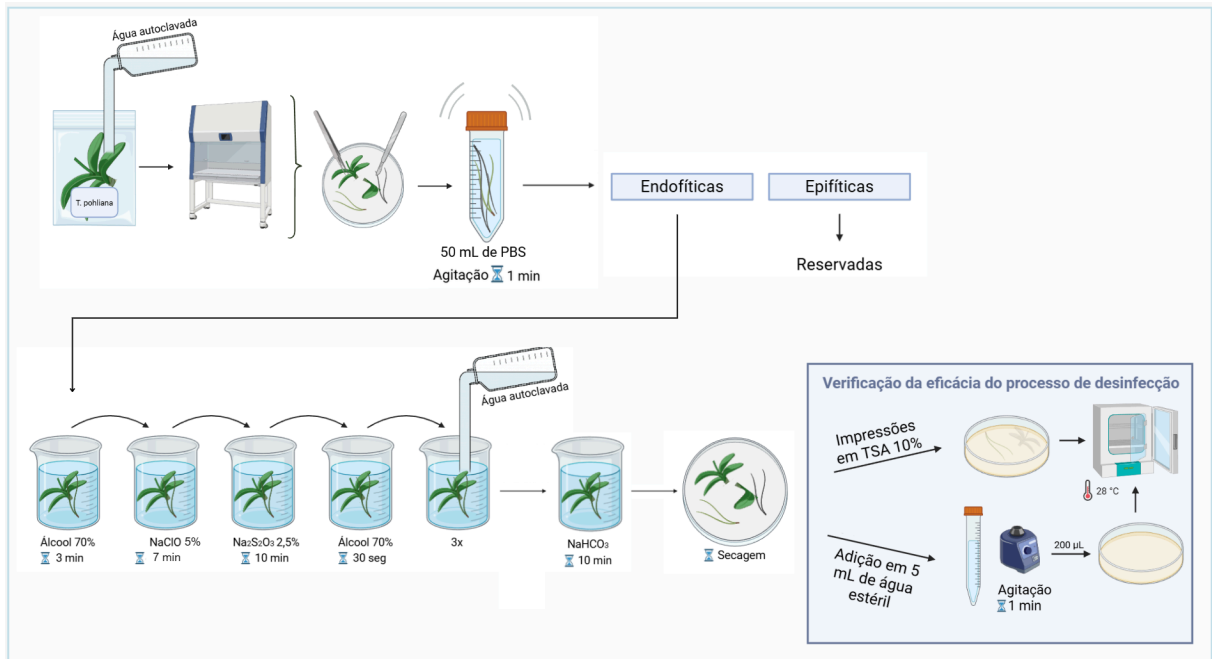


Figura 4 - Esquema das etapas de desinfecção, conforme descritas na metodologia. **Fonte:** autoria própria (2025).

### 4.3 Isolamento de bactérias endofíticas e epifíticas

As amostras vegetais de acordo com as bactérias a serem isoladas (epifíticas e endofíticas) foram transferidas para tubos cônicos de 50 mL e placas de Petri esterilizados devidamente identificados.

Para isolamento de bactérias epifíticas, os tubos com as folhas e 5 mL de PBS foram acondicionados em cuba ultrassônica a 160W por 15 minutos, para a remoção das bactérias da superfície. As suspensões foram transferidas para microtubos esterilizados e diluídas em PBS até  $10^{-3}$ , sendo então inoculados 0,1 mL de cada diluição e da suspensão inicial na superfície dos meios Ágar caseína-glicerol e TSA 10%. As folhas também foram comprimidas por 15 segundos na superfície dos mesmos meios de cultura.

Os tubos contendo folhas destinadas ao isolamento de endofíticas, após o procedimento de desinfecção, tiveram seu conteúdo macerado com bastão de vidro esterilizado, sendo a eles adicionados 3 mL de PBS para cada 1g de amostra. Os tubos cônicos dos grupos foram homogeneizados durante 2 minutos em agitador de tubos. Em seguida, as suspensões foram transferidas para microtubos esterilizados e diluídas em PBS até  $10^{-3}$ . Foram semeados 0,1 mL tanto das suspensões quanto das diluições em meios de cultura Ágar caseína-glicerol e TSA 10%. Além das suspensões, fragmentos de folhas foram colocados diretamente na superfície de meios de cultura.

As placas foram incubadas a 30°C por 30 dias, verificando semanalmente se houve crescimento bacteriano. Observando entre as checagens frequentes crescimento microbiano, as colônias morfologicamente distintas eram estriadas em novas placas contendo meio de cultura TSA a 10% (Araújo *et al.*, 2010) e Ágar caseína-glicerol (Kleiner *et al.*, 2010) para a obtenção de culturas puras, cultivando-as em condições adequadas. A representação visual das etapas de isolamento se encontra na Figura 5.

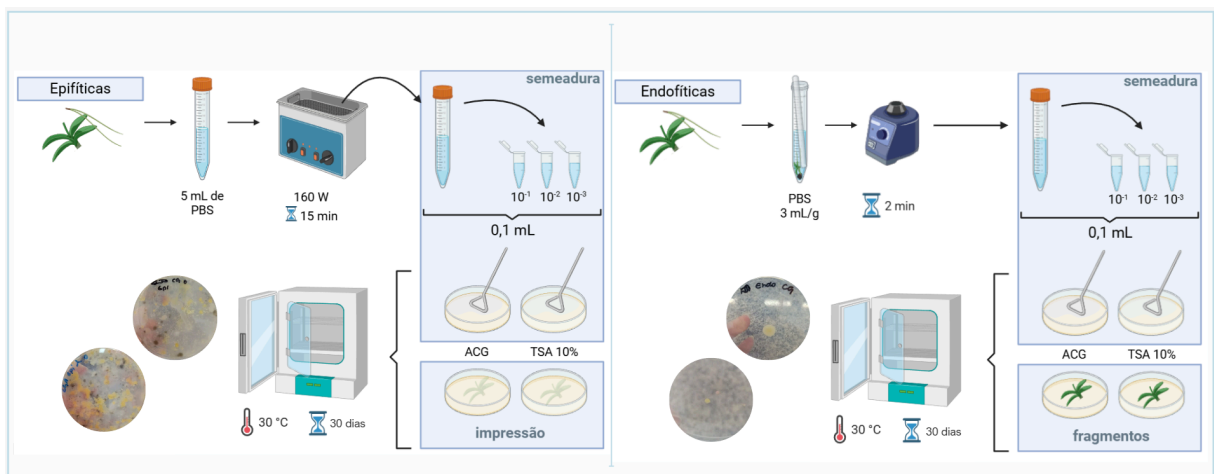


Figura 5 - Esquema das etapas de isolamento, separadas por amostras destinadas à obtenção de bactérias epifíticas e endofíticas. **Fonte:** autoria própria (2025).

A caracterização dos isolados foi realizada por aspectos macroscópicos, levando em consideração tamanho, pigmentação, aspecto, forma, elevação e margem. A fim de conservar os isolados para os experimentos subsequentes, as colônias foram repicadas em TSB a 10% e após a verificação de crescimento microbiano, foram transferidos 500 µL do cultivo para criotubos contendo 500 µL de glicerol. Em seguida, foram estocados em freezer a -20°C.

#### 4.4 Ensaios de fixação biológica de nitrogênio

Para a seleção de bactérias fixadoras de nitrogênio, os isolados foram inoculados em tubos de ensaio contendo 4 mL de meio de NFb líquido com composição em g.L<sup>-1</sup>: ácido málico, 5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,2; NaCl, 0,1; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,02; KOH, 4,5; e em mL: solução de micronutrientes, 2; solução de azul de bromotimol (0,5% em 0,2 N de KOH), 2; solução de FeEDTA (1,64%), 4; e solução de vitaminas, 1; pH 6,5 (Döbereiner *et al.*, 1995). Foi realizada a incubação a 28 °C durante 72 horas. Os experimentos foram realizados em triplicata, sendo os resultados positivos indicados pela mudança de cor do meio devido ao

aumento do pH e pela presença de halo de crescimento no meio de cultura próximo à superfície dos tubos (Figura 6).

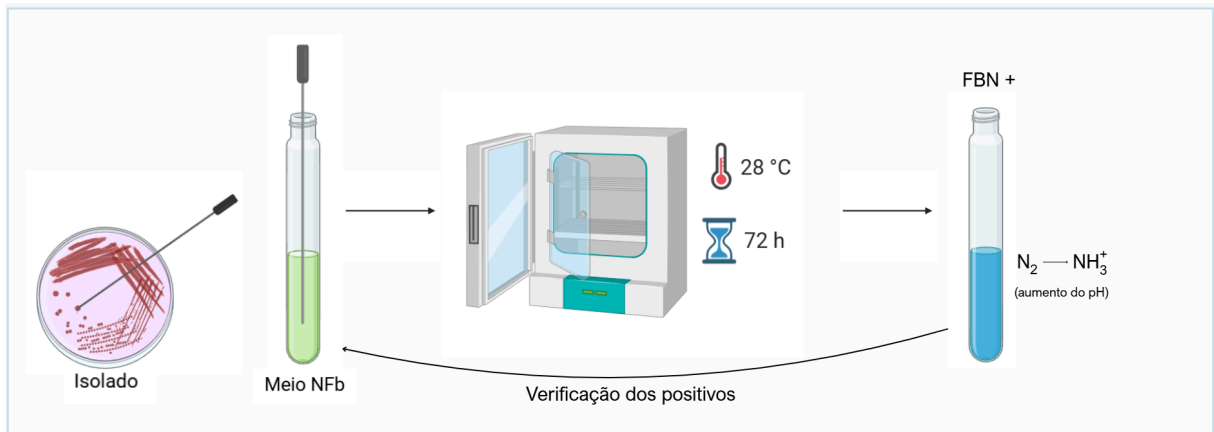


Figura 6 - Esquema do teste de fixação biológica de nitrogênio. **Fonte:** autoria própria (2025).

#### 4.5 Ensaio de solubilização de fosfato inorgânico

Os testes de solubilização de fosfato foram realizados a partir da inoculação de 10  $\mu$ L de suspensão dos isolados em meio de cultura sólido contendo fosfato de cálcio tribásico, conforme descrito por Verma *et al.* (2001). As placas foram incubadas a 28 °C durante 7 dias e então foi verificada a presença de halos de solubilização de fosfato ao redor das colônias (Figura 7).

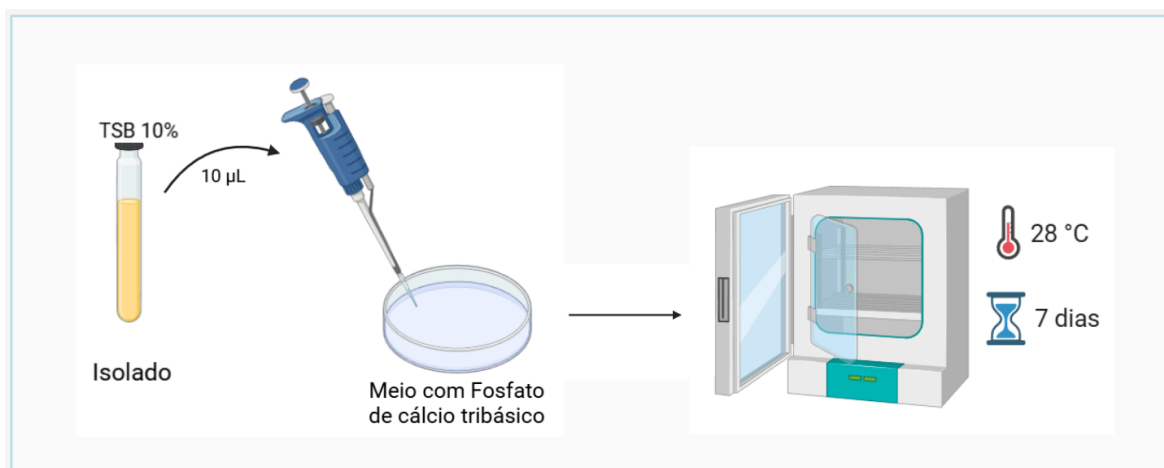


Figura 7 - Esquema do teste de solubilização de fosfato. **Fonte:** autoria própria (2025).

As linhagens que apresentaram resultados positivos tiveram seus índices de solubilização calculados, definidos pela divisão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia (Equação 1). Os experimentos também foram realizados em triplicata.

$$\text{Índice de Solubilização} = \frac{\text{Diâmetro do halo}}{\text{Diâmetro da colônia}} \quad (\text{Equação 1})$$

#### 4.6 Testes de produção de Ácido Indol-acético (AIA)

A fim de determinar a capacidade de produção do hormônio vegetal AIA pelos isolados, foram realizados ensaios colorimétricos utilizando o reagente Salkowski, conforme proposto por Bric *et al.* (1991) e adaptado por Husen (2003).

As bactérias foram repicadas em triplicata em meio contendo Caldo Triptona de Soja TSB 10%, suplementado com 5 mM de L-triptofano, e incubadas no escuro a 28 °C em agitação durante 7 dias. Após esse período, foi realizada a centrifugação de 1 mL de cada cultivo por 5 minutos a 10.000 g, e 100 µL dos sobrenadantes foram transferidos para microplacas de 96 poços adicionando 100 µL do reagente Salkowski (2 mL de FeCl<sub>3</sub> 0,5 mol/L em 98 mL de HClO<sub>4</sub> 35%). O grupo de controle negativo foi composto pelo mesmo meio de cultura estéril acrescido do reagente. Após 30 minutos do início da reação, com as placas no escuro em temperatura ambiente, a densidade óptica foi medida em comprimento de onda a 520 nm no espectrofotômetro de microplacas Multiskan SkyHigh com auxílio do software SkanIt RE 7.1. A Figura 8 ilustra as etapas do teste.

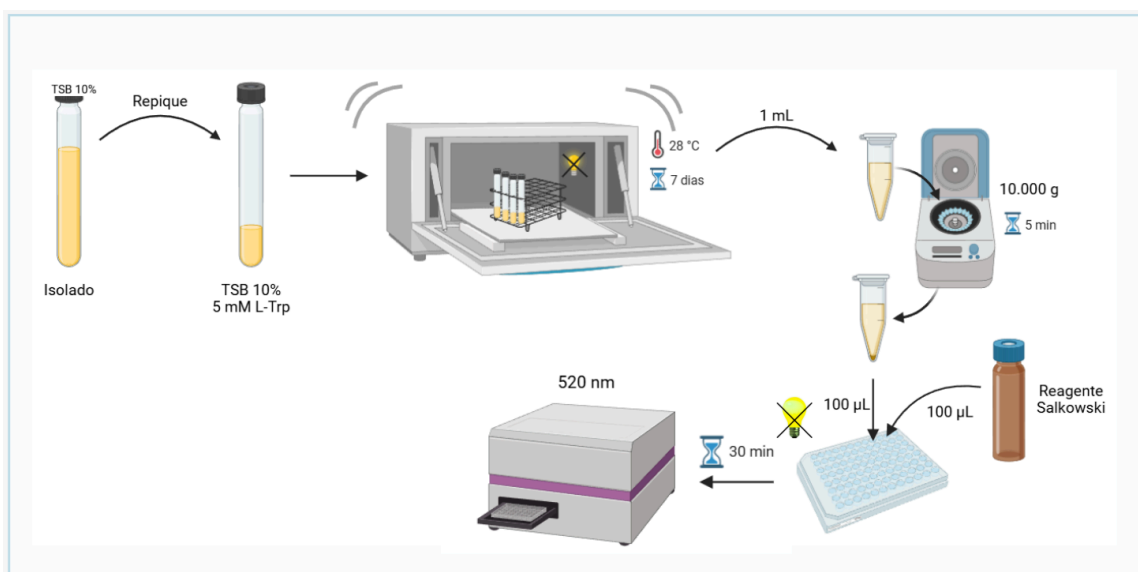
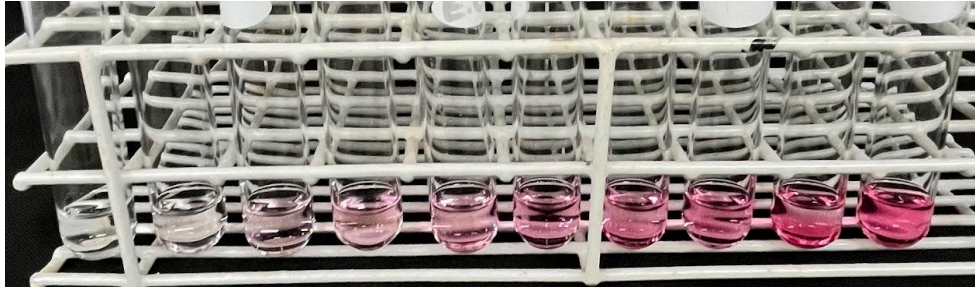
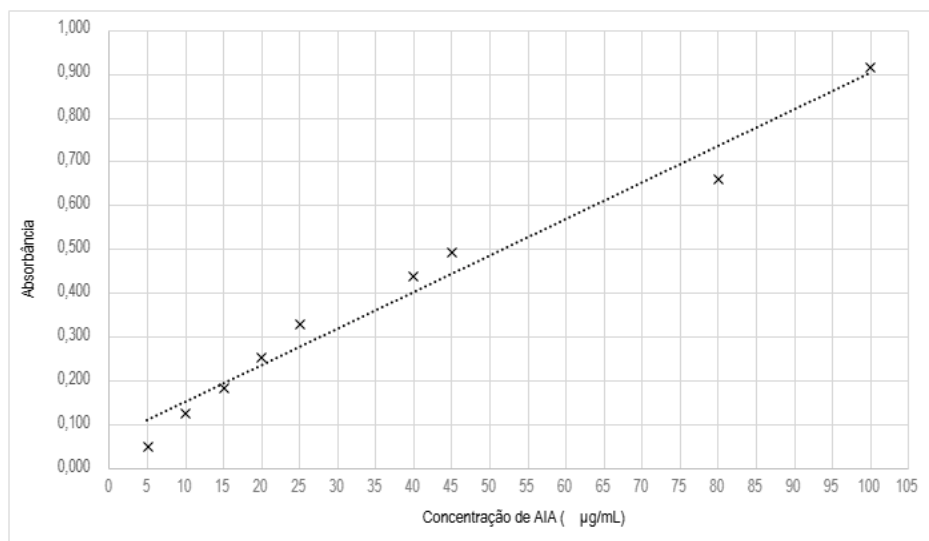


Figura 8 - Esquema das etapas do teste de produção de AIA pelos isolados. **Fonte:** autoria própria (2025).

As leituras foram normalizadas por meio da construção de uma curva padrão obtida a partir da leitura de diferentes concentrações de Ácido Indol-Acético no mesmo comprimento de onda (Figuras 9 e 10).



**Figura 9** - Reação do reagente Salkowski com concentrações de AIA de 0 a 100 µg/mL. **Fonte:** autoria própria (2025).



**Figura 10** - Curva padrão relacionando a absorbância a 520 nm com as concentrações de AIA. **Fonte:** autoria própria (2025).

#### 4.7 Ensaios de atividade antimicrobiana contra microrganismos de interesse médico

Para o teste da atividade antimicrobiana dos isolados, foi utilizado o método de difusão em Ágar segundo a metodologia de Li *et al.* (2012). Os isolados foram repicados em meio TSB e incubados por 7 dias a 28 °C. Após esse período, o caldo foi transferido para tubos falcon 15 mL e centrifugado a 3.000 g por 15 minutos, utilizando o sobrenadante para os experimentos.

Os microrganismos utilizados nos testes foram cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Esses patógenos foram escolhidos por conta de sua relevância clínica, sendo causadores de infecções oportunistas e apresentando cepas resistentes a antibióticos (Doust *et al.*, 2012). Foram realizados repiques a partir de culturas devidamente estocadas no Laboratório de Microbiologia e Parasitologia do Departamento de Morfologia e Patologia da UFSCar, provenientes da Microbiologics®, Lab-Elite™ CRM (Certified Reference Material). O cultivo foi realizado em TSB e padronizado até a turvação 0,5 da escala McFarland por leitura da absorbância em espectrofotômetro (comprimento de onda 600 nm). Com o auxílio de um swab esterilizado, os inóculos padronizados foram espalhados na superfície de meio Müller-Hinton.

Antes do espalhamento, um perfurador de metal esterilizado foi utilizado para criar orifícios de 8 mm de diâmetro no Ágar, onde posteriormente foram adicionados 50 µL dos sobrenadantes dos isolados. Após a incubação a 36 °C durante 24 horas, foi verificada a formação de halo de inibição. Simultaneamente, foram preparadas placas com controle negativo, contendo apenas meio estéril nos orifícios, e controle positivo, contendo clorexidina a 0,2% (Souza, 2011).

A Figura 11 representa visualmente a realização dos ensaios descritos.

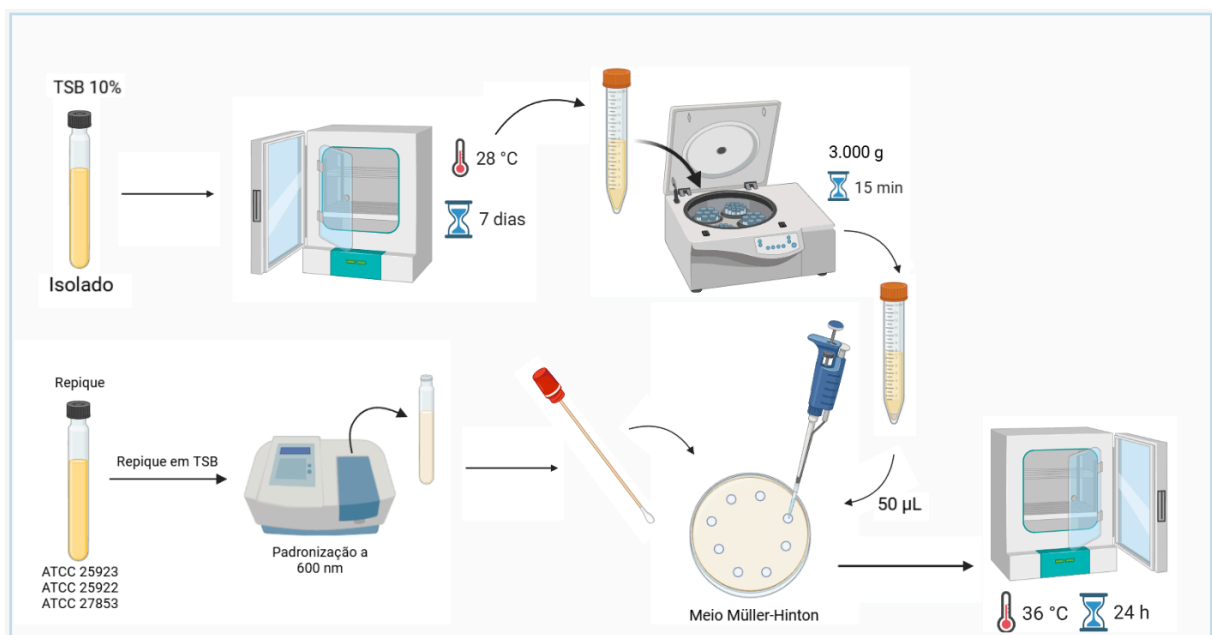


Figura 11 - Esquema das etapas dos ensaios de atividade antimicrobiana. **Fonte:** autoria própria (2025).

#### **4.8 Análise estatística dos resultados**

Os resultados obtidos foram organizados por meio de tabelas e gráficos. Para comparação entre meios de isolamento, locais de coleta e espécies de planta nos dados obtidos pelos isolados nos diferentes ensaios, foi realizado o teste de variância ANOVA OneWay juntamente ao Teste de Tukey, sendo determinado como padrão de análise uma significância de 5% ( $p < 0,05$ ). Para normalização dos resultados, os valores foram convertidos para  $\log_{10}$  (Milone, 2009).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Isolamento e caracterização dos isolados

Conforme pode ser visualizado na Tabela 1, foram isoladas no total 54 bactérias, sendo 25 obtidas das coletas de árvores localizadas no estacionamento do Departamento de Morfologia e Patologia e as 29 restantes isoladas de plantas coletadas de cercas.

Dentre as bactérias obtidas de coletas realizadas em árvores, 13 foram isoladas da espécie *Tillandsia pohliana*, 5 de *Tillandsia recurvata* e 7 de *Tillandsia tricholepsis*. Quanto às coletas realizadas em cercas, 12 foram de *Tillandsia pohliana*, 8 de *Tillandsia recurvata* e 9 de *Tillandsia tricholepsis*. A partir desses dados, observa-se que a espécie *Tillandsia pohliana* apresentou maior diversidade microbiana em comparação aos outros exemplares coletados.

A relação do número de bactérias isoladas por quantidade de amostras coletadas em árvores foi de 8,33%, enquanto para amostras coletadas em cercas, 7,25%. Foi possível isolar mais bactérias epifíticas do que endofíticas com as metodologias utilizadas, e o meio TSA 10%, por ser um meio não seletivo rico em nutrientes, resultou na maior diversidade de bactérias obtidas (Araújo *et al.*, 2010).

Tabela 1 - Visão geral no número de bactérias isoladas por local de coleta, espécie de *Tillandsia*, meio de cultura e método de isolamento epifítico ou endofítico.

Amostras	Meios de Cultivo				Nº de bactérias isoladas
	TSA 10%		Ágar Caseína-Glicerol		
	Epifíticas	Endofíticas	Epifíticas	Endofíticas	
<b>Árvores</b>					
<i>T. pohliana</i>	5	5	2	1	13
<i>T. recurvata</i>	1	2	2	0	5
<i>T. tricholepsis</i>	1	0	2	4	7
Total Árvores	7	7	6	5	<b>25</b>
<b>Cercas</b>					
<i>T. pohliana</i>	6	3	1	2	12
<i>T. recurvata</i>	1	1	5	1	8
<i>T. tricholepsis</i>	3	3	1	2	9
Total Cercas	10	7	7	5	<b>29</b>
<b>Total das Coletas</b>	<b>17</b>	<b>14</b>	<b>13</b>	<b>10</b>	<b>54</b>

Fonte: autoria própria (2025).

Morfologicamente, os isolados obtidos apresentaram grande diversidade de texturas, elevação, margens e produção de pigmentos. Visualmente, foi possível observar a grande diversidade microbiana presente nas bromélias das espécies coletadas considerando as bactérias cultiváveis. Isso pode ser observado nas Figuras 12, 13 e 14, as quais contêm as bactérias devidamente isoladas de cada espécie e local de coleta das bromélias. As caracterizações morfológicas, assim como local de coleta e meio de cultura para isolamento podem ser visualizadas no Apêndice A.

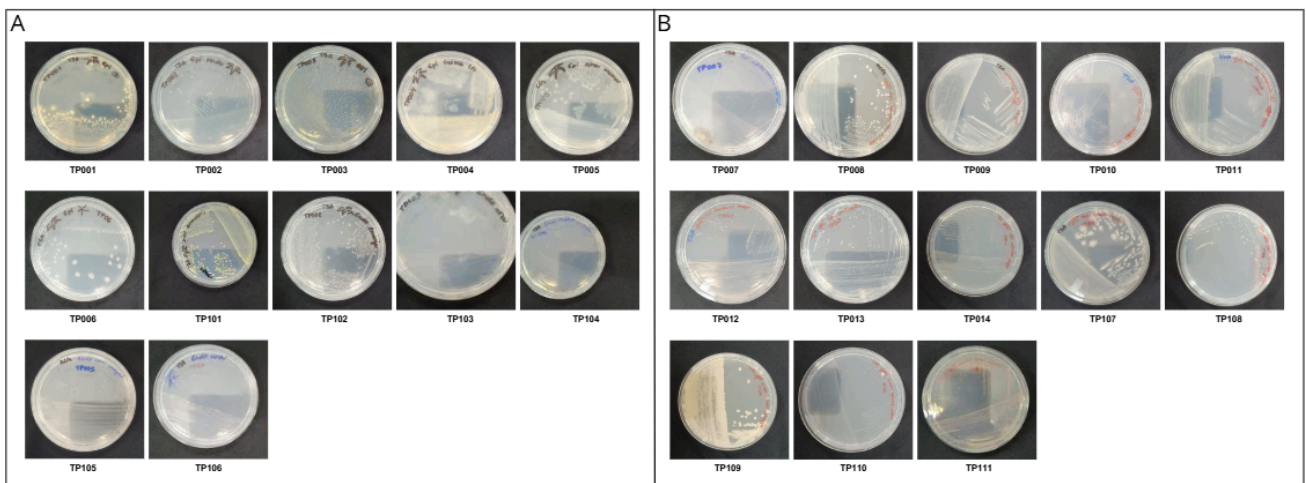


Figura 12 - Bactérias isoladas de *Tillandsia pohliana*. A) Coletadas de árvores. B) Coletadas de cercas. **Fonte:** autoria própria (2025).

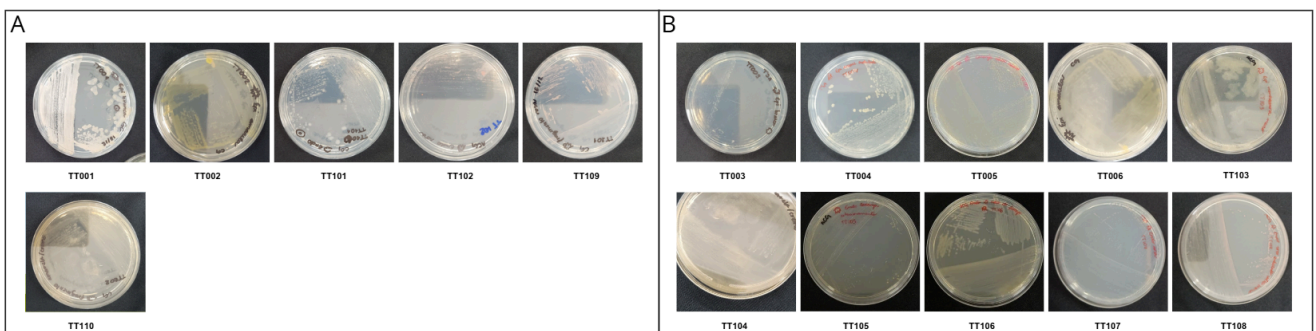


Figura 13 - Bactérias isoladas de *Tillandsia tricholepis*. A) Coletadas de árvores. B) Coletadas de cercas. **Fonte:** autoria própria (2025).

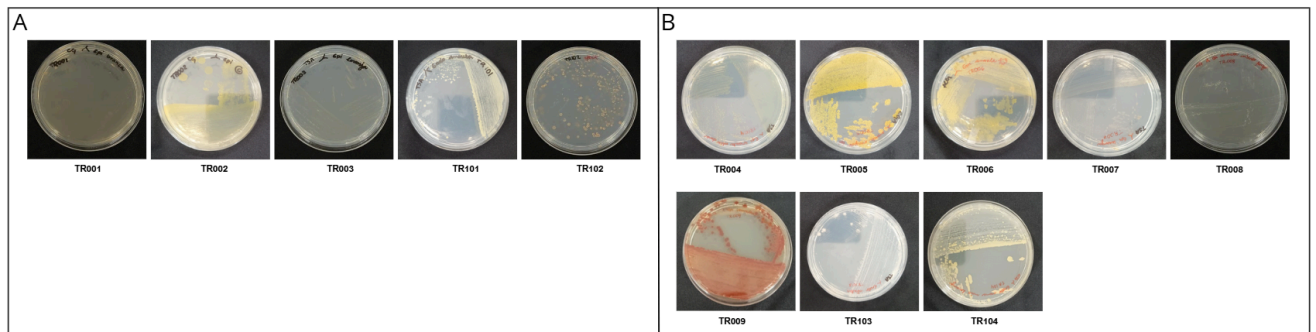


Figura 14 - Bactérias isoladas de *Tillandsia recurvata*. A) Coletadas de árvores. B) Coletadas de cercas. **Fonte:** autoria própria (2025).

Em isolamentos de bactérias de espécies de *Tillandsia* realizados por Giongo e colaboradores (2013), foram obtidos perfis de alta diversidade morfológica, fisiológica e genética, indicando a importância econômica e ecológica do conhecimento sobre essa variedade de microrganismos, que podem ser úteis para o manejo e conservação das próprias bromélias, além de apresentarem características de interesse agrônomo e farmacológico. Os resultados deste trabalho demonstram a grande diversidade de características morfológicas das colônias observadas, que remetem às características típicas de diversos grupos de interesse para a bioprospecção como o gênero *Bacillus* e Actinomicetos.

## 5.2 Fixação biológica de nitrogênio (FBN)

O teste de fixação biológica de nitrogênio foi positivo para 25 dos isolados, correspondendo a 46% do perfil total de bactérias (Tabela 2). Esse resultado foi evidenciado pela mudança da cor do meio NFb para um tom azulado por conta da produção de amônia, um composto alcalino, sendo o pH indicado pelo Azul de Bromotimol presente na formulação (Figura 15). A película próxima à superfície do meio também foi considerada para a confirmação da atividade de fixação de nitrogênio, demonstrando crescimento bacteriano mais próximo do ar devido à ausência desse elemento no meio de cultura (Döbereiner *et al.*, 1995). Dos resultados positivos, 11 foram isolados de *Tillandsia pohliana*, 8 de *Tillandsia recurvata* e 6 de *Tillandsia tricholepsis*.

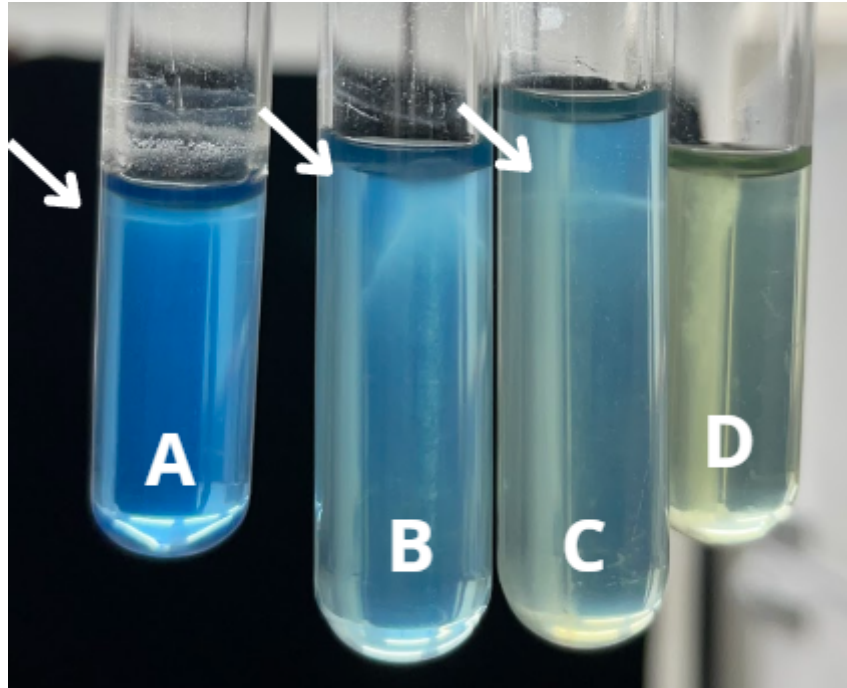


Figura 15 - Em A, B, C: Culturas de bactérias em meio NFb positivas com película de crescimento indicado pelas setas e mudança de coloração. Em D, resultado negativo para fixação de nitrogênio. **Fonte:** autoria própria (2025).

Tabela 2 - Resultados da atividade de fixação de nitrogênio pelos isolados, com (+) indicando resultado positivo e (-), resultado negativo.

Código do isolado	Fixação de Nitrogênio	Código do isolado	Fixação de Nitrogênio
TP001	+	TR003	-
TP002	-	TR004	+
TP003	+	TR005	+
TP004	-	TR006	+
TP005	+	TR007	+
TP006	-	TR008	-
TP007	+	TR009	+
TP008	+	TR101	-
TP009	-	TR102	-
TP010	-	TR103	-
TP011	-	TR104	+
TP012	-	TT001	-
TP013	+	TT002	+
TP014	+	TT003	-
TP101	-	TT004	-
TP102	-	TT005	-
TP103	-	TT006	-
TP104	-	TT101	-
TP105	+	TT102	-
TP106	+	TT103	-
TP107	-	TT104	+
TP108	-	TT105	-
TP109	+	TT106	-
TP110	-	TT107	+
TP111	+	TT108	+
TR001	+	TT109	+
TR002	+	TT110	+

**Fonte:** autoria própria (2025).

Entre as bactérias fixadoras de nitrogênio, 59% são Epifíticas, indicando uma maior variedade de isolados com atividade de fixação na superfície foliar das bromélias. Conforme descrito por Brighigna e colegas (1992), os tricomas presentes nas folhas de espécies do gênero *Tillandsia* têm o papel de criar um ambiente protegido e com altas trocas de nutrientes

entre a filosfera e o interior da planta, havendo uma alta proporção de carbono/nitrogênio, temperatura ótima, alta umidade e disponibilidade de recursos energéticos, condições que favorecem a fixação de nitrogênio.

A maior parte das informações sobre a tomada de nutrientes em bromélias epífitas é relativa às vias de metabolização do nitrogênio, indicando a importância de microrganismos fixadores para a conservação desse grupo vegetal e potencial aplicação econômica (Giongo *et al.*, 2013). Diferentes estudos realizados no México identificaram, tanto na filosfera quanto no interior de espécies de *Tillandsia*, bactérias fixadoras de nitrogênio dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*, respectivamente (Brighigna *et al.*, 1992; Puente & Bashan, 1994).

Esses resultados revelam a importância das bactérias fixadoras de nitrogênio para as bromélias estudadas, principalmente em ambientes com baixa disponibilidade de nutrientes visto que essas plantas não apresentam atividade de absorção radicular. Desse modo, os microrganismos da superfície foliar e interior vegetal são fontes interessantes de estudo e investigação quanto à FBN.

### 5.3 Solubilização de fosfato inorgânico

Os isolados com capacidade de solubilizar fosfato produziram um halo de solubilização no meio contendo fosfato de cálcio tribásico, como pode ser observado na Figura 16.

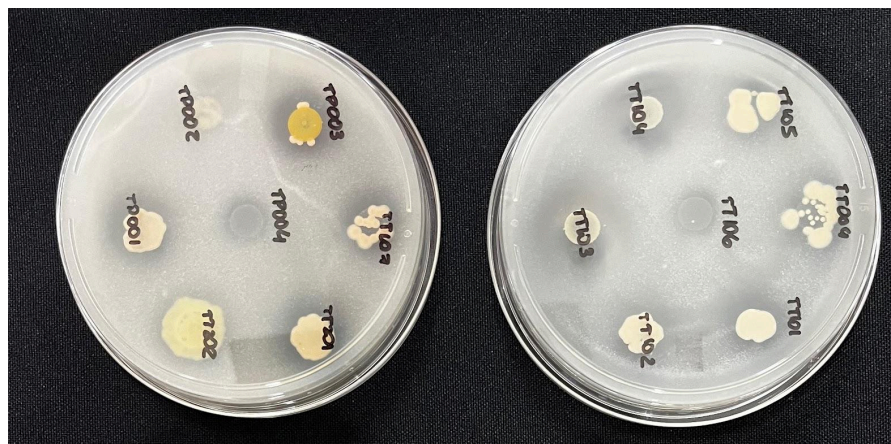


Figura 16 - Placas de Petri contendo meio com fosfato de cálcio tribásico, sendo os halos translúcidos em volta das colônias indicadores de solubilização. **Fonte:** autoria própria (2025).

Dentre as 54 bactérias testadas, 32 tiveram resultado positivo para a solubilização de fosfato. A eficiência da solubilização foi baseada no limiar de seleção adaptado de Silva &

Filho (2000), sendo índices de solubilização iguais ou maiores que 2 considerados altos, enquanto menores que 2 considerados baixos. Logo, 7 isolados apresentaram índice de solubilização baixo, enquanto os 25 restantes apresentaram índices de solubilização baixos. Conforme observado na Figura 17, os isolados com índices de solubilização de fosfato altos foram, respectivamente: TR104, TT002, TT104, TP003, TP013, TR102 e TP103.

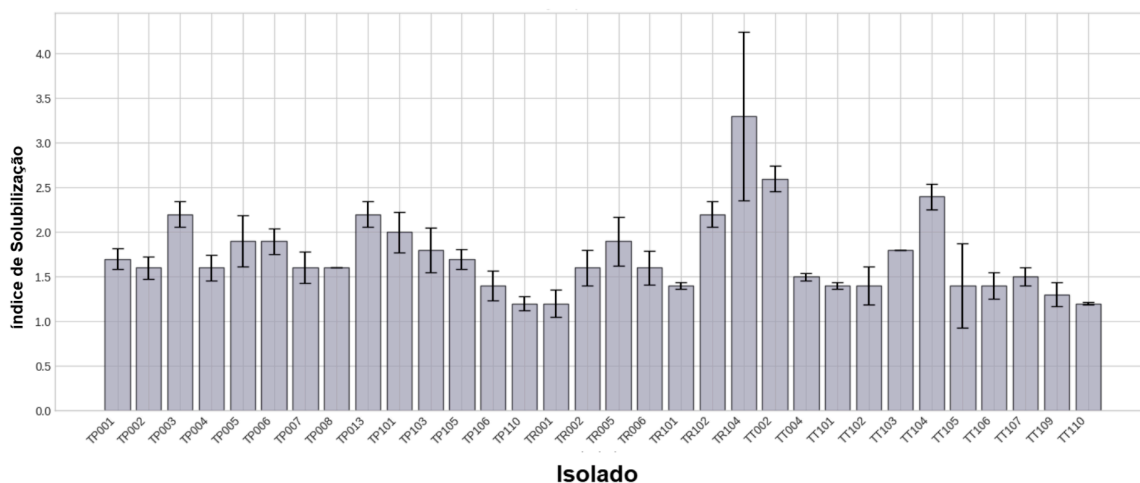


Figura 17 - Gráfico de barras contendo os valores médios dos índices de solubilização de fosfato e desvio padrão obtidos pelos isolados com resultados positivos nos testes em meio contendo fosfato de cálcio tribásico. **Fonte:** autoria própria (2025).

O fósforo é o segundo nutriente mais limitante ao crescimento vegetal, associado à processos fisiológicos essenciais como fotossíntese, respiração e formação da membrana celular. Apesar da alta disponibilidade desse elemento no solo, as plantas não podem absorvê-lo sem que este esteja em sua forma solúvel. Logo, bactérias capazes de solubilizar fosfato como os gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus*, tornam o fósforo disponível às plantas, tornando-se alvos de estudos para a formulação de bioinsumos alternativos ao uso de fertilizantes sintéticos (Baby *et al.*, 2016; Rezende *et al.*, 2021).

Existem poucos estudos relacionando microrganismos solubilizadores de fosfato com gênero de *Tillandsia*, sendo esse um interesse recente. Considerando essas pesquisas, Marín e colaboradores (2020) isolaram bactérias endofíticas capazes de solubilizar fosfato inorgânico pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Shigella* e *Klebsiella*, enquanto Giongo e colegas (2013) obtiveram mais de 94% de microrganismos positivos para essa característica no perfil total de isolados de *Tillandsia aeranthis*. Essas observações somam-se aos resultados obtidos pelos testes realizados no presente projeto, afirmando a importância dessas bactérias para o

desenvolvimento, crescimento e permanência das bromélias epífitas em ambientes com disponibilidade de nutrientes baixa ou irregular.

#### 5.4 Testes de produção de AIA

Todos os isolados foram testados para a produção de AIA em meio contendo baixas quantidades de triptofano, precursor dessa auxina. Os positivos foram indicados pela mudança de coloração do meio para rosa após a adição do reagente de Salkowski. Uma coloração mais escura indica maior concentração de AIA, havendo um nível maior de oxidação na reação (Figura 18).

A avaliação quantitativa desse teste por meio de leitura de absorbância e correlação com a curva padrão permitiu a determinação das concentrações de AIA produzidas pelas bactérias, que variou de 4,22  $\mu\text{g/mL}$  a 305,5  $\mu\text{g/mL}$  (Apêndice B).

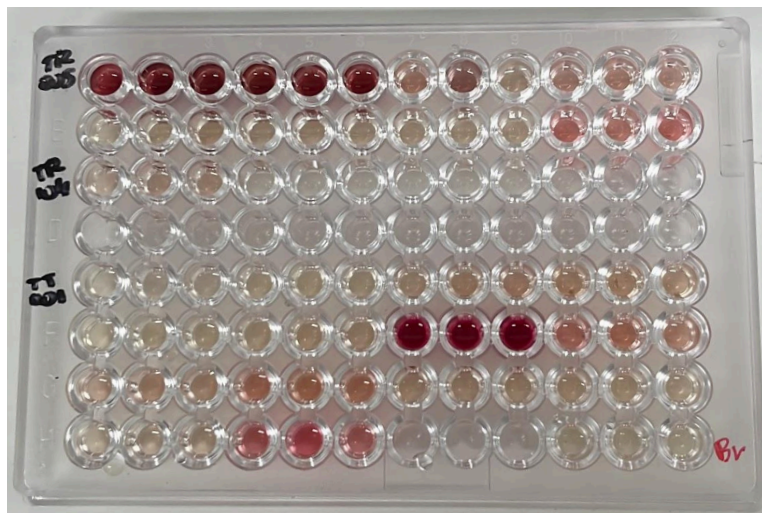


Figura 18 - Amostras do teste de produção de Ácido Indol-Acético, com intensidade de coloração indicando maior concentração. **Fonte:** autoria própria (2025).

A produção de AIA pelos isolados foi caracterizada conforme a adaptação dos critérios propostos por Hartmann *et al.* (1983), sendo classificada como: baixa (abaixo de 10  $\mu\text{g/mL}$ ), média (entre 10 e 40  $\mu\text{g/mL}$ ) e alta (acima de 40  $\mu\text{g/mL}$ ). Dentre os 54 isolados, 24 apresentaram uma produção baixa de AIA, 19 obtiveram produção média e, 11 isolados, produção alta. Os que se destacaram pela alta obtenção da auxina são apresentados pela Figura 19, verificando-se uma alta variação de concentrações entre 43,9 e 305,5  $\mu\text{g/mL}$ .

Dentre os maiores produtores de AIA estão os isolados TT102, TR005, TR006 e TR002, respectivamente, com concentrações acima de 150  $\mu\text{g/mL}$ . Apesar desses valores serem satisfatórios, sabe-se que concentrações muito elevadas de AIA podem inibir o crescimento vegetal, tendo um efeito contrário ao desejável se tratando do uso de um microrganismo como promotor de crescimento (Davies, 1995). Visto que os testes realizados *in vitro* indicam um potencial metabólico de produção de AIA, para a avaliação do efeito dessas concentrações em plantas seriam necessários testes *in vivo*. Quanto às espécies de *Tillandsia*, é necessária uma maior investigação sobre a contribuição do ácido indol-acético produzido pelos isolados nas bromélias encontradas na natureza, porém, sabe-se que essa auxina tem efeito sobre as raízes e na absorção de nutrientes, podendo estar relacionada à capacidade de epifitismo do gênero (Giongo *et al.*, 2013; Vargas *et al.*, 2010).

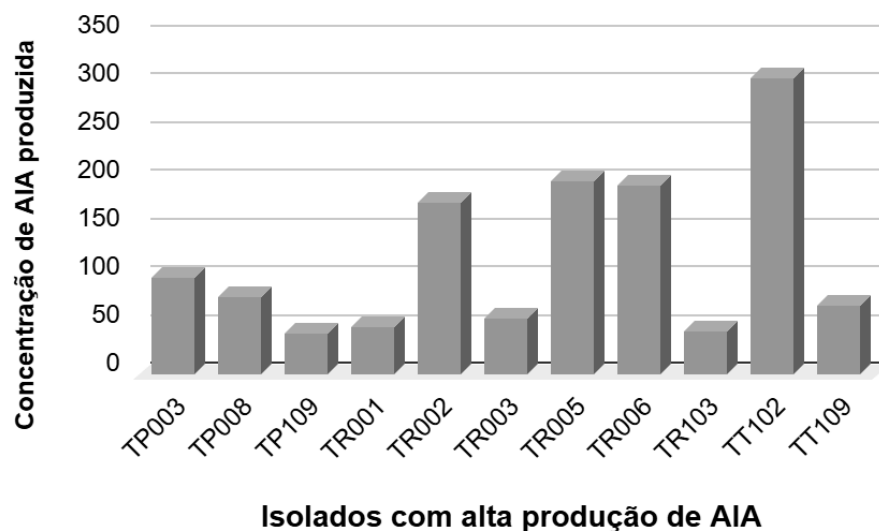


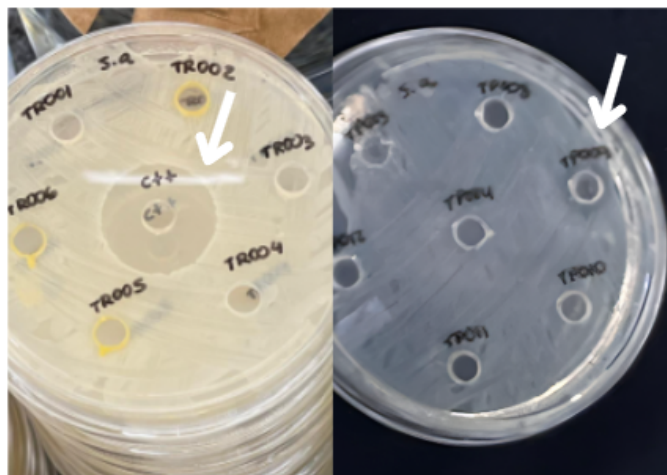
Figura 19 - Gráfico de barras contendo as concentrações de AIA ( $\mu\text{g/mL}$ ) obtidas pelos isolados que apresentaram alta produção desse composto. **Fonte:** autoria própria (2025).

A busca por microrganismos produtores de fito-hormônios como Ácido Indol-acético é um grande interesse para a agricultura, visto que estes podem contribuir para a melhoria da habilidade da planta hospedeira em sobreviver a ambientes extremos (Asghar *et al.*, 2002). Em espécies de *Tillandsia*, Giongo e colegas (2013) obtiveram produção de AIA em todos os seus 23 isolados de *T. aeranthos*, dos quais a maior parte pertencia a espécies de *Bacillus* gram-positivos produtores de esporos. Isso indica que, de fato, esse gênero tem alto potencial de exploração de microrganismos promotores de crescimento, sendo necessários mais testes

quanto à produção de AIA em diferentes condições para potencial aplicação como bioinsumos.

### 5.5 Ensaio de atividade antimicrobiana contra microrganismos de interesse médico

Dentre todos os isolados testados, apenas o sobrenadante de um deles apresentou efeito de atividade antimicrobiana contra as cepas testadas. O isolado TP009, uma bactéria epifítica isolada de *T. pohliana* coletada em cerca, foi capaz de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus*. No teste positivo, o isolado TP009 produziu um halo de inibição com 11,3 mm de diâmetro, enquanto o controle positivo contendo clorexidina a 0,2% resultou em 26 mm (Figura 20). Contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, nenhum dos isolados apresentou efeito inibitório.



**Figura 20** - Placas de Petri contendo resultados dos testes antimicrobianos por difusão em poço, com setas indicando halos de inibição do crescimento de *S. aureus* por clorexidina a 0,2% e pelo isolado TP009. **Fonte:** autoria própria (2025).

Na literatura, bactérias epifíticas são descritas como potenciais produtoras de agentes antimicrobianos por conta da competição por recursos na superfície foliar, consequentemente prevenindo o crescimento de patógenos e parasitas. Actinobactérias do gênero *Streptomyces*, por exemplo, produzem substâncias antimicrobianas que evitam a colonização da superfície de folhas e algas por outros microrganismos (Aachath & Rupawalla, 2025; Kembel *et al.*, 2014; Younas, 2024). Considerando essas informações, é possível considerar que o isolado TP009 produz substâncias antimicrobianas que servem a esse propósito e podem, assim, ser estudadas e aplicadas contra cepas de patógenos de interesse médico, ideia sustentada pelo halo de inibição produzido contra *Staphylococcus aureus*.

As bromélias do gênero *Tillandsia* já tiveram seus extratos caracterizados em testes de atividade antimicrobiana, com base no uso medicinal das folhas e raízes associado ao conhecimento tradicional e à cultura local. Conforme caracterizado por Vite-Posadas e colaboradores (2011), extratos de folhas de *Tillandsia imperialis* apresentaram atividade biológica específica contra *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*, microrganismos associados à infecções das vias aéreas, sugerindo a presença de compostos antimicrobianos nas bromélias. Extratos de *T. recurvata*, *T. fasciculata* e *T. bergeri* também foram registrados na literatura, caracterizando-se pela presença de terpenos, flavonóides e compostos fenólicos com características antibacterianas (Estrella-Parra *et al.*, 2019; Lo *et al.*, 2022; Pérez-López *et al.*, 2020). A literatura, porém, carece de estudos que investiguem o efeito antimicrobiano de bactérias isoladas dessas plantas contra patógenos de interesse médico.

A busca por novos compostos com potencial antimicrobiano tem se intensificado recentemente com o uso banalizado de antibióticos e o surgimento de cepas resistentes aos terapêuticos presentes no mercado (Amaning Danquah *et al.*, 2022). Dessa forma, a avaliação de microrganismos endofíticos e epifíticos isolados do ambiente é um campo de interesse na área. Considerando que um dos isolados apresentou resultados promissores nos testes realizados neste estudo, é interessante estudar a microbiota foliar de diferentes espécies do gênero *Tillandsia* presentes em ambientes diversos e verificar as interações que essas bactérias apresentam contra patógenos, considerando também que podem estar relacionadas à produção de compostos de interesse obtidos em extratos vegetais observados nos artigos citados.

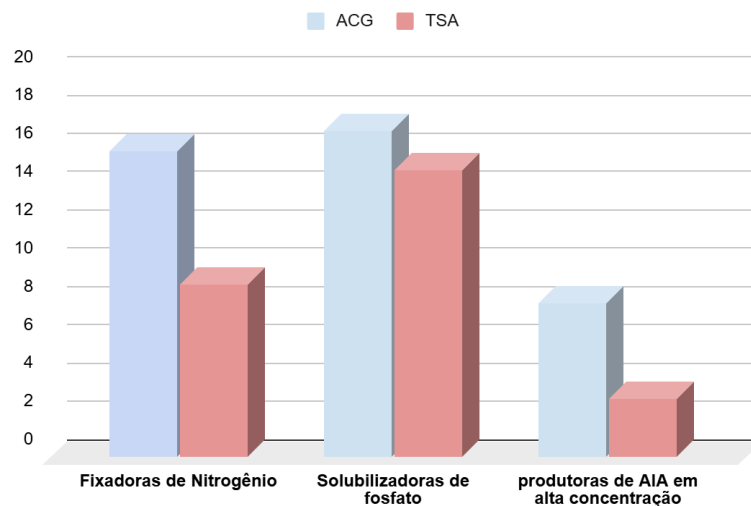
### **5.6 Comparações entre meios utilizados, locais de coleta e espécies de *Tillandsia* na obtenção de isolados com potencial no estímulo do crescimento vegetal.**

As avaliações iniciais dos resultados no isolamento foram quantitativas, indicando que o meio TSA 10% resultou na maior quantidade de bactérias diferentes obtidas, e que foram isoladas mais bactérias epifíticas do que endofíticas (Tabela 1). Porém, torna-se interessante uma avaliação qualitativa dos métodos de isolamento visando a obtenção de bactérias com maior potencial biotecnológico com base nos resultados obtidos nos testes realizados.

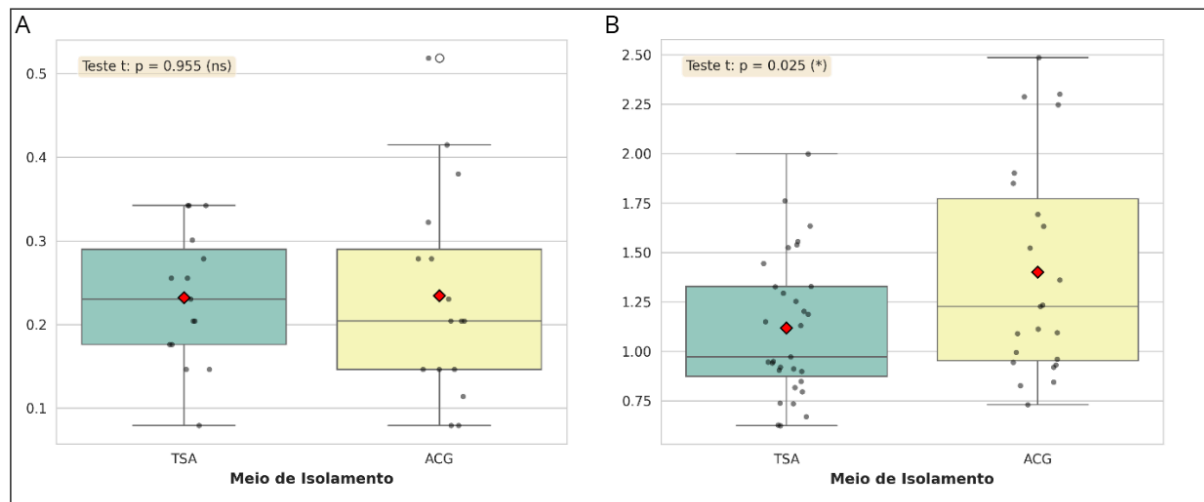
Considerando o meio de cultura, o Ágar Caseína-Glicerol obteve aproximadamente 78% mais isolados com capacidade de fixação de nitrogênio, 13% a mais com atividade de solubilização de fosfato e 166% a mais produtores de AIA em alta concentração em

comparação ao meio TSA 10% (Figura 21). A análise estatística indicou diferença significativa entre os dois meios quanto aos valores obtidos nos resultados de produção de AIA, com o Ágar Caseína-Glicerol apresentando uma média mais elevada; para as medidas dos halos de solubilização de fosfato, porém, não houve diferença significativa (Figura 22).

Esse meio adaptado é seletivo e inibe a maioria dos microrganismos de crescimento rápido, favorecendo o isolamento de bactérias fastidiosas de crescimento lento incluindo actinobactérias, que têm significativa aplicação no setor biotecnológico (Kleiner *et al.*, 2010; Lechevalier, 1975). Dessa forma, pode-se considerar que o meio é efetivo no isolamento e seleção de bactérias específicas com potencial biotecnológico.

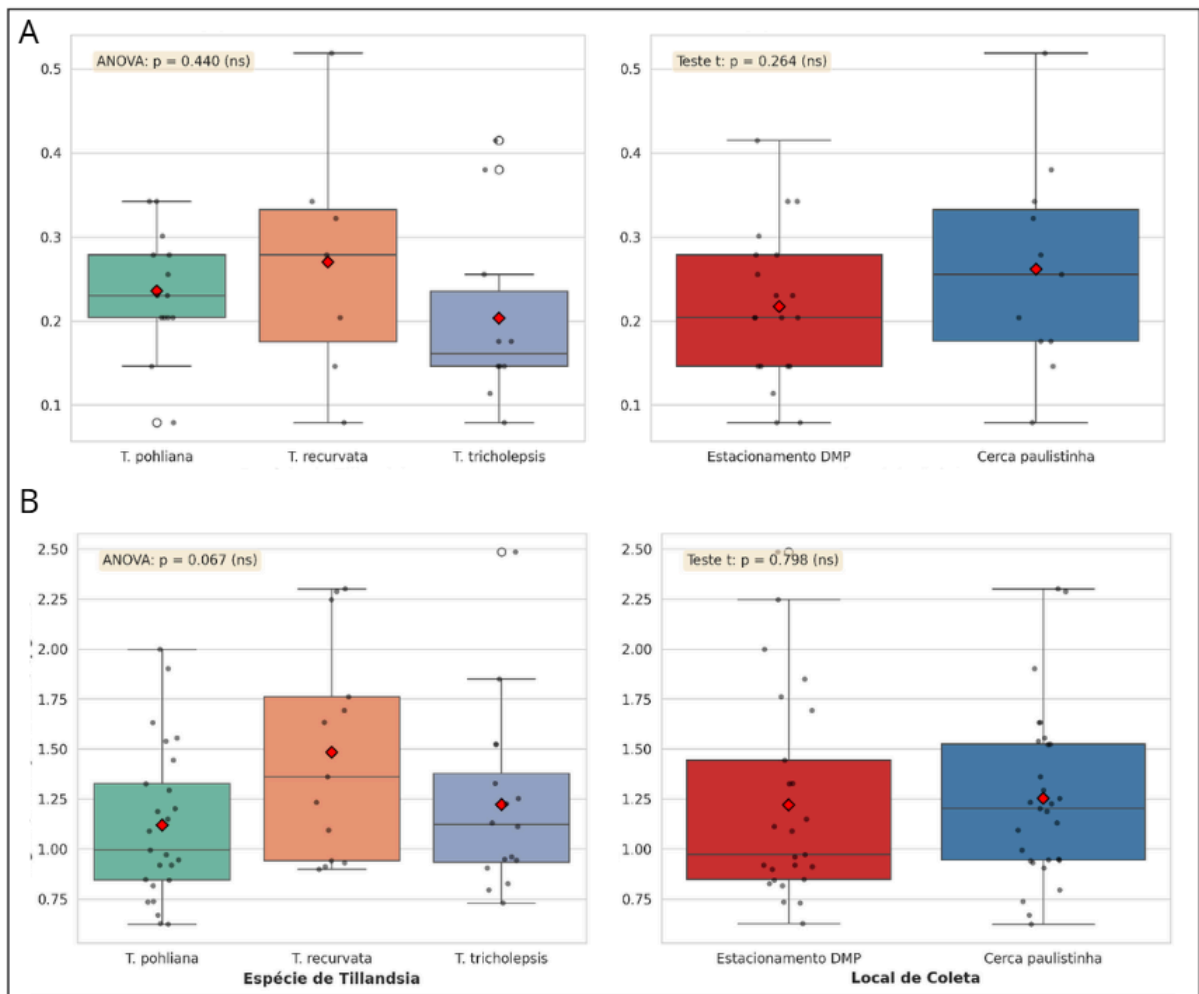


**Figura 21** - Gráfico de barras comparando os números de bactérias obtidos em cada meio de isolamento quanto a FBN, solubilização de fosfato e alta produção de AIA. **Fonte:** autoria própria (2025).



**Figura 22** - Box-plot contendo uma visualização dos resultados obtidos nos diferentes meios de isolamento utilizados. A) Teste de solubilização de fosfato, meios com resultados estatisticamente semelhantes. B) Teste de produção de AIA, apresentando diferença significativa nos resultados obtidos entre os meios TSA e ACG. **Fonte:** autoria própria (2025).

Quanto à comparação entre os resultados obtidos por espécie de *Tillandsia* e local de coleta, a análise estatística demonstrou não existir diferença significativa na capacidade de solubilização de fosfato ou produção de AIA (Figura 23). Mesmo que alguns isolados tenham se destacado quanto aos valores obtidos, a variabilidade dentro dos grupos de comparação foi alta, fazendo com que a média entre eles fosse semelhante. Dessa forma, avaliando as médias dos resultados obtidos nos ensaios de forma geral por uma perspectiva estatística, os exemplares de *Tillandsia* associados à árvores são um alvo tão interessante para bioprospecção de bactérias quanto os associados à cercas, o que também se aplica para as espécies de *T. pohliana*, *T. recurvata* e *T. tricholepsis*.



**Figura 23** - Box-plot contendo uma visualização dos resultados obtidos nos isolamentos quanto às diferentes espécies de *Tillandsia* e locais de coleta. A) Testes de solubilização de fósforo, condições com resultados estatisticamente semelhantes. B) Testes de produção de AIA, condições com resultados estatisticamente semelhantes. **Fonte:** autoria própria (2025).

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstraram a grande diversidade das bactérias isoladas de bromélias do gênero *Tillandsia*, tanto morfológicamente quanto nas características de interesse biotecnológico. Foram isoladas no total 54 bactérias, sendo 46% obtidas das coletas de árvores localizadas no estacionamento do Departamento de Morfologia e Patologia (das quais 52% foram isoladas da espécie *Tillandsia pohliana*, 20% de *Tillandsia recurvata* e 28% de *Tillandsia tricholepsis*). Os restantes 53% foram isolados de plantas coletadas de cercas (sendo 41% de *Tillandsia pohliana*, 28% de *Tillandsia recurvata* e 31% de *Tillandsia tricholepsis*).

Em relação aos ensaios realizados relacionados a estímulos do crescimento vegetal, 46% dos isolados apresentaram atividade de fixação de nitrogênio, dos quais 59% foram caracterizados como epifíticos, indicando alta FBN na superfície foliar das bromélias. Dentre todas as bactérias isoladas, 22% solubilizaram fósforo com eficiência, obtendo um índice de solubilização satisfatório. Todas as bactérias produziram AIA, sendo 20% produtoras desse hormônio em altas concentrações (maiores que 40 µg/mL). Quanto aos testes de atividade antimicrobiana, apenas um isolado teve resultado positivo, sendo este contra *Staphylococcus aureus*.

A análise da metodologia revelou que o meio Ágar Caseína-Glicerol rendeu na maior quantidade de isolados com características de interesse, principalmente quanto a produção de AIA, indicando que é um meio valioso para uso em procedimentos de isolamento de microrganismos. Comparando a média geral dos valores obtidos nos testes realizados, os locais de isolamento e as espécies de *Tillandsia* estudadas têm o mesmo valor estatístico quanto às características de interesse biotecnológico.

Considerando todos esses fatores, conclui-se que o gênero *Tillandsia* apresenta um microbioma diverso tanto na superfície foliar quanto em seus tecidos internos, e que a associação dessas bactérias com as bromélias envolvem a metabolização e produção de compostos vitais ao crescimento vegetal. Portanto, se trata de um grupo com alto valor para bioprospecção, com potencial em diferentes espécies vegetais localizadas em habitats com características variadas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AACHATH, R. S.; RUPAWALLA, Z. H. Epiphytic bacteria and their uses in sustainable agriculture: a review. **Current Agriculture Research Journal**, v. 13, n. 1, 2025. DOI: <http://dx.doi.org/10.12944/CARJ.13.1.04>
- AGHDAM, S. A.; BROWN, A. M. V. Deep learning approaches for natural product discovery from plant endophytic microbiomes. **Environmental microbiome**, v. 16, n. 1, 2021.
- AMANING DANQUAH, C.; MINKAH, P. A. B.; OSEI DUAH JUNIOR, I.; AMANKWAH, K. B.; SOMUAH, S. O. Antimicrobial Compounds from Microorganisms. **Antibiotics**, v. 11, n. 3, p. 285, 22 fev. 2022.
- ARAÚJO, W. L. *et al.* **Guia prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: ESALQ/USP, 2010.
- BENZ, B. W.; MARTIN, C. E. Foliar trichomes, boundary layers, and gas exchange in 12 species of epiphytic Tillandsia (Bromeliaceae). **Journal of Plant Physiology**, v. 163, n. 6, p. 648–656, abr. 2006.
- BENZING, D.H. Vascular epiphytes. **Cambridge University Press**, p. 3–4, 1990.
- BLAKEMAN, J. P.; BRODIE, I. D. S. Competition for nutrients between epiphytic micro-organisms and germination of spores of plant pathogens on beetroot leaves. **Physiological plant pathology**, v. 10, n. 1, p. 29–42, 1977b.
- BONNET, A.; QUEIROZ, M. H. Vertical stratification of epiphytic bromeliads on different stages of secondary succession of Atlantic Rainforest, in Santa Catarina Island, Santa Catarina, Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n. 2, 1 jun. 2006.
- BRIC, J. M.; BOSTOCK, R. M.; SILVERSTONE, S. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. **Applied and Environment Microbiology**, v.57, p.535–538, 1991.
- BRIGHIGNA, L. *et al.* Role of the nitrogen-fixing bacterial microflora in the epiphytism of Tillandsia (Bromeliaceae). **American journal of botany**, v. 79, n. 7, p. 723–727, 1992.
- BRIGHIGNA, L.; RAVANELLI, M.; MINELLI, A. The use of an epiphyte (Tillandsia caput-medusae E. Morren) as bioindicator of air pollution in Costa Rica. **Science of the Total Environment**, v. 198, p. 175–180, 1997.
- CHANG, W.-S.; LEE, H.-I.; HUNGRIA, M. Soybean Production in the Americas. **Principles of Plant-Microbe Interactions**, p. 393–400, 2015.
- CRAWFORD, D. L.; LYNCH, J. M.; WHIPPS, J. M.; OUSLEY, M. A. Isolation and Characterization of Actinomycete Antagonists of a Fungal Root Pathogen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 11, p. 3899–3905, 1993.
- DAVIES, P. J. **Plant hormones: physiology, biochemistry, and molecular biology**. Kluwer Academic, p. 833, 1995.
- DÖBEREINER, J; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. L. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília: **Embrapa**, v.1, p.60, 1995.

DOUST, R. H.; SABERI, M.; HOSSEINI, M. J.; MOBAREZ, A. M. Surveillance of current antibiotic resistance among clinical isolates *S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa* collected from five Iranian cities . **Journal of Pharmaceutical and Health Sciences**, p. 53–61, 2012.

ESHBOEV, F.; MAMADALIEVA, N.; NAZAROV, P. A.; HUSSAIN, H.; KATANAEV, V.; EGAMBERDIEVA, D.; AZIMOVA, S. Antimicrobial Action Mechanisms of Natural Compounds Isolated from Endophytic Microorganisms. **Antibiotics**, v. 13, n. 3, p. 271, 1 mar. 2024. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2079-6382/13/3/271>>.

ESTENSON, Kasey et al. Characterization of Indole-3-acetic acid biosynthesis and the effects of this phytohormone on the proteome of the plant-associated microbe *Pantoea* sp. YR343. **Journal of proteome research**, v. 17, n. 4, p. 1361-1374, 2018.

ESTRELLA-PARRA, E. *et al.* Review: The *Tillandsia* genus: history, uses, chemistry, and biological activity. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat**, 2019.

FIRÁKOVÁ, S.; ŠTURDÍKOVÁ, M.; MÚČKOVÁ, M. Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. **Biologia**, v. 62, n. 3, p. 251–257, 2007.

GALLO, L. A.; BASSO, L. C. **Metabolismo do nitrogênio**. Apostila de Produtividade Agrícola. Escola Superior De Agricultura Luiz De Queiroz; Departamento de Ciências Biológicas, p. 56, 2012.

GILMARTIN, A. J.; BROWN, G. K. Bromeliales, related monocots, and resolution of relationships among Bromeliaceae subfamilies. **Systematic botany**, v. 12, n. 4, p. 493, 1987.

GIONGO, A. *et al.* Characterization of plant growth-promoting bacteria inhabiting *Vriesea gigantea* Gaud. and *Tillandsia aeranthos* (Loiseleur) L.B. Smith (Bromeliaceae). **Biota Neotropica**, v. 13, n. 3, p. 80–85, 2013.

GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Hindawi Publishing Corporation Scientifica**, 2012, 15p.

HAKOBYAN, A. *et al.* *Tillandsia landbeckii* phyllosphere and lamosphere as refugia for bacterial life in a hyperarid desert environment. **Microbiome**, v. 11, n. 1, 2023.

HALLMANN, J. *et al.* Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian journal of microbiology**, v. 43, n. 10, p. 895–914, 1997.

HARTMANN, A.; SINGH, M.; W. KLINGMÜLLER. Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indoleacetic acid. **Canadian journal of microbiology**, v. 29, n. 8, p. 916–923, 1 ago. 1983.

HUSEN, E. Screening of soil bacteria for plant growth promotion activities in vitro. **Indonesian Journal of Agricultural Science**, Cibinong, v. 4, n. 1, p. 27-31, 2003.

JOO, H.-S.; DEYRUP, S. T.; SHIM, S. H. Endophyte-produced antimicrobials: a review of potential lead compounds with a focus on quorum-sensing disruptors. **Phytochemistry reviews: proceedings of the Phytochemical Society of Europe**, v. 20, n. 3, p. 543–568, 2021.

KEMBEL, S. W.; MEADOW, J. F.; O'CONNOR, T. K.; MHUIREACH, G.; NORTHCUTT, D.; KLINE, J.; MORIYAMA, M.; BROWN, G. Z.; BOHANNAN, B. J. M.; GREEN, J. L. Architectural Design Drives the Biogeography of Indoor Bacterial Communities. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e87093, 29 jan. 2014.

KHAN, M. S., ZAIDI, A., AHMAD, E. Mechanism of phosphate solubilization and physiological functions of phosphate-solubilizing microorganisms. In: Phosphate solubilizing microorganisms. **Springer International Publishing**, p.31-62, 2014.

KLEINER, A. A. P. *et al.* **Guia Prático: Isolamento e Caracterização de Microrganismos Endofíticos**. Piracicaba: Copiadora "Luiz de Queiroz". 167p., 2010.

LAMBRECHT, M.; OKON, Y.; BROEK, A. V.; VANDERLEYDEN, J. Indole-3-acetic acid: a reciprocal molecule in bacteria-plant interactions. **Trends in Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 298-300, 2000. DOI: 10.1016/S0966-842X(00)01732-7.

LECHEVALIER, H. Actinomycetes of sewage-treatment plants. Cincinnati: U.S. **Environmental Protection Agency**, 1975.

LI, J. *et al.* Isolation and characterization of culturable endophytic actinobacteria associated with *Artemisia annua*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 101, n. 3, p. 515–527, 2012.

LINDOW, S. E.; BRANDL, M. T. Microbiology of the phyllosphere. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. 4, p. 1875–1883, 2003.

LO, M.-M.; BENFODDA, Z.; DUNYACH-RÉMY, C.; BÉNIMÉLIS, D.; ROULARD, R.; FONTAINE, J.-X.; MATHIRON, D.; QUÉRO, A.; MOLINIÉ, R.; MEFFRE, P. Isolation and Identification of Flavones Responsible for the Antibacterial Activities of *Tillandsia bergeri* Extracts. **ACS Omega**, v. 7, n. 40, p. 35851–35862, 27 set. 2022. Acesso em: 24 mar. 2023.

LUTHER, H. E. An Alphabetical list of bromeliad binomes. **The Bromeliad Society Inc.** Oregon, 2004.

MANFIO, G. P. **Microbiota: Avaliação do estado de conhecimento da diversidade biológica do Brasil**. Ministério do Meio Ambiente, 2003.

MARÍN, G.; MARÍA, L. **Diversidad de bacterias endófitas con capacidad de solubilizar fosfato, asociadas a dos especies del género *Tillandsia* en bosque seco tropical, corregimiento Las Palomas, Montería-Córdoba**. Universidad de Córdoba, 2020.

Disponível em:

<<https://repositorio.unicordoba.edu.co/entities/publication/c37b3c0d-d87a-4d8c-b873-1c0a2beb3a17>>. Acesso em: 15 out. 2025.

MARRA, L. M.; SOARES, C. R. F. S. S.; DE OLIVEIRA, S. M.; FERREIRA, P. A. A. A.; SOARES, B. L.; CARVALHO, R. F.; LIMA, J. M.; MOREIRA, F. M. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant Soil**, p.289–307, 2012.

MONTAINI, P. *et al.* Phyllospheric Nitrogen Fixing Bacteria in *Tillandsia* Leaves. **Springer eBooks**, p. 77–78, 1 jan. 1991.

NETO, P. A. S. P.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Micro-organismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 29, p. 62–76, 2002.

O'NEILL, J. Antimicrobial resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. **Review on Antimicrobial Resistance**, 2014.

OSPINA-BAUTISTA, F.; ESTÉVEZ VARÓN, J. V. Plant structure predicts leaf litter capture in the tropical montane bromeliad *Tillandsia turneri*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, n. 3, p. 686–691, 3 maio 2016.

PAPINI, A.; TANI, G.; DI FALCO, P.; BRIGHIGNA, L. The ultrastructure of the development of *Tillandsia* (Bromeliaceae) trichome. **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 205, n. 2, p. 94–100, jan. 2010.

PEREZ-LOPEZ, Macrina et al. Anti-virulence activities of some *Tillandsia* species (Bromeliaceae). **Bot. sci**, México, v. 98, n. 1, p. 117-127, marzo 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.17129/botsci.2380>>. Acesso em: 27 out. 2025. Epub 20-Jun-2020.

QIN, S. *et al.* Isolation, diversity, and antimicrobial activity of rare Actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna, China. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 19, p. 6176–6186, 2009.

REZENDE, C. C.; SILVA, M. A.; FRASCA, L. L. de M.; FARIA, D. R.; FILIPPI, M. C. C. de; LANNA, A. C.; NASCENTE, A. S. Microrganismos multifuncionais: utilização na agricultura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e50810212725, 27 fev. 2021b. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1136809/1/rsd-2021.pdf>>.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promoting. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 17, p. 319–339, 1999.

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

SHARMA, M.; MALLUBHOTLA, S. Diversity, Antimicrobial Activity, and Antibiotic Susceptibility Pattern of Endophytic Bacteria Sourced From *Cordia dichotoma* L. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 13 maio 2022.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Solubilização de fostatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, n. 2, p. 311–319, jun. 2000. Acesso em: 26 fev. 2023.

SILVA, M. DE O. et al. Isolamento e prospecção de bactérias endofíticas e epifíticas na cana-de-açúcar em áreas com e sem cupinicida. **Revista brasileira de ciência do solo**, v. 36, n. 4, p. 1113–1122, 2012.

SIQUEIRA, J. S. **Microbial genes associated with *Tillandsia* sp.: Isolation and selection of endophytes with agronomic potential**. Universidade Estadual Paulista, 2025. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/63827453-fa70-40a2-8e57-60d6059b383c/content>>. Acesso em: 10 out. 2025.

SIQUEIRA, J. S.; DE CARVALHO, L. A. L.; SANTOS, C. H. B.; FREZARIN, E. T.; PINHEIRO, D. G.; NICODEMO, D.; DESOIGNIES, N.; RIGOBELLO, E. C. Influence of

Growth Support on the Diversity, Composition, and Functionality of Microbial Communities Associated with *Tillandsia recurvata*. **Microbial Ecology**, v. 87, n. 1, 16 out. 2024.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Tillandsioideae (Bromeliaceae). **Flora Neotropica Monograph**, v. 14, 1977.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Bromelioideae (Bromeliaceae). **Flora Neotropica, Monograph**, v. 14, p. 1493–2142, 1979.

SOUZA, S. C. **Análise da atividade antimicrobiana de bactérias isoladas do solo e da água do reservatório de Furnas**. Universidade Federal de Alfenas, p.10–11, 2011.

STROBEL, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and infection**, v. 5, n. 6, p. 535–544, 2003.

SWIFT, C. L. et al. Anaerobic gut fungi are an untapped reservoir of natural products. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 118, e2019855118, 2021.

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**, Amsterdam, v.91, p.127–141, 2001.

VIANA, T. F. C. *et al.* Cultivable bacterial diversity associated with bromeliad roots from ironstone outcrops in central Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 80, n. 4, p. 872–880, 2020.

VITE-POSADAS, J. Alejandro et al . Morphoanatomical characterization and antimicrobial activity of *Tillandsia imperialis* (bromeliaceae). **Polibotánica**, México , n. 31, p. 20-29, 2011.

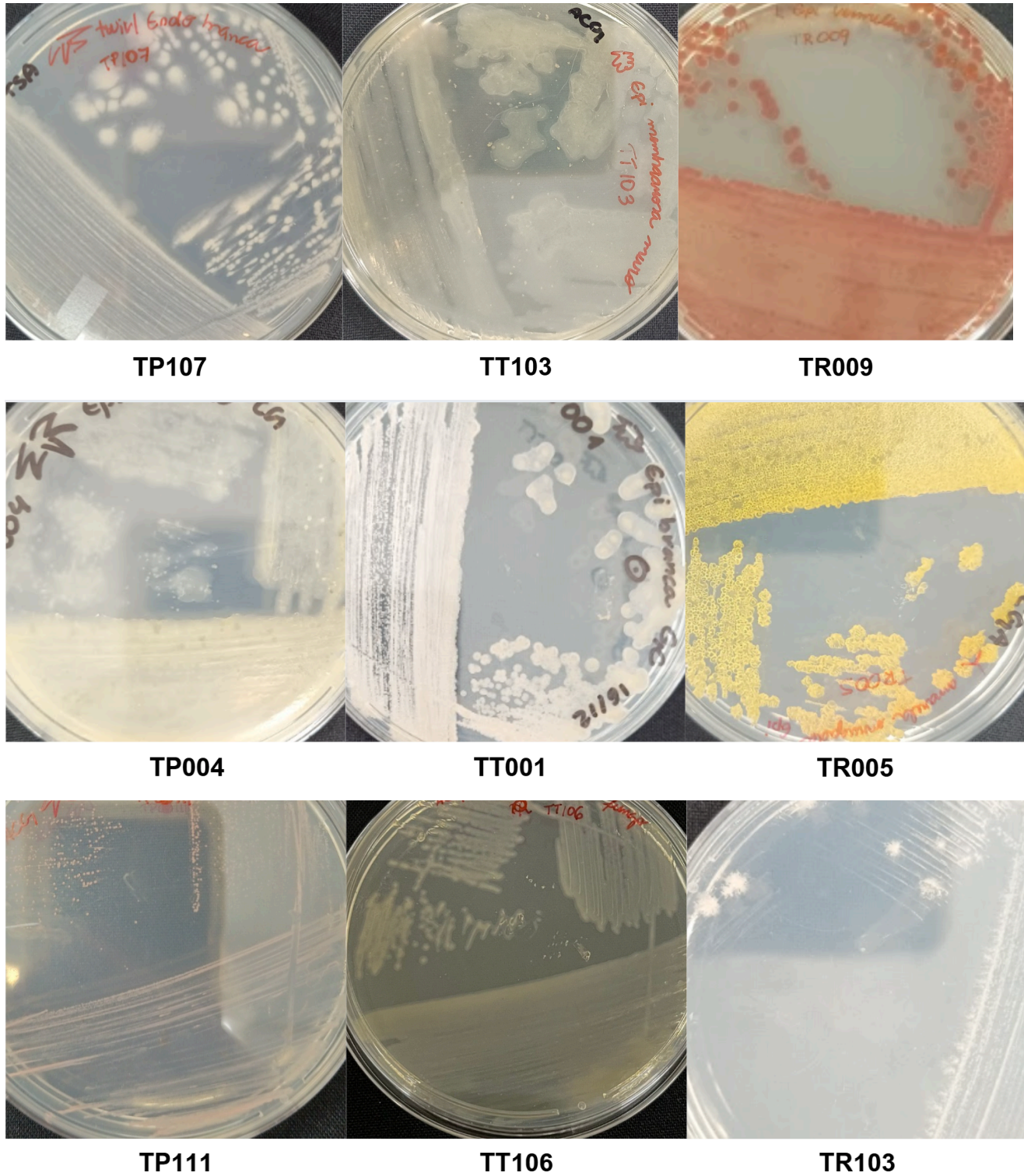
YOUNAS, H. Secondary metabolites from marine epiphytic bacteria against plant pathogens. **Elsevier eBooks**, p. 353–379, 1 jan. 2024.

## APÊNDICE A - Caracterização Morfológica dos isolados

Local de Coleta	Espécie vegetal	Classificação do isolamento	Código	Identificação Morfológica
Estacionamento DMP	T. pohliana	Epifítico	TP001	filamentosa opaca com pigmento amarelado claro
Estacionamento DMP	T. pohliana	Epifítico	TP002	circular elevada, transparente com pigmento esverdeado
Estacionamento DMP	T. pohliana	Epifítico	TP003	irregular plana lobada, transparente com pigmento amarelo
Estacionamento DMP	T. pohliana	Epifítico	TP004	puntiforme elevada mucóide, transparente
Estacionamento DMP	T. pohliana	Epifítico	TP005	circular papiforme, núcleo opaco branco
Estacionamento DMP	T. pohliana	Epifítico	TP006	rizóide opaca salmão
Estacionamento DMP	T. pohliana	Epifítico	TP007	irregular plana lobada, transparente com pigmento rosa
Cerca paulistinha	T. pohliana	Epifítico	TP008	circular plana, opaca branca
Cerca paulistinha	T. pohliana	Epifítico	TP009	irregular elevada ondulada, opaca branca
Cerca paulistinha	T. pohliana	Epifítico	TP010	irregular plana ondulada, transparente
Cerca paulistinha	T. pohliana	Epifítico	TP011	irregular plana lobulada, transparente
Cerca paulistinha	T. pohliana	Epifítico	TP012	circular plana, opaca, pigmento rosa claro
Cerca paulistinha	T. pohliana	Epifítico	TP013	puntiforme plana, opaca branca
Cerca paulistinha	T. pohliana	Epifítico	TP014	circular plana, opaca com pigmento rosa
Estacionamento DMP	T. pohliana	Endofítico	TP101	circular convexa, opaca com pigmento amarelo
Estacionamento DMP	T. pohliana	Endofítico	TP102	circular plana, transparente com borda opaca branca
Estacionamento DMP	T. pohliana	Endofítico	TP103	puntiforme plana, transparente com pigmento rosa
Estacionamento DMP	T. pohliana	Endofítico	TP104	puntiforme plana, transparente
Estacionamento DMP	T. pohliana	Endofítico	TP105	circular plana, opaca com pigmento rosa

Estacionamento DMP	T. pohliana	Endofítico	TP106	circular plana, transparente com pigmento rosa
Cerca paulistinha	T. pohliana	Endofítico	TP107	filamentosa opaca branca
Cerca paulistinha	T. pohliana	Endofítico	TP108	irregular plana ondulada, transparente branca
Cerca paulistinha	T. pohliana	Endofítico	TP109	irregular elevada lobulada, opaca branca
Cerca paulistinha	T. pohliana	Endofítico	TP110	irregular elevada espiral, transparente com pigmento rosa
Cerca paulistinha	T. pohliana	Endofítico	TP111	circular convexa, opaca com pigmento rosa
Estacionamento DMP	T. recurvata	Epifítico	TR001	colônia grande irregular plana ondulada, transparente
Estacionamento DMP	T. recurvata	Epifítico	TR002	filamentosa, transparente com pigmento amarelo
Estacionamento DMP	T. recurvata	Epifítico	TR003	irregular plana ondulada, transparente com pigmento laranja
Cerca paulistinha	T. recurvata	Epifítico	TR004	puntiforme convexa, transparente
Cerca paulistinha	T. recurvata	Epifítico	TR005	filamentosa, opaca com pigmento amarelo
Cerca paulistinha	T. recurvata	Epifítico	TR006	irregular plana lobulada, opaca com pigmento amarelo
Cerca paulistinha	T. recurvata	Epifítico	TR007	fusiforme plana, transparente
Cerca paulistinha	T. recurvata	Epifítico	TR008	circular papilada, transparente
Cerca paulistinha	T. recurvata	Epifítico	TR009	filamentosa opaca, pigmento vermelho
Estacionamento DMP	T. recurvata	Endofítico	TR101	irregular plana ondulada, opaca com pigmento amarelo
Estacionamento DMP	T. recurvata	Endofítico	TR102	irregular papilada ondulada, núcleo opaco alaranjado
Cerca paulistinha	T. recurvata	Endofítico	TR103	rizóide opaca branca
Cerca paulistinha	T. recurvata	Endofítico	TR104	irregular elevada ondulada, opaca alaranjada
Estacionamento DMP	T. tricholepsis	Epifítico	TT001	irregular papilada ondulada, núcleo opaco alaranjado
Estacionamento DMP	T. tricholepsis	Epifítico	TT002	irregular plana lobulada, transparente com pigmento amarelo
Estacionamento	T. tricholepsis	Epifítico	TT003	irregular plana lobulada, transparente

DMP				
Cerca paulistinha	T. tricholepsis	Epifítico	TT004	irregular elevada lobulada , opaca creme
Cerca paulistinha	T. tricholepsis	Epifítico	TT005	puntiforme plana, transparente
Cerca paulistinha	T. tricholepsis	Epifítico	TT006	irregular elevada ondulada, transparente com pigmento amarelo
Estacionamento DMP	T. tricholepsis	Endofítico	TT101	irregular plana ondulada, transparente branca
Estacionamento DMP	T. tricholepsis	Endofítico	TT102	irregular elevada ondulada, opaca com pigmento rosa
Cerca paulistinha	T. tricholepsis	Endofítico	TT103	puntiforme plana, mucóide transparente
Cerca paulistinha	T. tricholepsis	Endofítico	TT104	irregular plana lobulada, mucóide transparente
Cerca paulistinha	T. tricholepsis	Endofítico	TT105	circular convexa, pigmento laranja
Cerca paulistinha	T. tricholepsis	Epifítico	TT106	circular papilada, opaca branca
Cerca paulistinha	T. tricholepsis	Endofítico	TT107	circular convexa, transparente com pigmento rosa
Cerca paulistinha	T. tricholepsis	Endofítico	TT108	circular convexa, opaca com pigmento rosa
Estacionamento DMP	T. tricholepsis	Endofítico	TT109	circular plana, transparente com pigmento rosa
Estacionamento DMP	T. tricholepsis	Endofítico	TT110	puntiforme papilada inteira, transparente



**Figura Apêndice A** - Ampliação de isolados com diferentes características morfológicas. **Fonte:** autoria própria (2025).

### APÊNDICE B – Resultados dos testes de fatores de crescimento vegetal

Local de Coleta	Espécie vegetal	Classificação do isolamento	Código	Fixação de Nitrogênio	ISF	AIA (µg/mL)
Estacionamento o DMP	T. pohliana	Epifítico	TP001	+	1,7	8,34
Estacionamento o DMP	T. pohliana	Epifítico	TP002	-	1,6	14,14
Estacionamento o DMP	T. pohliana	Epifítico	TP003	+	2,2	99,57
Estacionamento o DMP	T. pohliana	Epifítico	TP004	-	1,6	7,00
Estacionamento o DMP	T. pohliana	Epifítico	TP005	+	1,9	12,30
Estacionamento o DMP	T. pohliana	Epifítico	TP006	-	1,9	5,44
Estacionamento o DMP	T. pohliana	Epifítico	TP007	+	1,6	9,39
Cerca paulistinha	T. pohliana	Epifítico	TP008	+	1,6	79,78
Cerca paulistinha	T. pohliana	Epifítico	TP009	-	-	34,70
Cerca paulistinha	T. pohliana	Epifítico	TP010	-	-	5,49
Cerca paulistinha	T. pohliana	Epifítico	TP011	-	-	36,02
Cerca paulistinha	T. pohliana	Epifítico	TP012	-	-	4,69
Cerca paulistinha	T. pohliana	Epifítico	TP013	+	2,2	15,42
Cerca paulistinha	T. pohliana	Epifítico	TP014	+	-	4,22
Estacionamento o DMP	T. pohliana	Endofítico	TP101	-	2	21,25
Estacionamento o DMP	T. pohliana	Endofítico	TP102	-	-	4,24
Estacionamento o DMP	T. pohliana	Endofítico	TP103	-	1,8	6,58
Estacionamento o DMP	T. pohliana	Endofítico	TP104	-	-	27,84
Estacionamento o DMP	T. pohliana	Endofítico	TP105	+	1,7	8,33
Estacionamento o DMP	T. pohliana	Endofítico	TP106	+	1,4	7,07

Cerca paulistinha	T. pohliana	Endofítico	TP107	-	-	19,69
Cerca paulistinha	T. pohliana	Endofítico	TP108	-	-	15,98
Cerca paulistinha	T. pohliana	Endofítico	TP109	+	-	42,93
Cerca paulistinha	T. pohliana	Endofítico	TP110	-	1,2	8,85
Cerca paulistinha	T. pohliana	Endofítico	TP111	+	-	9,90
Estacionament o DMP	T. recurvata	Epifítico	TR001	+	1,2	49,36
Estacionament o DMP	T. recurvata	Epifítico	TR002	+	1,6	176,48
Estacionament o DMP	T. recurvata	Epifítico	TR003	-	-	57,70
Cerca paulistinha	T. recurvata	Epifítico	TR004	+	-	8,75
Cerca paulistinha	T. recurvata	Epifítico	TR005	+	1,9	200,41
Cerca paulistinha	T. recurvata	Epifítico	TR006	+	1,9	194,26
Cerca paulistinha	T. recurvata	Epifítico	TR007	+	-	17,14
Cerca paulistinha	T. recurvata	Epifítico	TR008	-	-	23,00
Cerca paulistinha	T. recurvata	Epifítico	TR009	+	-	8,55
Estacionament o DMP	T. recurvata	Endofítico	TR101	-	1,4	7,93
Estacionament o DMP	T. recurvata	Endofítico	TR102	-	2,2	8,16
Cerca paulistinha	T. recurvata	Endofítico	TR103	-	-	43,11
Cerca paulistinha	T. recurvata	Endofítico	TR104	+	3,3	12,44
Estacionament o DMP	T. tricholepsis	Epifítico	TT001	-	-	6,73
Estacionament o DMP	T. tricholepsis	Epifítico	TT002	+	2,6	5,38
Estacionament o DMP	T. tricholepsis	Epifítico	TT003	-	-	21,36
Cerca	T. tricholepsis	Epifítico	TT004	-	1,5	17,97

paulistinha						
Cerca paulistinha	T. tricholepsis	Epifítico	TT005	-	-	6,25
Cerca paulistinha	T. tricholepsis	Epifítico	TT006	-	-	13,53
Estacionamento DMP	T. tricholepsis	Endofítico	TT101	-	1,4	9,16
Estacionamento DMP	T. tricholepsis	Endofítico	TT102	-	1,4	305,53
Cerca paulistinha	T. tricholepsis	Endofítico	TT103	-	1,8	33,51
Cerca paulistinha	T. tricholepsis	Endofítico	TT104	+	2,4	16,88
Cerca paulistinha	T. tricholepsis	Endofítico	TT105	-	1,4	33,38
Cerca paulistinha	T. tricholepsis	Epifítico	TT106	-	-	8,81
Cerca paulistinha	T. tricholepsis	Endofítico	TT107	+	1,5	8,90
Cerca paulistinha	T. tricholepsis	Endofítico	TT108	+	-	8,06
Estacionamento DMP	T. tricholepsis	Endofítico	TT109	+	1,3	70,79
Estacionamento DMP	T. tricholepsis	Endofítico	TT110	+	1,2	12,99

## ANEXO 1 - Composição de meios de cultura e soluções

### 1.1 Composição do meio Ágar Caseína-Glicerol (KLEINER *et al.*, 2010)

Componente	Concentração (g/L)
Glicerol	10,0 mL
Nitrato de potássio (KNO <sub>3</sub> )	2,0
Caseína	0,3
Cloreto de sódio (NaCl)	2,0
Fosfato de potássio dibásico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2,0
Sulfato de magnésio (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	0,05
Carbonato de cálcio (CaCO <sub>3</sub> )	0,02
Sulfato de ferro (FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	0,01
Ágar	15

### 1.2 Composição do meio NFb (DÖBEREINER *et al.*, 1995)

Componente	Concentração (g/L)
Ácido Málico (C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub> )	5,0
Fosfato de potássio bibásico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O)	0,5
Sulfato de magnésio (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	0,2
Cloreto de cálcio (CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O)	0,02
Cloreto de sódio (NaCl)	0,1
Hidróxido de potássio (KOH)	4,5
Ágar	2,3
FeEDTA 1,64%	4 mL/L
Solução de micronutrientes	2 mL/L
Solução de vitaminas	1 mL/L
Solução de azul de bromotimol (0,5%)	2 mL/L

**Solução de micronutrientes**

Sulfato de manganês ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	1,17
Sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	0,04
Molibdato de sódio ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	1,0
Sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	1,2
Ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )	1,4

**Solução de vitaminas**

Biotina	0,1
Piridoxina	0,02

**1.3 Composição do meio fosfato de cálcio tribásico (VERMA et al., 2001)**

<b>Componente</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
Glicose	10,0
Cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ )	5,0
Cloreto de amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )	5,0
Sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	1,0
Extrato de levedura	0,5
Fosfato de cálcio tribásico ( $\text{Ca}_3\text{OH}(\text{PO}_4)_3$ )	5,0
Ágar	15,0