

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL**

**MILCA RACHEL DA COSTA RIBEIRO LINS**

**SELEÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS DA RIZOSFERA DA CAATINGA COM  
POTENCIAL PARA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL**

**Recife**  
**2014**

**MILCA RACHEL DA COSTA RIBEIRO LINS**

**SELEÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS DA RIZOSFERA DA CAATINGA COM  
POTENCIAL PARA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

Área de Concentração: Microbiologia e Bioprocessos

Orientador (a): Profa. Dra. Janete Magali de Araújo

Co-orientador (a): Profa. Dra. Gláucia Manoella de Souza Lima

**Recife**

**2014**

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Lins, Milca Rachel da Costa Ribeiro

Seleção de actinobactérias da rizosfera da caatinga com potencial para promoção de crescimento vegetal / Milca Rachel da Costa Lins. – Recife: O Autor, 2014.

83 folhas: il.

Orientadora: Janete Magali de Araújo

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial, 2014.

Inclui bibliografia, anexos e apêndices

1. Bactérias 2. Plantas da caatinga I. Araújo, Janete Magali de (orient.) II. Lima, Gláucia Manoella da Souza (coorient.) III. Título.

579.37

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-092

**MILCA RACHEL DA COSTA RIBEIRO LINS**

**SELEÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS DA RIZOSFERA DA CAATINGA COM  
POTENCIAL PARA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Janete Magali de Araújo

Universidade Federal de Pernambuco/Departamento de Antibióticos

---

Prof. Dr. Tiago Domingues Zucchi PhD

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)/ Jaguariúna

---

Profa. Dra. Márcia do Vale Barreto Figueiredo

Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA/SEAGRI)

Recife, 24 de fevereiro de 2014.

*Dedico primeiramente a DEUS (o Senhor da  
minha vida), meus pais, irmãs e ao noivo mais  
compreensível de todos. Amo vocês demais.*

## AGRADECIMENTOS

*Em primeiro lugar agradeço a DEUS por mais uma vitória alcançada, pois, somente Ele me proporciona todas as condições para atingir os objetivos traçados.*

*Aos meus avôs e avós, Hindenburgo e Teônia (in memorian), Arlindo (in memorian) e Joana, que acreditaram em mim e incentivaram-me a seguir em frente.*

*Aos meus pais, Ana Maria e Marcos Antonio, que com muito amor e abnegação se esforçaram para obter os meios que me fizeram chegar até aqui.*

*Às minhas queridas irmãs, Maressa Rebecca e Ana Rafaela, amigas e companheiras em todos os momentos e brincadeiras! Juntas, seguindo a orientação de nossos pais, trilhamos o caminho de dedicação aos estudos.*

*Aos meus familiares em geral, tios-avós, tios, tias, primos e primas, em especial a tia Maria Izabel que ajudou aos meus pais cuidando de mim, enquanto eles estavam trabalhando para nos manter.*

*À Hugo, meu querido noivo, por sua dedicação e seu amor incondicional e sincero que sempre me ajudou a seguir em frente. Como também a sua família, pelo carinho e orações ao meu favor.*

*À todos meus amigos do Laboratório do Departamento de Antibióticos da UFPE, pela feliz e cooperativa convivência nestes últimos quatro anos: Wanda, Diego do peixe, Ferrer Raphael, Iasminzinha, Wellma, Mersinho, Priscilla, Kássia, Evelyn, Rafael de Manaus, Amanda, Gisele, especialmente às amigas irmãs Jéssica (Jequinha), Nataliane (Nati florzinha) e Graciely (Gracilda).*

*À Fátima Regina (Fafá) e Marcela Araújo (Marcelinha), técnicas no Laboratório de Cultura de Microrganismos, que sempre deram apoio e auxílio seja no âmbito profissional ou pessoal. Pessoas indispensáveis.*

*Ao Professor Msc. Ozias Elias Ferreira, do Instituto Federal de Pernambuco (IFPE), e ao Professor Msc. Egenilton Rodolfo de Farias, da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), pelo valioso apoio nas análises estatísticas dos dados coletados neste trabalho.*

*Aos que compõem a Coordenação da Pós-graduação em Biotecnologia Industrial, Ester Gouveia, Ana Maria Souto Maior e Klayton (o qual “aperriei” demais), pela dedicação, paciência, ajuda e prestatividade em todos os momentos.*

*À minha turma mais que especial da Pós-graduação: Bruninho, Ed, Gracilda, Livia, Marcinha, Mari, Rafa, Raquelzinha, Ceará. Pessoas incríveis que eu convivi nesses dois anos que ficarão na memória. Espero reencontrá-los diversas vezes ao longo das próximas jornadas.*

*Especialmente à Gracilda chatinha (minha companheira de aventuras!) pelas palhaçadas, risos e viagens durante o mestrado! “¿Atraviessa la puente?” vai ficar na história! Rsr rsrs.*

*À equipe da EMBRAPA/Jaguariúna por todo o companheirismo e auxílio nos meus experimentos e nos de Graciely. Ao feijão tropeiro, o café da manhã de despedida além das idas as cachoeiras. Especialmente a: Prof. Itamar, Tiago Zucchi, Rafa Eduardo, Rafa Vasconcellos, Suiki, Vanessa, Camilinha, Danilo baiano, Fábio, Paulinha, Harold colombiano.*

*Ao grupo da Microscopia eletrônica do ‘Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste’ (CETENE): Janaína, Gabi, Josi, Diego e Fábila.*

*À FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco) pelo auxílio financeiro recebido neste projeto.*

*À Dra. Gláucia Manoella, pela orientação, ao me conduzir com zelo e sabedoria, em mais este passo da carreira acadêmica.*

*Especialmente à professora Dra. Janete Magali, minha mãe na ciência, a qual me ensinou a AMAR trabalhar com micro-organismos.*

## RESUMO

O bioma Caatinga é exclusivo do Brasil e inexplorado em relação ao isolamento de micro-organismos produtores de substâncias importantes para agroindústria. As actinobactérias são bactérias filamentosas Gram positivas distribuídas na natureza e são capazes de produzir auxinas e substâncias antimicrobianas, além de disponibilizar nutrientes como fosfato e nitrogênio favorecendo o desenvolvimento de plantas. O presente trabalho teve como objetivo analisar 80 actinobactérias isoladas de rizosferas de plantas da Caatinga produtoras de metabólitos bioativos que auxiliam na promoção de crescimento vegetal. A produção de auxina foi avaliada e observado que 86,25% (69) das linhagens produziram auxina em concentrações variando de 1,75 a 76,48  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Também foi determinado o Índice de Solubilização (IS) de fosfato nos meios de cultura VERMA e NBRIP e observado que 93,75% (75) das linhagens solubilizaram o fosfato nos dois meios com IS variando de 1,15 a 2,25, sendo o meio VERMA estatisticamente melhor para solubilização de fosfato. A produção de fosfatases foi evidenciada em 97,5% (78) das actinobactérias. A atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos fitopatógenos mostrou que 15,0% (12) produziram substâncias antimicrobianas contra os fungos (*Fusarium oxysporum* UFPEDA 2455 e *Colletotrichum* sp. UFPEDA 2419) e 6,25% (5) apresentaram atividade para *Xanthomonas campestris* UFPEDA 407. A produção de amônia foi observada em 80% (64) das linhagens em concentrações variando de 3,59 a 292,31  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A análise de variância e a comparação entre as médias pelo teste de Tukey (5%) evidenciaram que as actinobactérias PR 34 e TUR 704 são as linhagens que se destacaram em relação aos teste realizados. Através das análises cromatográficas foi possível identificar e quantificar o ácido 3-indolacético produzido pela PR 34. As linhagens pertencem ao gênero *Streptomyces* pela técnica de microcultivo, confirmado pelo sequenciamento do gene 16S rRNA, o qual indicou que as linhagens PR 34 e TUR 704 são similares as actinobactérias *Streptomyces fimbriatus* NBRC15411 e *Streptomyces xanthocidicus* NBRC 13469, respectivamente. Os resultados obtidos sugerem que as actinobactérias da Caatinga apresentam potencial biotecnológico, pois apresentam mecanismos que auxiliam no desenvolvimento vegetal, sendo necessário avaliar a viabilidade destes micro-organismos em plantas visando a diminuição do uso de defensivos agrícolas na agroindústria.

**Palavras-chave:** Ácido 3-indolacético; amônia; atividade antimicrobiana; Caatinga; crescimento vegetal; fosfatases; rizobactérias; solubilização de fosfato.



## ABSTRACT

The Caatinga is unique biome of Brazil and it is unexplored in relation to the isolation of microorganisms producers of substances for agribusiness. The actinobacteria are filamentous bacteria Gram positive distributed in nature and are capable of producing auxin and antimicrobial substances, besides providing nutrients such as nitrogen and phosphate favoring plant development. This study aimed to analyze 80 actinobacteria isolated from plant's rhizosphere of Caatinga producing bioactive metabolites which assists in plant growth promotion. The auxin production was assessed and found that 86.25% (69) of isolates produced auxin at concentrations ranging from 1.75 to 76.48  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . It was also determined Posphate Solubilization Index (PSI) in the media VERMA and NBRIP and found that 93.75% (75) of the strains solubilized phosphate in both media with IS ranging from 1.15 to 2.25, and VERMA statistically better medium for phosphate solubilization. The production of phosphatases was observed in 97.5% (78) of actinobacteria. The antimicrobial activity against bacterial and fungal phythopathogens showed that 15.0% (12) produced antimicrobial substances against fungi (*Fusarium oxysporum* UFPEDA 2455 and *Colletotrichum* sp. UFPEDA 2419) and 6.25 % (5) had activity for *Xanthomonas campestris* UFPEDA 407. The ammonia production was observed in 80% (64) of the strains at concentrations ranging from 3.59 to 292.31  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Analysis of variance and comparison of means by Tukey test (5%) showed that the actinobacteria PR 34 and TUR 704 are the strains that stood out in relation to the test performed. Through chromatographic analysis it was possible to identify and quantify the 3-indoleacetic acid produced by PR 34. The strains belong to the genus *Streptomyces* by microculture technique, confirmed by sequencing of the 16S rRNA gene, which indicated that the PR 34 and TUR 704 strains are similar to actinobacteria *Streptomyces fimbriatus* NBRC15411 and *Streptomyces xanthocidicus* NBRC 13469, respectively. The results suggest that the actinobacteria of Caatinga biomed have biotechnological potential as they include mechanisms that assist in plant development, and it is necessary to evaluate the feasibility of these microorganisms in plants aiming to reduce the use of pesticides in the agricultural industry.

**Key words:** ammonia; antimicrobial activity; Caatinga biome; indoleacetic acid; plant growth; phosphatases; rhizobacteria; phosphate solubilization.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 4.1</b> – Esquema para avaliação qualitativa e quantitativa da produção de ácido 3-indolacético (AIA) .....	27
<b>Figura 4.2</b> – Esquema da solubilização de fosfato em meio sólido .....	28
<b>Figura 4.3</b> - Esquema para avaliação qualitativa da produção de fosfatases em meio de cultura sólido .....	28
<b>Figura 4.4</b> - Esquema do teste em bloco de gelose das actinobactérias para micro-organismos fitopatógenos .....	29
<b>Figura 4.5</b> - Esquema para avaliação da produção de amônia (NH <sub>3</sub> ) .....	30
<b>Figura 5.1</b> - Percentual de actinobactérias que apresentaram diferentes colorações do micélio aéreo no meio ISP-2 .....	37
<b>Figura 5.2</b> - Percentual de actinobactérias que apresentaram diferentes colorações do micélio aéreo no meio ISP-3 .....	38
<b>Figura 5.3</b> - Presença do ácido 3-indolacético após a adição do Reagente de Salkowski .....	39
<b>Figura 5.4</b> - Produção de fosfatases pela formação de zona rosa em volta das colônias de actinobactérias .....	46
<b>Figura 5.5</b> - Percentual de actinobactérias quanto à produção de fosfatases .....	46
<b>Figura 5.6</b> - Halos de inibição das actinobactérias que apresentaram atividade antimicrobiana para <i>Colletotrichum</i> sp. UFPEDA 2419 .....	48
<b>Figura 5.7</b> - Halos de inibição das actinobactérias que apresentaram atividade antimicrobiana frente <i>Fusarium oxysporum</i> UFPEDA 2455 .....	48
<b>Figura 5.8</b> - Halos de inibição das actinobactérias que apresentaram atividade para <i>Xanthomonas campestris</i> UFPEDA 407 .....	49

<b>Figura 5.9</b> - Avaliação da produção de amônia pelas linhagens de actinobactérias isoladas de plantas da Caatinga após a adição do reagente de Nessler .....	50
<b>Figura 5.10</b> - Análise estatística dos resultados da produção de ácido 3-indolacético, amônia e solubilização de fosfato .....	54
<b>Figura 5.11</b> - Cromatograma da placa de TLC do extrato bruto da linhagem PR-34 e do padrão ácido 3-indolacético (AIA) .....	55
<b>Figura 5.12</b> - Partição do extrato clorofórmico: A) Frações obtidas da cromatografia em coluna; B) Cromatograma em TLC das frações .....	56
<b>Figura 5.13</b> - Perfil cromatográfico em cromatografia líquida de alta eficiência-HPLC: A) padrão do ácido 3-indolacético; B) fração 6 do extrato clorofórmico da linhagem PR 34 .....	57
<b>Figura 5.14</b> – Microscopia óptica (40x) da linhagem PR 03 identificada como <i>Streptomyces</i> spp. ....	58
<b>Figura 5.15</b> - Árvore filogenética ‘ <i>Neighbor-Joining</i> ’ referente as sequências do gene 16S rRNA das actinobactérias isoladas da Caatinga em relação a micro-organismos depositados no GenBank .....	61

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 4.1</b> – Relação das linhagens de actinobactérias isoladas da rizosfera de plantas da Caatinga: Pereiro (PR), Capitão-do seco (TUR) e Coroa-de-frade (MCR) .....	25
<b>Tabela 4.2</b> - Listagem dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de sequenciamento do gene 16S rRNA das actinobactérias da Caatinga .....	35
<b>Tabela 5.1</b> - Concentração de ácido 3-indolacético ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) produzido pelas actinobactérias isoladas de rizosferas de plantas da Caatinga .....	40
<b>Tabela 5.2</b> - Índice de Solubilização (IS) das linhagens de actinobactérias isoladas de rizosferas de plantas da Caatinga nos meios VERMA e NBRIP .....	43/44
<b>Tabela 5.3</b> - Concentração de amônia ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) produzida pelas actinobactérias isoladas de rizosferas de plantas da Caatinga .....	52
<b>Tabela 5.4</b> - Linhagens mais próximas às actinobactérias isoladas de rizosferas de plantas da Caatinga após sequenciamento do gene 16S rRNA e análise no GenBank .....	60

## SUMÁRIO

<b>1) INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2) REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>15</b>
2.1 O bioma Caatinga .....	15
2.2 Agricultura e alternativas para diminuição do uso de defensivos agrícolas .....	16
2.3 Rizobactérias promotoras do crescimento vegetal .....	17
2.4 Actinobactérias: características e produção de metabólitos .....	18
2.5 Promoção do crescimento vegetal por actinobactérias .....	20
2.5.1 Produção de fitohormônios (Ácido 3-indolacético) .....	20
2.5.2 Solubilização de fosfato inorgânico .....	21
2.5.3 Produção de substâncias antimicrobianas .....	22
2.5.4 Importância das actinobactérias no ciclo do nitrogênio (N <sub>2</sub> ) .....	23
<b>3) OBJETIVOS .....</b>	<b>24</b>
3.1 Objetivo geral .....	24
3.2 Objetivos específicos .....	24
<b>4) MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
4.1 Micro-organismos .....	25
4.2 Agrupamento das actinobactérias pela macromorfologia .....	25
4.3 Mecanismos para promoção de crescimento vegetal por micro-organismos .....	26
4.3.1 Produção de ácido 3-indolacético (AIA) .....	26
4.3.2 Avaliação da solubilização de fosfato em meios sólidos NBRIP e VERMA .....	27
4.3.3 Detecção da produção de fosfatases .....	28
4.3.4 Atividade antimicrobiana para micro-organismos fitopatógenos .....	29
4.3.5 Avaliação da produção de amônia (NH <sub>3</sub> ) .....	30
4.4 Testes estatísticos para seleção de linhagens com maior potencial em promover o crescimento vegetal .....	30
4.5 Identificação do ácido 3-indolacético por análises cromatográficas .....	31
4.5.1 Extração líquido-líquido para obtenção do extrato bruto .....	31
4.5.2 Cromatografia em camada delgada (TLC) do extrato bruto .....	31
4.5.3 Partição do extrato bruto .....	32
4.5.4 Cromatografia em coluna com sílica .....	32

4.5.5 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) .....	33
4.6 Identificação das actinobactérias da rizosfera de plantas da Caatinga .....	33
4.6.1 Identificação a nível de gênero pela técnica de microcultivo .....	33
4.6.2 Identificação molecular pelo sequenciamento de gene 16S rRNA ...	33
4.6.2.1 Extração de DNA total .....	33
4.6.2.2 Reação de amplificação do DNA .....	34
4.6.2.3 Purificação do DNA e reações de sequenciamento .....	34
4.6.2.4 Alinhamento e análise das sequencias .....	35
<b>5) RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>37</b>
5.1 Agrupamento das actinobactérias pela macromorfologia .....	37
5.2 Mecanismos para promoção de crescimento vegetal por micro-organismos .....	38
5.2.1 Produção de ácido 3-indolacético (AIA) .....	38
5.2.2 Avaliação da solubilização de fosfato em meios sólidos NBRIP e VERMA .....	42
5.2.3 Detecção da produção de fosfatases .....	45
5.2.4 Atividade antimicrobiana para micro-organismos fitopatógenos .....	47
5.2.5 Avaliação da produção de amônia (NH <sub>3</sub> ) .....	50
5.3 Testes estatísticos para seleção de linhagens com maior potencial em promover o crescimento vegetal .....	53
5.4 Extração e identificação do ácido 3-indolacético por análises cromatográficas .....	55
5.5 Identificação das actinobactérias isoladas da rizosfera de plantas da Caatinga .....	58
5.5.1 Identificação a nível de gênero pela técnica de microcultivo .....	58
5.5.2 Identificação molecular através do sequenciamento do gene 16S rRNA .....	59
<b>6) CONCLUSÕES .....</b>	<b>63</b>
<b>7) PERSPECTIVA .....</b>	<b>64</b>
<b>8) REFERÊNCIAS .....</b>	<b>65</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>74</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>79</b>

## 1) INTRODUÇÃO

O Brasil está entre os maiores consumidores mundiais de defensivos agrícolas que são utilizados para o controle de pragas e sua aplicação vem sendo bastante questionada pelos impactos negativos que vem causando à saúde humana e ao meio ambiente (ANVISA, 2007). Por isso, buscas por alternativas para tentar diminuir a aplicação de produtos químicos são realizadas com a finalidade de reduzir os impactos causados ao ambiente, pois além de poluir, causam desequilíbrio ecológico (LIMA, 2009).

As rizobactérias são bastante utilizadas no controle biológico como biofertilizantes uma vez que favorecem o desenvolvimento vegetal através de mecanismos como a produção de diversas substâncias reguladoras de crescimento, além de competição através da metabolização de compostos específicos produzidos pelas plantas e supressão de fitopatógenos pela produção de metabólitos antimicrobianos. Estas bactérias podem também auxiliar na disponibilização de nutrientes na rizosfera, através da solubilização de fósforo insolúvel e fixação biológica do nitrogênio sendo denominadas Rizobactérias Promotoras de Crescimento em Planta (RPCP) (OLIVEIRA et al., 2003).

Existem vários representantes bacterianos denominados como RPCP, entre eles o filo *Actinobacteria*, que atua como biofertilizante, promotor de crescimento vegetal e/ou agente de controle biológico apresentando mecanismos como: antibiose, produção de sideróforos, competição e indução de defesas do hospedeiro.

A promoção do crescimento vegetal por via microbiana pode estar associada a vários mecanismos, entre eles podemos citar a produção de fitohormônios, como os grupos das auxinas, citocininas e giberelinas. A auxina é o principal grupo de fitohormônios que regula o crescimento da planta, atuando sobre a divisão, a elongação e diferenciação celular. Entre as auxinas, o ácido 3-indolacético (AIA) é de maior ocorrência nas plantas que irá proporcionar a formação de raízes adventícias no caule e aumento da extensão nas raízes primárias (OLIVEIRA et al., 2003).

Outra característica que permite selecionar as actinobactérias com potencial de favorecer o crescimento das plantas é a eficiência destes micro-organismos em solubilizar diferentes fosfatos (ZAPATA; AXMANN, 1995).

As bactérias solubilizadoras de fosfato atuam sobre o fósforo insolúvel por meio de fosfatases, principalmente fosfatases ácidas, produzindo ácidos orgânicos e inorgânicos e/ou redução do pH, originando o fosfato disponível para as plantas. O fósforo é um elemento muito limitado e os micro-organismos solubilizadores de fosfato são importantes para suprir a

necessidade nutricional das plantas. As RPCPs se destacam durante o processo de colonização, pois podem fornecer o fósforo para o desenvolvimento das plantas (KUKLINSKY-SOBRAL, 2003).

As actinobactérias, por apresentar características de promover o crescimento de plantas, tem sido amplamente estudadas nas últimas décadas como uma alternativa ao uso de defensivos agrícolas (BETTIOL; GHINI, 1995; OLIVEIRA et al., 2003). Estes micro-organismos que apresentem mais de uma característica para a promoção de crescimento vegetal, como por exemplo, mineralização de nutrientes, solubilização de fósforo e/ou produção de auxinas são importantes para aplicação no campo visando o desenvolvimento sustentável da agricultura.

A Caatinga ainda é um bioma subestimado em relação à biodiversidade microbiana como também a ocorrência de micro-organismos, principalmente de rizobactérias produtoras de metabólitos bioativos importantes economicamente que podem ocasionar o crescimento vegetal de culturas de interesse para o Brasil visando o melhoramento da prática agrícola.

Por este motivo, estudos de actinobactérias isoladas da rizosfera da Caatinga são importantes para o conhecimento do papel ecológico neste bioma inexplorado permitindo assim um melhor conhecimento entre o habitat e os micro-organismos investigados. Além disto, é possível avaliar a capacidade destes micro-organismos em produzir substâncias que podem ser aplicadas na agricultura visando diminuir o uso de defensivos agrícolas na agricultura brasileira.



## **2) REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 O bioma Caatinga**

A origem do termo ‘Caatinga’ vem da linguagem indígena que significa ‘caa’, mata e ‘tinga’, aberta, branca e clara, ou seja, “mata branca”, que se refere às características da vegetação no período de seca (EGLER, 1951; MMA; IBAMA, 2011).

Este bioma é único no mundo e ocupa uma parte do território brasileiro, situando-se entre os paralelos 3°- 17°S e os meridianos 35°- 45°W (CARNEIRO-TORRES et al., 2011). É encontrado em sua maioria nos estados do nordeste como Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, e Sergipe, além de parte de Minas Gerais, com área total em torno de 826.411 km<sup>2</sup>, representando aproximadamente 10% do território brasileiro (IBGE, 2004; MMA; IBAMA, 2011).

O bioma apresenta uma vegetação com várias fisionomias, que incluem tanto vegetação arbustiva rala e baixa além de florestas secas, quanto cerrados e florestas úmidas, chamadas ‘Brejos de altitude’. A vegetação natural também é caracterizada pela presença de espécies decíduas e micrófilas, além de adaptações tais como caules e folhas suculentas, acúleos e espinhos (TABARELLI; SILVA, 2000; ZAPPI, 2008).

A vegetação da Caatinga era inicialmente reconhecida como sendo pobre em termos de espécies de plantas. Entretanto, nos últimos anos inúmeras investigações tem demonstrado a riqueza da flora deste bioma onde foram encontrados até o momento 510 gêneros e 5.344 espécies de plantas vasculares, das quais 18 gêneros e 318 espécies são endêmicas (CARNEIRO-TORRES et al. 2011).

O bioma Caatinga é o ecossistema mais seco do território brasileiro (AMORA et al., 2013). O clima é variável nesta região, e pode ser desde o semiárido com índice pluviométrico entre 300-500 mm/ano e chuvas restritas durante o ano até super úmido em torno de 2.000 mm/ano nas serras com altitudes entre 1.000 a 2.000 m. Segundo o Ministério do Meio Ambiente e IBAMA (2011): “O conjunto de contrastes físicos e climáticos condiciona o aparecimento de diferentes tipos vegetacionais, muitas vezes na forma de um mosaico.”.

Várias pesquisas envolvendo o isolamento de actinobactérias em ambientes extremos (como a temperatura elevada ou muito baixa, por exemplo) tem recebido considerável atenção devido à grande diversidade de mecanismos bioquímicos que estas linhagens podem apresentar, como a produção de novas substâncias bioativas (BERNARDO, 2012).

Soares-Jr. et al. (2012) afirmam que a existência de micro-organismos que sobrevivem em ambientes extremos com condições climáticas adversas podem produzir metabólitos de interesse econômico representando assim uma fonte de recursos genéticos, bioquímicos e de novos produtos naturais promissores para a bioprospecção.

## **2.2 Agricultura e alternativas para diminuição do uso de defensivos agrícolas**

A população mundial vem crescendo bastante ao longo dos anos, e em decorrência deste aumento, se faz necessário aumentar a produção de alimentos para atender às necessidades da população (FIGUEIREDO et al., 2008).

O Brasil está entre os países que mais importam e exportam produtos agroindustriais tornando-se mais participativo neste mercado ao longo do tempo, e vem crescendo no mercado internacional. Segundo Nassar (2004), os produtos como a soja, açúcar, café, suco de laranja concentrado, fumo, papel, celulose e carnes respondem por cerca de 85% do total exportado. Dentre os produtos, o feijão-caupi é o grão mais importante da região semi-árida brasileira (NASCIMENTO et al., 2008).

Devido a grande participação do Brasil no mercado agroindustrial internacional, o país atualmente se encontra entre os maiores consumidores mundiais de agroquímicos que são utilizados para diminuição ou eliminação de doenças causadas por insetos ou micro-organismos que interferem no cultivo dos produtos agroindustriais (FARIA, 2012).

De todos os agroquímicos produzidos mundialmente, aproximadamente 19% são utilizados no Brasil. A venda destes produtos movimenta o mercado internacional, e somente em 2010 foram vendidos aproximadamente 940 mil toneladas, movimentando 7,3 bilhões de dólares (OLIVEIRA; LUCCHESI, 2013).

Os defensivos agrícolas são definidos como substâncias e agentes de processos biológicos, físicos ou químicos altamente tóxicos utilizados no controle e na mortalidade de organismos indesejáveis para melhoramento das práticas agrícolas, podendo ser bactericidas, fungicidas, inseticidas, acaricidas, herbicidas, entre outros (OLIVEIRA; LUCCHESI, 2013; SILVA et al., 2011).

O uso de produtos químicos para o controle de pragas é bastante questionado pela sua toxicidade, pois a maioria destes produtos atua em organismos alvo e não alvo, ou seja, apresenta atividade tanto para micro-organismos fitopatógenos e insetos praga como também para micro-organismos e insetos benéficos ao homem e animais (ANVISA, 2007).

Os agroquímicos podem levar risco à saúde humana, como intoxicações à exposição, além de vários distúrbios crônicos, incluindo tipos de câncer, efeitos genotóxicos, imunológicos, neurológicos, reprodutivos e teratogênicos (CREMONESE et al., 2012). Tais fatos mostram a importância em diminuir a dependência de fertilizantes químicos e a necessidade de praticar a agricultura com impactos negativos menores ou inexistentes (FIGUEIREDO et al., 2010).

A ideia da “agricultura sustentável” tem se mostrado importante nos dias atuais, pois a sua prática engloba o uso de estratégias que permitam aumentar a produção agrícola sem prejuízo ao meio ambiente e a saúde humana e animal (FIGUEIREDO et al., 2008).

A utilização de micro-organismos que atuem como promotores do crescimento vegetal e agentes de biocontrole apresenta uma opção viável de aplicação na agricultura para que ocorra diminuição da dependência do uso de defensivos agrícolas, visando uma tendência para desenvolvimento da agricultura sustentável (DASTAGER et al., 2011).

### **2.3 Rizobactérias promotoras do crescimento vegetal**

Várias espécies de micro-organismos ocorrem em diversos solos, pois é um habitat rico e complexo que disponibiliza água e nutrientes necessários para o crescimento, multiplicação e sobrevivência dos mesmos (DANTAS et al., 2009).

Em um grama de solo coexistem mais de 10 mil espécies de micro-organismos, um bilhão de bactérias, um milhão de actinobactérias e 100 mil fungos, indicando a alta diversidade metabólica existente neste habitat. Além disto, estes micro-organismos podem interagir de diferentes maneiras entre si, da mesma espécie ou não, sendo na rizosfera a maioria destas interações (BHATTACHARYYA; JHA, 2012; MENDES et al., 2011).

Lugtenberg e Kamilova (2009) alegam que a rizosfera é a parte do solo influenciada diretamente por raízes de plantas e se caracteriza como um habitat mutável, pois as plantas podem modificar as características químicas do solo perto das raízes enriquecendo o solo com uma variedade de compostos orgânicos, além de outras características, podendo assim influenciar os processos biogeoquímicos que ocorrem naturalmente no ecossistema (DANTAS et al., 2009).

Os micro-organismos que ocorrem no solo podem ser classificados em grupos de acordo com suas funções nos processos biológicos do ecossistema, tais como os micro-organismos participantes no ciclo do nitrogênio (diazotróficos, desnitrificantes, amonificantes) e os que participam do ciclo do carbono (ZILLI et al., 2003).

Dentre os micro-organismos encontrados na rizosfera, as rizobactérias tem despertado interesse entre os pesquisadores e também agricultores, uma vez que podem promover o crescimento das plantas, e são denominadas de Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCP) (ARAUJO; PEDROSO, 2013; MA et al., 2011).

As RPCP se estabelecem no solo devido a sua elevada adaptabilidade numa ampla variedade de ambientes, possuem uma taxa de crescimento rápida como também versatilidade nos processos bioquímicos em metabolizar vários compostos naturais e xenobióticos (BHATTACHARYYA; JHA, 2012).

As RPCP podem estimular o crescimento de plantas através de mecanismos como fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato inorgânico, produção de fitohormônios e sideróforos (SHAHAB et al., 2009; VASCONCELLOS et al., 2010).

A identificação das RPCP mostra que elas pertencem a diferentes filos: *Cyanobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria*. Nestes amplos grupos, bactérias dos gêneros *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, entre outros, são os agentes de biocontrole e promotores de crescimento vegetal mais avaliados e estudados atualmente (FIGUEIREDO et al., 2011; MEHNAZ et al., 2010). Com destaque para as actinobactérias que são de importância para a manutenção da dinâmica do ambiente rizosférico e, além disto, são caracterizadas como o principal grupo produtor de metabólitos secundários bioativos (FIGUEIREDO et al., 2008).

Atualmente, alguns produtos agroindustriais utilizando actinobactérias são comercializados, e entre eles podemos citar o Actinovate® (*Streptomyces lydicus* WYEC108) e Mycostop® (*Streptomyces griseoviridis* K61), que são importantes no controle biológico de fungos fitopatógenos (TIAN; ZHENG, 2013).

## **2.4 Actinobactérias: características e produção de metabólitos**

As actinobactérias são bactérias Gram positivas filamentosas que estão amplamente distribuídas na natureza, pois ocorrem frequentemente no solo, em especial na rizosfera (PROCÓPIO et al., 2012; VASCONCELLOS et al., 2010). O gênero *Streptomyces* representa aproximadamente 20% das bactérias que vivem ou colonizam o solo (JAVOID; SULTAN, 2013).

Estas bactérias filamentosas apresentam ciclo de vida saprofítico e a maioria é aeróbica, entretanto alguns gêneros são anaeróbios facultativos ou obrigatórios, como o gênero *Actinomyces* (BERNARDO, 2012).

Dentre outras características, os actinomicetos possuem alto teor de G+C (>50 %) e identificação a nível de gênero ocorre pela observação da presença de cadeias de esporos que se apresentam de formas variáveis e atualmente a amplificação do gene 16S rRNA confirma a identificação a nível de gênero (MAIER; PEPPER, 2009).

As actinobactérias produzem esporos que permitem a sobrevivência em habitats extremos conferindo proteção e eles são normalmente correlacionados com sua diversidade morfológica.

O ciclo de crescimento de algumas actinobactérias está voltado principalmente para as fases de esporulação. Após a germinação de esporos, o micélio vegetativo (substrato) cresce na superfície e interior do meio de cultura com ágar, até que se diferencia em micélio reprodutivo (aéreo) onde ocorre a formação de esporos (YAGUE et al., 2013). É na fase da formação desses esporos que são produzidos pigmentos e substâncias antimicrobianas ocorrendo a ativação do metabolismo secundário (BERNARDO, 2012).

Em relação à estrutura das hifas, Brooks et al. (2011) observaram que a formação de hifas pelas actinobactérias confere maior competitividade em relação ao crescimento de fungos ectomicorrízicos.

Na última edição do 'Bergey's Manual of Systematic Bacteriology' (WHITMAN et al., 2012) foi relatado que as actinobactérias são classificadas dentro do filo *Actinobacteria*, o qual compreende seis classes *Actinobacteria*, *Acidimicrobiia*, *Coriobacteriia*, *Nitriliruptoria*, *Rubrobacteria* e *Thermoleophilia*, além de 23 ordens, 53 famílias, 145 gêneros e centenas de espécies.

As actinobactérias possuem metabolismo extremamente rico e, frequentemente, produzem metabólitos secundários de extraordinária diversidade química, os quais atraem o interesse de diversas indústrias (SOARES et al., 2012).

Vários produtos naturais com estruturas químicas diferentes são sintetizados pelas actinobactérias, principalmente pelo gênero *Streptomyces*, o qual, produz inúmeros antibióticos e continua sendo considerado uma fonte rica de novos metabólitos bioativos (GOODFELLOW; FIEDLER, 2010). A produção da maior parte das substâncias antimicrobianas é específica de cada espécie, e esses metabólitos são importantes para as actinobactérias, pois conferem competitividade a outros micro-organismos no ambiente (PROCÓPIO et al., 2012).

O estudo com actinobactérias isoladas do bioma Caatinga visa à obtenção de produtos naturais que promovam o crescimento vegetal, pois este bioma provavelmente abriga além de micro-organismos conhecidos alguns outros desconhecidos que provavelmente tenham características interessantes e desejáveis para a prática agrícola, como a capacidade de tolerar algumas condições estressantes ambientais, como secas, e também a promoção do crescimento de plantas (KAVAMURA et al., 2012).

## **2.5 Promoção do crescimento vegetal por actinobactérias**

Dentre as RPCP, merecem destaque as actinobactérias, que podem promover o crescimento vegetal através de mecanismos diretos e indiretos. Os mecanismos diretos ocorrem quando há incorporação e disponibilização de nutrientes e/ou produção de metabólitos envolvidos no crescimento de plantas, como a solubilização de fósforo, fixação biológica de nitrogênio ( $N_2$ ), produção de fitohormônios (auxinas, giberelinas, etc) e produção de sideróforos. Em relação aos mecanismos indiretos, as actinobactérias inibem o crescimento de fitopatógenos ou micro-organismos deletérios pela produção de substâncias antimicrobianas ou por competição (HUNG et al. 2007; LINS, M., 2012; NIMNOI et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2003; SOLANS et al., 2011).

### **2.5.1 Produção de fitohormônios (Ácido 3-indolacético)**

As RPCP podem promover o crescimento de plantas através da produção de fitohormônios, como o grupo das auxinas, citocininas e giberelinas (ARUN et al., 2012; KUMAR et al., 2012). Dentre os vários mecanismos possíveis, o mais amplamente utilizado por estas bactérias é a produção de auxinas (SOLANS et al., 2011).

É bem conhecido que RPCP como *Agrobacterium* spp., *Azospirillum* spp., *Bradyrhizobium* spp., *Pseudomonas* spp. e *Streptomyces* spp., sintetizam auxinas, principalmente o AIA além de outras auxinas como o ácido indol-3-pirúvico ou ácido indol-3-butírico (IBA), ácido 4-cloro-indol-3-acético (4-Cl-IAA), entre outras (LIN; XU, 2013; LINS, M., 2012).

Zakharova et. al (1999) avaliaram que cerca de 80% das bactérias isoladas da rizosfera produzem AIA. Destacam-se várias espécies de *Streptomyces*, como *S. olivaceoviridis*, *S. rimosus* e *S. rochei* isoladas da rizosfera do tomateiro que produzem AIA e promovem o crescimento da planta investigadas no estudo de El-Tarabily (2008).

O ácido 3-indolacético (AIA) é o principal fitohormônio do grupo das auxinas que tem por função o controle de mecanismos fisiológicos importantes, como o processo da divisão e alongamento celular e nas diferenciações dos tecidos nas plantas. O AIA produzido pelas actinobactérias presentes na rizosfera agem em conjunto com o AIA endógeno das plantas estimulando a proliferação e o alongamento celular (SHOKRI; EMTIAZI, 2010).

Os micro-organismos possuem quatro principais rotas para síntese de AIA a partir do triptofano (mecanismos triptofano-dependentes) e outra rota que é independente deste aminoácido (HERNÁNDEZ-MENDOZA et al., 2008). As vias dependentes são classificadas de acordo com seus compostos intermediários, como indol-3-acetaldoxima (IAOx), triptamina (TAM), ácido indol-3-pirúvico (IpyA) e indol-3-acetamida (IAM) (LEHMANN et al., 2010).

Dentre as rotas dependentes do triptofano, a via do indol-3-acetamida (IAM) ocorre inicialmente quando o triptofano é convertido para indol-3-acetamida pela enzima ‘tryptophan-2-monooxygenase’ (EC 1.13.12.3), que é codificada pelo gene *IaaM*, seguido pela conversão de IAM em AIA pela enzima indol-3-acetamida hidrolase (codificada pelo gene *IaaH*). Estes genes *iaaM* e *iaaH* são normalmente organizados em pequeno operon e são altamente conservados entre diferentes espécies bacterianas (CAMERINI et al., 2008; LIN; XU, 2013; TSAVKELOVA et al., 2012).

A biossíntese de AIA num meio de cultura líquido depende também da aeração e da fonte de nitrogênio utilizada, sendo importante a otimização destas condições para obtenção de uma maior produção de ácido 3-indolacético (MERZAEVA; SHIROKIKH, 2010).

### **2.5.2 Solubilização de fosfato inorgânico**

O fósforo (P) é o segundo nutriente essencial para o desenvolvimento das plantas, sendo o principal elemento de compostos químicos vitais aos organismos, como nucleotídeo, lecitinas, entre outros. Além disso, é o mineral limitante para a produção de biomassa nos ecossistemas (CERIGIOLI, 2005; HAMEEDA et al., 2008; HAYAT et al., 2010).

A maior parte do fosfato que ocorre no solo está na forma orgânica e é amplamente distribuído na natureza, porém inviável para ser absorvido pelas plantas. Apenas pequenas concentrações do fósforo total no solo estão disponíveis (SARKAR et al., 2012).

De acordo com Sousa (2010), a dinâmica do fósforo no solo é complexa, em decorrência da fixação de P, uma vez que este composto apresenta grande afinidade com o cálcio, ferro e alumínio.

As bactérias solubilizadoras de fosfato participam ativamente do ciclo do fósforo no habitat solo, aumentando assim a biodisponibilidade do fósforo para absorção pelas plantas (MARDAD et al., 2013). Alguns trabalhos têm relatado o isolamento de actinobactérias que solubilizam o fosfato, como relatado por Barreto (2007), no qual 84,6% das actinobactérias isoladas da rizosfera do cacauzeiro promoveram a solubilização deste composto.

Estes micro-organismos utilizam mecanismos diferentes para converter formas insolúveis do fosfato em solúveis, através da atividade de enzimas como as fosfatases ou fosfohidrolases, com processos de acidificação, quelação, reações de troca, mas normalmente o mecanismo principal de solubilização é a liberação de metabólitos como os ácidos orgânicos (HAMEEDA et al., 2008; YOUNG et al., 2013).

Para disponibilização do P precipitado junto ao cálcio, por exemplo, micro-organismos solubilizadores de fosfato inorgânico acidificam naturalmente a rizosfera por meio da liberação de  $H^+$  e ácidos orgânicos (SOUSA, 2010).

As fosfatases podem ser secretadas fora da membrana plasmática dos micro-organismos ou permanecem retidas na membrana como proteínas solúveis (OLIVEIRA et al., 2003).

Este mecanismo de solubilização de fosfato utilizado pelos micro-organismos favorece o crescimento vegetal facilitando assim o desenvolvimento vegetal pela disponibilização deste macronutriente indispensável à planta.

### **2.5.3 Produção de substâncias antimicrobianas**

O controle biológico de fitopatógenos por micro-organismos tem se tornado uma opção alternativa para aplicação na agricultura, pois eles não causam danos ao ambiente e a saúde humana.

As actinobactérias tem se mostrado excelentes produtoras de substâncias antimicrobianas contra micro-organismos fitopatógenos e também contra nematoides (RUANPANUN et al., 2010).

Mais de 22 mil compostos biologicamente ativos foram obtidos a partir de micro-organismos até o final de 2002 (QIN et al., 2011). Dentre estes, 45% foram produzidos por actinobactérias, notadamente pelo gênero *Streptomyces*. Os representantes mais conhecidos são *Streptomyces griseus* (produtor de estreptomicina), *Streptomyces aureofaciens* (clorotetraciclina), *Streptomyces rimosus* (terramicina), entre outros (BATISTA et al., 2010).



Segundo Rodríguez (2008), os fungicidas geralmente são mais aplicados no campo visando à eliminação de fitopatógenos, como os benzimidazóis, acilalaninas, imidazóis, polioxinas, nikomicinas, entre outros. Atualmente há uma necessidade de se encontrar novos compostos antimicrobianos que promovam o controle biológico de pragas e fitopatógenos para não haver impactos negativos ao ambiente e além disto em decorrência do aumento dos casos de resistência aos antimicrobianos utilizados normalmente.

#### **2.5.4 Importância das actinobactérias no ciclo do nitrogênio (N<sub>2</sub>)**

O nitrogênio é o quinto elemento mais abundante no planeta sendo essencial aos organismos para síntese de bases nitrogenadas, ácidos nucleicos, proteínas, aminoácidos, entre outros (CANFIELD et al., 2010).

Entretanto, o N<sub>2</sub> é praticamente inerte, ou seja, é impossível a sua assimilação ou absorção pelas plantas. Portanto, o nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e o amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), formas iônicas do nitrogênio, são absorvidos facilmente, sendo essenciais nos ecossistemas (CANFIELD et al., 2010). Segundo Di et al. (2009), a oxidação da amônia em nitrato (nitrificação) é um processo chave na biogeoquímica do nitrogênio.

O ciclo do nitrogênio é complexo em vários aspectos, constituído por um conjunto diversificado de transformações, muitas das quais são realizadas apenas por alguns grupos de micro-organismos. O ciclo biogeoquímico do nitrogênio é quase totalmente dependente de reações de oxi-redução mediada pelos micro-organismos (THAMDRUP, 2012).

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) é realizada através de um sistema enzimático adequado. A enzima nitrogenase promove a reação da quebra dos átomos de nitrogênio à temperatura ambiente, utilizando os processos fotossintéticos ou quimiossintéticos, ou obtida a partir de carboidratos e armazenada sob a forma de ATP (FIGUEIREDO et al., 2008).

Para que ocorra a FBN é necessária à expressão de um conjunto de genes *nif* (20 genes) que codificam proteínas envolvidas diretamente nestes processos (SERAFINI et al., 2002).

De acordo com Serafini et al. (2002), a incorporação do nitrogênio pela FBN tem sido aplicada em vários países e isto representa uma economia na utilização de energia fóssil que seria empregada na produção de fertilizantes nitrogenados necessários para atender à agricultura mundial.

### 3) OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Selecionar linhagens de actinobactérias previamente isoladas da rizosfera de plantas da Caatinga (*Melocactus* sp., Pereiro e *Terminalia fagifolia*) capazes de produzir substâncias promotoras de crescimento vegetal.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a produção do ácido 3-indolacético qualitativa e quantitativamente;
- Avaliar a solubilização de fosfato em diferentes condições de forma semi-quantitativa;
- Detectar qualitativamente a produção de fosfatases;
- Avaliar a produção de amônia (NH<sub>3</sub>) qualitativa e quantitativamente;
- Avaliar a atividade antimicrobiana frente a bactérias e fungos fitopatógenos;
- Selecionar através de teste estatísticos duas linhagens que apresentem mecanismos com maior potencial em promover crescimento vegetal;
- Extrair e identificar o ácido 3-indolacético por análises cromatográficas;
- Realizar identificação das linhagens de actinobactérias com potencial biotecnológico;

#### 4) MATERIAIS E MÉTODOS

##### 4.1 Micro-organismos

Foram utilizadas 80 linhagens de actinobactérias isoladas de diferentes amostras das rizosferas de plantas da Caatinga (01/2009 PAC-EMBRAPA) pertencentes à Coleção de Cultura de Microrganismos (UFPEDA) do Departamento de Antibióticos. As linhagens foram selecionadas aleatoriamente de três diferentes rizosferas: 59 isolados da rizosfera da *Aspidosperma pyrifolium* ou Pereiro (PR), 15 da rizosfera da *Terminalia fagifolia* ou Capitão-do seco (TUR) e seis do *Melocactus* sp. ou Coroa-de-frade (MCR) (Tabela 4.1).

**Tabela 4.1** – Relação das linhagens de actinobactérias isoladas da rizosfera de plantas da Caatinga: Pereiro (PR), Capitão-do seco (TUR) e Coroa-de-frade (MCR).

Linhagens de Actinobactérias			
PR 01	PR 34	PR 82	MCR 28
PR 02	PR 35	PR 84	MCR 29
PR 03	PR 36	PR 86	MCR 39
PR 04	PR 37	PR 87	MCR 40
PR 05	PR 38	PR 88A	MCR 716
PR 09	PR 39	PR88B	TUR 02
PR 12	PR 45	PR 89	TUR 05
PR 14	PR 46	PR 90	TUR 10
PR 15	PR 53	PR 91	TUR 11
PR 17	PR 55B	PR 92	TUR 13
PR 19	PR 61	PR 93	TUR 17
PR 20	PR 63	PR 94	TUR 81
PR 22	PR 66	PR 95	TUR 326
PR 23	PR 67	PR 96	TUR 327
PR 25	PR 68	PR 97	TUR 495
PR 26	PR 71	PR 97B	TUR 701
PR 27	PR 76	PR 98	TUR 703
PR 29	PR 78	PR 99	TUR 704
PR 32	PR 79	PR 100	TUR 716
PR 33	PR 80	MCR 25	TUR 742

##### 4.2 Agrupamento das actinobactérias pela macromorfologia

As linhagens selecionadas estavam preservadas em óleo mineral no Laboratório de Coleção de Culturas de Microrganismos UFPEDA.

As actinobactérias foram transferidas para tubos de ensaio contendo cinco mililitros (mL) de meio ISP-2 líquido (Anexo A) e cultivadas sob agitação 200 rpm por cinco dias a 37°C. Após esse período, alçadas dos cultivos foram semeadas por esgotamento em placas de Petri contendo 15 mL dos meio ISP-2 (Anexo B), 15 mL de meio ISP-3 (Anexo C) e também 15 mL do meio ISP-5 (Anexo D) para observação das características macroscópicas das colônias e avaliação do melhor meio de cultivo para um bom crescimento do micélio aéreo. As placas foram cultivadas por cinco a dez dias a 37°C.

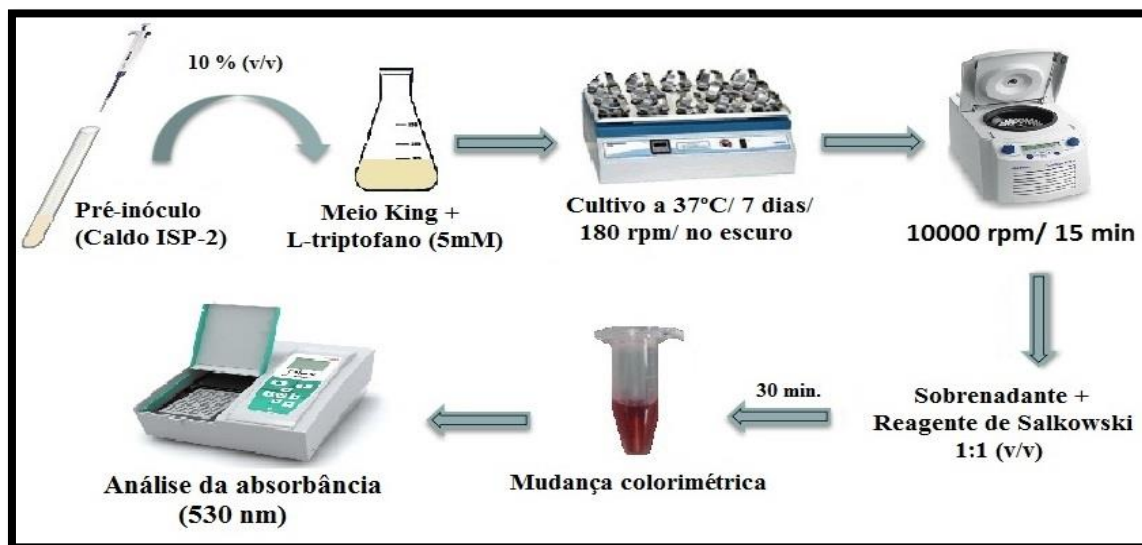
### **4.3 Mecanismos para promoção de crescimento vegetal por micro-organismos**

#### **4.3.1 Produção de ácido 3-indolacético (AIA)**

A produção de ácido 3-indolacético foi determinada através do método de Glickmann e Dessaux (1995) com algumas modificações.

Os isolados foram inicialmente inoculados em tubos de ensaio contendo cinco mililitros (mL) de meio King B (Anexo E) e cultivados a 37°C por 48 horas sob agitação 180 rpm. Após o cultivo, 10% (v/v) do pré-inóculo foram transferidos para outros tubos contendo cinco mililitros do meio King B suplementado com L-triptofano (5,0 mmol.L<sup>-1</sup>) e cultivados a 37°C por sete dias sob agitação 180 rpm, com ausência de luz. Em seguida, todas as amostras foram centrifugadas em microtubos e ao sobrenadante foi adicionado o reagente de Salkowski (Anexo F) na proporção de 1:1 (v/v). As amostras foram mantidas no escuro durante 30 minutos e em seguida foi realizada a leitura qualitativa pela observação da mudança de coloração do amarelo para rosa-avermelhado. Foi realizada a análise quantitativa da produção do AIA e as concentrações foram quantificadas pela análise da absorbância num leitor de elisa a 530 nm. Foi construída uma curva-padrão em concentrações conhecidas de AIA comercial (Vetec): 1,25; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0; 80,0 µg.mL<sup>-1</sup>. Todas as dosagens foram realizadas em triplicata. Como controle positivo, foi utilizada a linhagem *Pantoea agglomerans* UFPEDA 774, e como controle negativo, apenas o meio de cultura suplementado com L-triptofano na mesma concentração sem crescimento microbiano (Figura 4.1).

**Figura 4.1** - Esquema para avaliação qualitativa e quantitativa da produção de ácido 3-indolacético (AIA).



#### 4.3.2 Avaliação da solubilização de fosfato em meios sólidos NBRIP e VERMA

A avaliação da solubilização de fosfato em meio sólido foi realizada segundo metodologia descrita por Verma et al. (2001) e Kumar et al. (2012).

As actinobactérias foram semeadas em forma de ‘tapete’ com auxílio da alça de Drigalski em meio apropriado para crescimento do micélio aéreo e foram cultivadas por cinco dias a 37°C. Em seguida, blocos de gelose das actinobactérias foram transferidos para placas de Petri contendo 15 mL dos meios sólidos VERMA (Anexo G) e NBRIP (Anexo H). As placas foram cultivadas por 10 dias a 37°C. A positividade da solubilização do fosfato pelas linhagens foi detectada por halos esbranquiçados ao redor das colônias. O Índice de Solubilização (IS) foi avaliado segundo Sarkar et al. (2012) o qual foi calculado pela razão entre o diâmetro do halo de solubilização pelo diâmetro da colônia em mm. Os experimentos foram realizados em triplicata e a linhagem *P. agglomerans* UFPEDA 774 foi utilizada como controle positivo (Figura 4.2).

**Figura 4.2** - Esquema da solubilização de fosfato em meio sólido.



#### 4.3.3 Detecção da produção de fosfatases

A produção de fosfatases pelas actinobactérias foi observada por meio da metodologia de Ribeiro e Cardoso (2012) com pequenas modificações.

Os isolados foram semeados em forma de 'tapete' em meio apropriado para crescimento do micélio aéreo (conforme item 4.3.2) e cultivados por cinco dias a 37 °C. Blocos de gelose de cada actinobactéria foram transferidos para placas de Petri contendo 15 mL de meio ISP-2 suplementado com solução a 0,5% de difosfato de fenoltaleína (Anexo I). Após cultivo, a revelação foi realizada adicionando-se gotas da solução de hidróxido de amônio (8,4%) nas tampas das placas de Petri invertidas. Após 15 minutos de reação, foi observado se as linhagens produziram fosfatases pela formação de uma zona rosa ao redor das colônias. Os experimentos foram realizados em triplicata (Figura 4.3).

**Figura 4.3** - Esquema para avaliação qualitativa da produção de fosfatases em meio de cultura sólido.

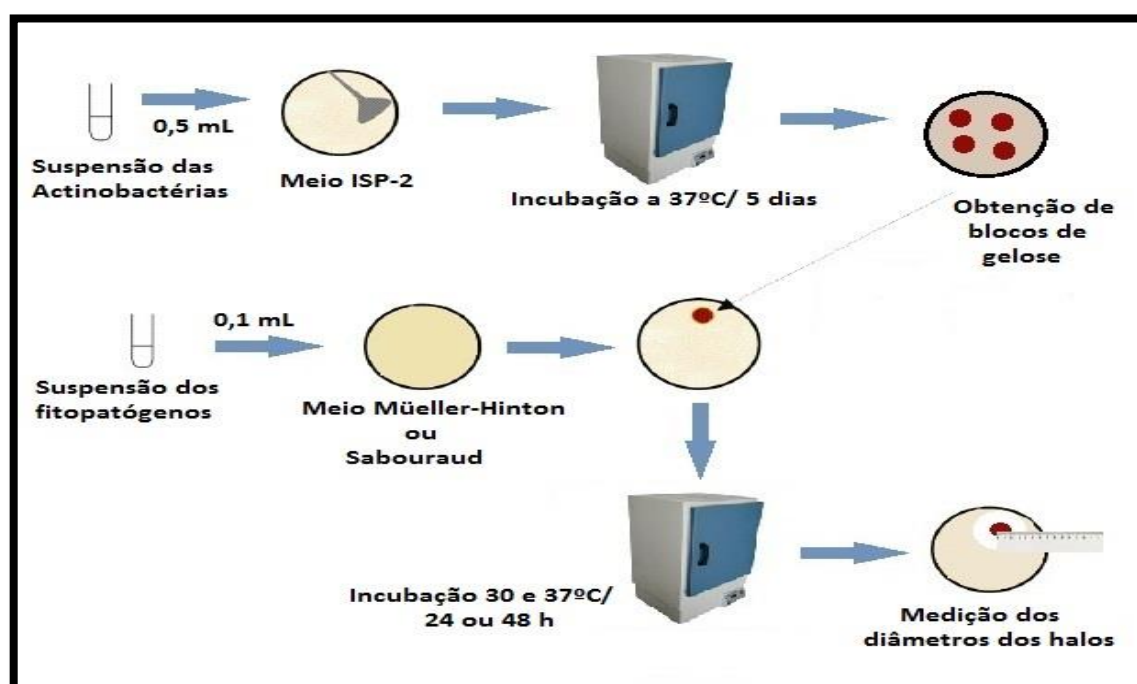


#### 4.3.4 Atividade antimicrobiana para micro-organismos fitopatógenos

A atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos fitopatógenos foi realizada através de teste primário de difusão em ágar utilizando blocos de gelose.

Inicialmente, cada actinobactéria foi semeada em forma de ‘tapete’ (conforme item 4.3.2) em placa de Petri contendo 15 mL de meio ISP-2 e cultivada por cinco dias a 37°C. Após este período, blocos de gelose de cada linhagem foram transferidos para placas de Petri semeadas previamente com o micro-organismo teste numa concentração de células padronizada,  $10^6$  UFC/mL para os fungos fitopatógenos (através da contagem de esporo pela câmara de Neubauer) e  $10^8$  UFC/mL para as bactérias (análise da densidade óptica num comprimento de onda de 625 nm) segundo a CLSI (2008). Os fungos testados foram *Colletotrichum* sp. UFPEDA 2419 e *Fusarium oxysporum* UFPEDA 2455, os quais foram semeados em 10 mL de meio Sabouraud Agar (Anexo J) e cultivados por até 72 horas a 30 °C. As bactérias fitopatógenas utilizadas foram *Xanthomonas campestris* UFPEDA 407 e *Erwinia carotovora* UFPEDA 106, as quais foram semeadas em 10 mL de meio sólido Müller-Hinton (Anexo K) e cultivados por 24 horas a 37 °C. Após o cultivo, foi observado a atividade antimicrobiana pela formação de halos de inibição que foram medidos em mm. Cada experimento foi realizado em triplicata e a média aritmética foi calculada (Figura 4.4).

**Figura 4.4** – Esquema do teste em bloco de gelose das actinobactérias para micro-organismos fitopatógenos.

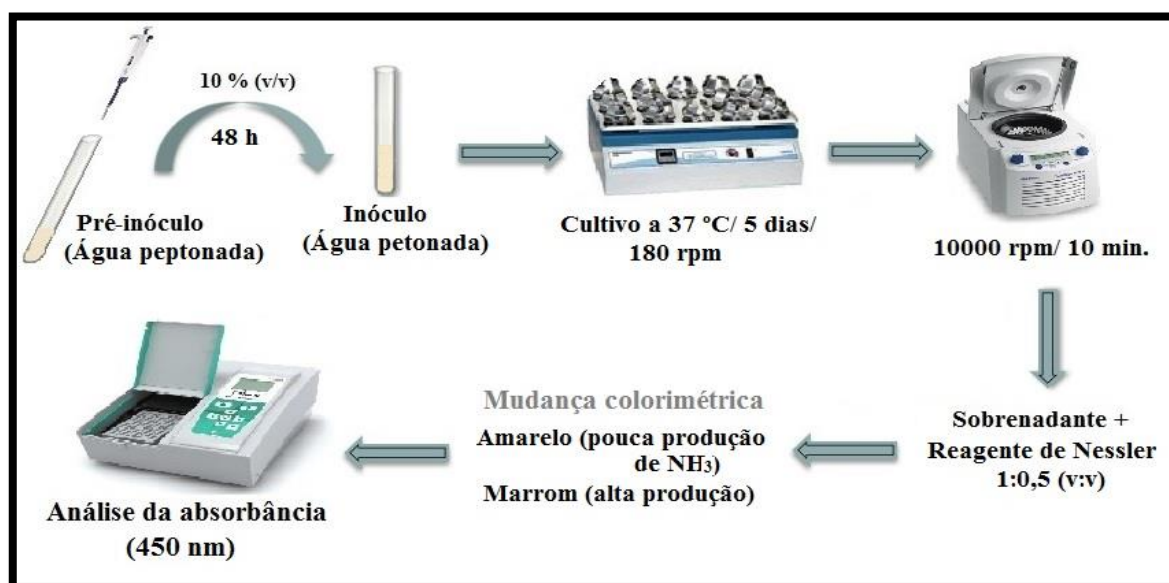


### 4.3.5 Avaliação da produção de amônia (NH<sub>3</sub>)

A avaliação da produção de amônia pelas actinobactérias foi realizada segundo a metodologia descrita por Kavamura et al. (2012). Inicialmente, foram realizados pré-inóculos de cada linhagem em tubos contendo cinco mililitros de água peptonada e cultivadas sob agitação de 180 rpm por 48 horas a 37°C. Após o cultivo, 10% (v/v) de cada pré-inóculo foi transferido para outro tubo contendo cinco mililitros de água peptonada e cultivados nas mesmas condições anteriormente citadas. As amostras foram centrifugadas e ao sobrenadante foi adicionado o reagente de Nessler (Anexo L) na proporção de 1,0:0,5 (v/v). O desenvolvimento de cor amarela claro indicou baixa produção de amônia e uma coloração amarronzada indicou uma alta produção.

Para quantificação da amônia produzida foi realizada uma curva-padrão com sulfato de amônio [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] nas concentrações de 1,25; 2,5; 5,0; 10, 20, 40, 80, 160 e 240 µg.mL<sup>-1</sup> (Figura 4.5). Todas as dosagens foram realizadas em triplicata.

**Figura 4.5** - Esquema para avaliação da produção de amônia (NH<sub>3</sub>).



### 4.4 Testes estatísticos para seleção de linhagens com maior potencial em promover o crescimento vegetal

A análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) foram realizados de acordo com Bluman (2001) no programa Excel 2010 e Minitab versão 15. Os



testes estatísticos em relação à produção de AIA, amônia e solubilização de fosfato nos dois meios VERMA e NBRIP foram realizados visando à seleção de duas linhagens com maior potencial em promover o crescimento vegetal por estes mecanismos e que serão testadas quanto à promoção do crescimento vegetal em futuros trabalhos. Os resultados foram transformados para forma de percentual para que as unidades não influenciassem nas análises.

Também foi realizada análise de variância das médias dos resultados obtidos na solubilização de fosfato de todas as actinobactérias visando avaliar qual dos meios, VERMA ou NBRIP, proporcionou melhores condições para a solubilização como também o melhor Índice de Solubilização (IS).

#### **4.5 Identificação do ácido 3-indolacético por análises cromatográficas**

##### **4.5.1 Extração líquido-líquido para obtenção do extrato bruto**

A linhagem selecionada com maior potencial para o crescimento de plantas foi utilizada para a extração do AIA conforme descrito por Loper e Schroth (1986).

A actinobactéria foi cultivada em 10 frascos erlenmeyer de 50 mL contendo 10 mL de meio King B e cultivados a 37°C por 48 horas sob agitação 180 rpm, na ausência de luz. Após o cultivo, 10% (v/v) do pré-inóculo foram transferidos para outros 10 frascos erlenmeyer de 500mL contendo 100 mL de meio King B suplementado com L-triptofano (5,0 mmol.L<sup>-1</sup>) e cultivados por sete dias sob as mesmas condições anteriormente citadas. Após cultivo, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 6360  $\times$ g e o pH do líquido metabólico foi ajustado para 3,0. Em seguida, o líquido metabólico foi submetido a extração do AIA com acetato de etila (P.A.) na proporção de 2:1 (v/v) por três vezes. Os frascos foram agitados vigorosamente durante uma hora e em seguida a fase orgânica (extrato de acetato de etila) foi separada e rotaevaporada a temperatura de 40 °C. O extrato obtido foi pesado e mantido em dessecador.

##### **4.5.2 Cromatografia em camada delgada (TLC) do extrato bruto**

A cromatografia foi realizada de acordo com Tsavkelova et al. (2012) com em placas de Silica gel 60 F<sub>254</sub> utilizando o extrato bruto de acetato de etila solubilizado em 30  $\mu$ L de metanol (P.A.) e o ácido 3-indolacético comercial (Vetec) como padrão. Em seguida, as amostras foram aplicadas na placa a 10 mm da parte inferior e no mesmo plano horizontal. A fase móvel utilizada foi acetato de etila: isopropanol: amônia (45:35:20). Após a corrida e

secagem, a placa cromatográfica foi revelada com reagente de Ehrlich e reagente de Salkowski na proporção de 1:3 (v/v). Em seguida, foi aquecida a 90 °C até as bandas serem visualizadas. O R<sub>f</sub> ou índice de retenção da amostra e do padrão foram calculados caracterização do perfil cromatográfico da amostra.

#### **4.5.3 Partição do extrato bruto**

O extrato bruto de acetato de etila foi particionado de acordo com Santos (2012) em quatro frações utilizando os solventes hexano (P.A.), clorofórmio (P.A.), acetato de etila (P.A.) e água Milli-Q para retirada de possíveis impurezas presentes e semipurificação do ácido 3-indolacético no extrato bruto. Inicialmente o extrato foi ressuspenso em 10 mL de metanol e água [9:1 (v/v)], colocado num funil de separação e adicionado 7,5 mL de hexano P.A. (3x), seguido de agitação e separação da fração hexânica que foi tratada com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e concentrada em rotaevaporador. Na fração aquosa remanescente foi adicionada 2,83 mL de água Milli-Q e 3,75 mL de clorofórmio (P.A.), seguida de agitação e separação da fração do clorofórmio que foi tratada com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e rotaevaporada. A fração aquosa remanescente foi rotaevaporada para eliminação de metanol residual e adicionado 7 mL de acetato de etila P.A. (3x). Em seguida, a fração de acetato de etila foi tratada com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e rotaevaporada. As frações foram aplicadas em placas de sílica de TLC para observar em qual delas o ácido 3-indolacético estava presente.

#### **4.5.4 Cromatografia em coluna com sílica**

A fração tratada com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro foi submetida para purificação do AIA utilizando coluna de vidro com a fase estacionária de sílica gel (Macherey-Nagel 0,063-0,2 mm) sendo a quantidade da sílica utilizada 20x o peso do extrato (<1000 mg). A fase móvel foi em ordem crescente de polaridade iniciando com hexano 100%, hexano:acetato de etila (75:25%), hexano:acetato de etila (50:50%), acetato de etila (100%) e acetato de etila:metanol (85:15). As frações obtidas foram concentradas em rotaevaporador e aplicadas em placa de TLC com indicador F-254 (Silicycle) visualizada por UV (254 e 366 nm) e a fase móvel utilizada foi acetato de etila:hexano:metanol [85:10:5 (v/v/v)].

#### **4.5.5 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)**

Após cromatografia em coluna a fração contendo o ácido 3-indolacético foi solubilizada em 750  $\mu\text{L}$  da fase móvel e aproximadamente 500  $\mu\text{L}$  foram transferidos para os frascos de cor âmbar específicos para análise em HPLC (Hewlett Packard) (TSAVKELOVA et al., 2012). Foi utilizada coluna de fase reversa C18 (25 cm X 4,6 mm, 5 $\mu\text{m}$ ) da 'Beckman Ultrasphere' e o sistema móvel foi metanol e água Milli-Q [20:80% (v/v)] previamente filtrados com membranas 0,22  $\mu\text{m}$  com fluxo de 1 mL.minuto<sup>-1</sup>, temperatura de 30°C e pressão em torno de 159 bar. O detector foi UV a 280 nm (Hewlett Packard 1100) para determinação da área dos picos. Para quantificação do AIA presente na fração obtida foi necessária a realização de uma curva-padrão com ácido 3-indolacético (Vetec): 150,0; 75,0; 38,0; 19,0; 9,4; 4,7; 2,3  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

#### **4.6 Identificação das actinobactérias da rizosfera de plantas da Caatinga**

##### **4.6.1 Identificação a nível de gênero pela técnica de microcultivo**

A análise da micromorfologia foi por microscopia óptica segundo Shirling e Gottlieb (1966) para identificação a nível de gênero das actinobactérias. As linhagens foram semeadas em estrias largas e, em seguida, lamínulas foram inseridas num ângulo de 45°. As placas foram cultivadas a 37°C por 10 a 15 dias. Após o cultivo, a observação da micromorfologia foi realizada no microscópio óptico na objetiva de 40x.

##### **4.6.3 Identificação molecular pelo sequenciamento do gene 16S rRNA**

###### **4.6.3.1 Extração de DNA total**

A extração de DNA foi realizada a partir do cultivo em meio líquido ISP-2 por 18 a 20 horas a 37°C com agitação de 150 rpm, seguindo a metodologia de Sambrook et al. (1989). Alíquotas de cada cultura foram centrifugadas para obtenção da biomassa que foi tratada com 1,5 mL de tampão TAS (Anexo M) e centrifugada a 9168  $\times g$  por 3 min. A biomassa foi novamente ressuspensa em 0,5 mL de TAS adicionado de 150  $\mu\text{L}$  de lisozima (10 mg.mL<sup>-1</sup>) e colocadas em banho-maria a 37°C por 60 min. Em seguida, foram adicionados 400  $\mu\text{L}$  de clorofil (Anexo N) em cada amostra e os microtubos foram agitados e centrifugados a 9168  $\times g$

por 3 min. Foi retirado aproximadamente 600  $\mu\text{L}$  do sobrenadante e transferidos para outros microtubos devidamente marcados. A cada sobrenadante foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de acetato de potássio ( $7,5 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 5,2) e 600  $\mu\text{L}$  de isopropanol (P.A.) e em seguida as amostras foram colocadas no congelador por 2 horas para precipitação do DNA. Após este procedimento, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a  $6360 \times g$  e os sobrenadantes descartados. Foi adicionado 400  $\mu\text{L}$  de etanol (70%) aos pellets e centrifugados por 3 min a  $9168 \times g$ . O sobrenadante foi descartado e após secagem do pellet foram adicionados 50-100  $\mu\text{L}$  de tampão TE (Anexo O) sendo posteriormente colocados em banho-maria por 60 min a  $65^\circ\text{C}$ .

A integridade do DNA foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,8% utilizando 1  $\mu\text{L}$  de tampão de amostra, 1,5  $\mu\text{L}$  do sybr e 3  $\mu\text{L}$  das amostras de DNA.

#### **4.6.3.2 Reação de amplificação do DNA**

As reações de amplificação e sequenciamento foram realizadas na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) em Jaguariúna-SP e Macrogen (Coreia).

A amplificação foi realizada por meio da técnica de PCR utilizando oligonucleotídeos universais para Eubacteria 27F (5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3') e 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT-3') (HEUER; SMALA, 1997). A reação foi composta por um microlitro do DNA (em torno de  $50 \text{ ng.mL}^{-1}$ ), 2  $\mu\text{L}$  dNTPs (2,5 mM), 0,15  $\mu\text{L}$  primer 27F (100mM), 0,15  $\mu\text{L}$  primer 1492R (100mM), 1,5  $\mu\text{L}$  da solução de  $\text{MgCl}_2$  (50mM), 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão (Buffer 10X), 0,8  $\mu\text{L}$  DMSO (P.A.), 0,35  $\mu\text{L}$  Taq DNA Polymerase e 16,55  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q com volume final de 25  $\mu\text{L}$  para a reação. As condições do termociclador foram desnaturação inicial  $94^\circ\text{C}$  por quatro minutos, 35 ciclos de desnaturação a  $94^\circ\text{C}$  por um minuto, anelamento a  $55^\circ\text{C}$  por um minuto, extensão a  $72^\circ\text{C}$  por dois minutos e extensão final a  $72^\circ\text{C}$  por 10 minutos (KIM et al., 1996).

A amplificação do DNA foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose a 2,0%, utilizando 5  $\mu\text{L}$  de tampão LB + gel red (4:1) e 4  $\mu\text{L}$  das amostras de DNA amplificado.

#### **4.6.3.3 Purificação do DNA e reações de sequenciamento**

As amostras foram purificadas utilizando as enzimas: 'Exonuclease 1' (um microlitro) e 'Thermosensitive Alkaline Phosphatase' (um microlitro) para 5  $\mu\text{L}$  do produto de PCR e

assim foram colocadas no termociclador por 30 min a 37°C seguido por 15 minutos a 80°C para completar a purificação conforme instruções do fabricante.

Após a purificação, foram realizadas as reações de sequenciamento utilizando cinco primers listados na tabela 4.2. A reação obtinha 1 µL do DNA purificado, 0,08 µL de cada primer por reação, 3,5 µL de tampão 'save money', 1 µL de 'Big dye', 0,8 µL de DMSO e 13,62 µL de água Milli-Q com volume final de 20 µL.

**Tabela 4.2** - Listagem dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de sequenciamento do gene 16S rRNA das actinobactérias da Caatinga.

Primers	Sequências (5'-3')	Referências
27F	GAG TTT GAT CCT GGC TCA G	Heuer e Smala (1997)
Act-S20F	CGC GGC CTA TCA GCT TGT TG	Stach et al. (2003)
692F	AAT TCC TGG TGA GCG GT	-
Act-A19R	CCG TAC TCC CCA GGC GGG G	Stach et al. (2003)
1492R	TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT	Heuer e Smala (1997)

A precipitação do DNA foi realizada após as reações de sequenciamento pela adição de 2 µL de EDTA (125 mM), 2 µL de acetato de sódio (3 M) e 50 µL de etanol (P.A.) em cada amostra e cultivadas a temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente, foram centrifugadas a 3000  $\times$ g por 30 minutos e o sobrenadante foi descartado por inversão. Adicionou-se 70 µL de etanol 70% e novamente as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 1800  $\times$ g/ 4 °C. As amostras foram secadas e adicionado 10 µL de formamida para serem submetidas ao sequenciador automático ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems).

#### 4.6.3.4 Alinhamento e análise das sequencias

As sequencias obtidas do gene 16S rRNA das actinobactérias foram alinhadas utilizando os softwares Bioedit e Finch TV.

Após alinhamento, as sequencias foram comparadas com todas as sequencias no Genbank, utilizando o software Blast do National Center for Biotechnology Information (NCBI) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) e também foi utilizado o EzTaxon (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>) (KIM et al., 2012) para avaliar a similaridade com outras sequencias

conhecidas além disto arquivar todos os dados obtidos como número de pares de bases, similaridade, entre outros.

A construção da árvore foi realizada utilizando o MEGA 5.0 software (TAMURA et al., 2011), após alinhamento com o Clustal W, e a árvore foi avaliada pelo método de ‘*Neighbor-Joining*’ (SAITOU; NEI, 1987), modelo Jukes e Cantor (1969) e análise de bootstrap com 1000 repetições (FELSENSTEIN, 1985). Foram incluídos na árvore três anti-grupos dos gêneros *Bacillus* e *Nocardia* além da linhagem *Streptomyces albus* ATCC 21838 para observação do distanciamento genético em relação às actinobactérias da Caatinga.

## 5) RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Agrupamento das actinobactérias pela macromorfologia

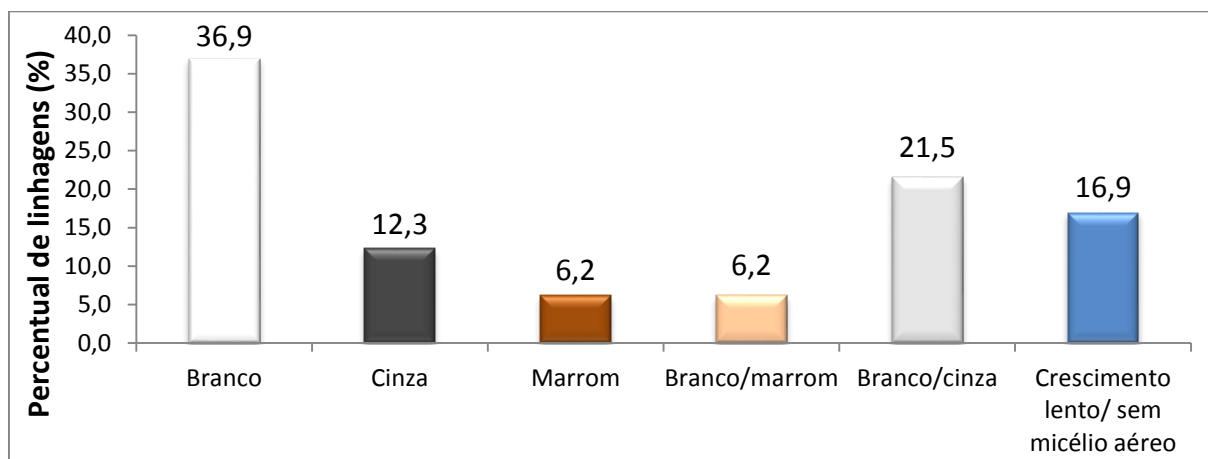
De acordo com Rajkumar et al. (2012), as características dos micélios aéreos das actinobactérias são consideradas um fator importante para identificação a nível de gênero das linhagens. Por isto a importância de se utilizar meios de cultura com componentes e fontes de carbono diferentes para se observar as características de cada actinobactéria nos meios de cultura utilizados neste estudo.

As 80 actinobactérias preservadas em óleo mineral foram reativadas em três diferentes meios de cultura e todas apresentaram crescimento em pelo menos um dos meios de culturas sólidos utilizados citados anteriormente no item 4.2.

Após o cultivo de cinco dias a 37°C nos meios sólidos, foi possível observar que o meio ISP-5 não foi eficiente para o crescimento de 97% (78) das actinobactérias, uma vez que não apresentaram micélio aéreo, e apenas 3,0% (2) das linhagens mostraram fraco crescimento.

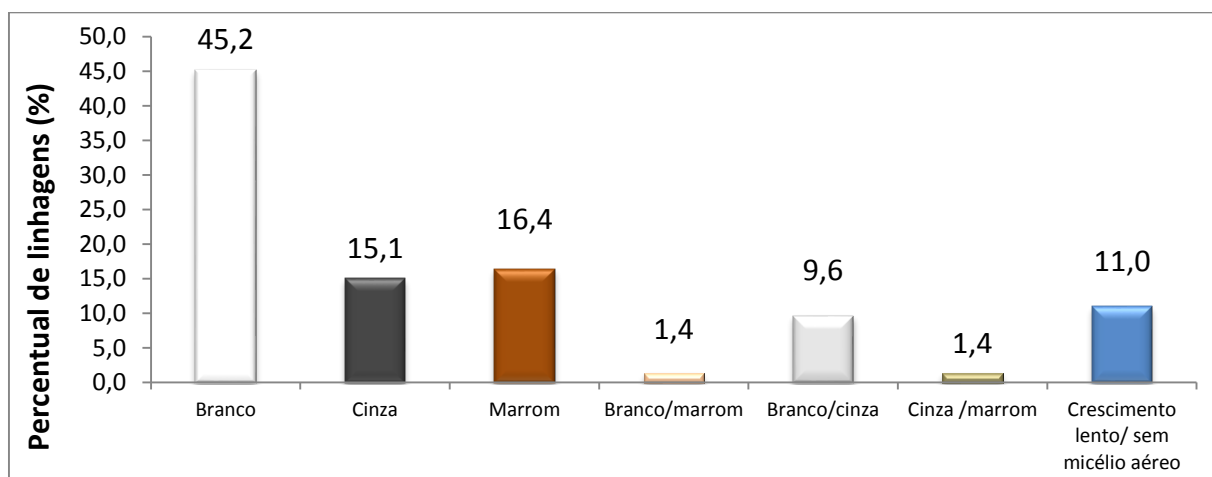
Os resultados apresentados na figura 5.1 mostram que no meio ISP-2, 36,9% (30) das actinobactérias apresentaram micélio com coloração branca enquanto 21,5% (17) apresentaram micélio aéreo na cor branca/cinza. Entretanto, em 16,9% (14) não foi possível observar o desenvolvimento do micélio aéreo, pois as linhagens cresceram lentamente. Foi possível avaliar também que neste meio de cultura, 6,25% (5) das linhagens produziram pigmentos marrons.

**Figura 5.1** - Percentual de actinobactérias que apresentaram diferentes colorações do micélio aéreo no meio ISP-2.



No meio ISP-3, foi observado que 45,2% (36) das actinobactérias apresentam micélio de coloração branca e 16,4% (13) das linhagens apresentam micélio aéreo na cor marrom. Apenas em 11,0% (9) não foi possível observar a formação de micélio aéreo. Além disto, 2,5% (2) das linhagens produziram pigmento escuro ou amarelado (Figura 5.2).

**Figura 5.2** - Percentual de actinobactérias que apresentaram diferentes colorações do micélio aéreo no meio ISP-3.



As actinobactérias podem apresentar diversas colorações do micélio aéreo além da produção de pigmentos que vai depender do meio de cultura utilizado para o crescimento das linhagens (BERNARDO, 2012).

No trabalho de Meena et al. (2013), 26 actinobactérias foram isoladas de ambiente marinho e em todos os isolados foi observada coloração do micélio aéreo bem desenvolvido no meio SCA (Amido caseína ágar). Foi observado que 65,39% das actinobactérias apresentavam micélio com coloração esverdeada, azul ou cinza, e oito gêneros foram identificados pela observação microscópica da cadeia de esporos *Saccharopolyspora*, *Streptomyces*, *Actinopolyspora*, *Nocardiopsis*, *Microtetraspora*, *Actinokineospora* e *Dactylosporangium*.

## 5.2 Mecanismos para promoção de crescimento vegetal por micro-organismos

### 5.2.1 Produção de ácido 3-indolacético (AIA)

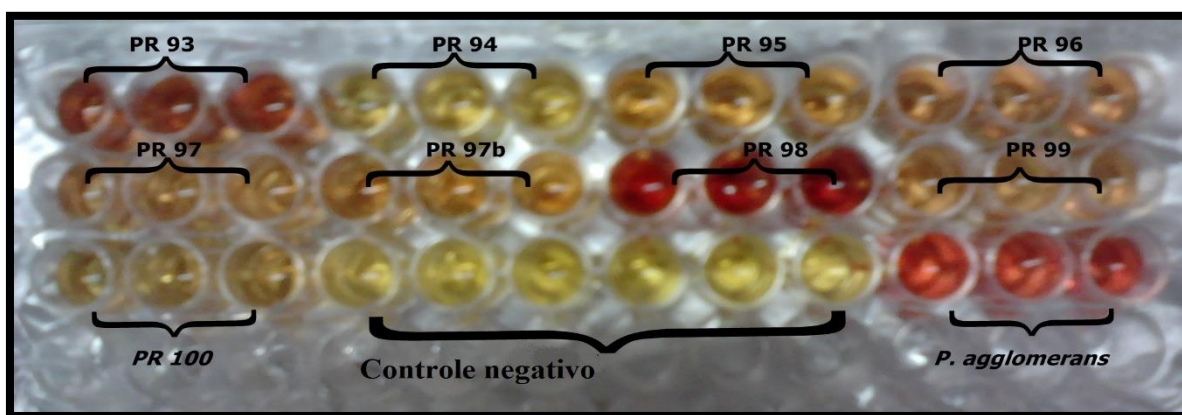
As actinobactérias são produtoras de inúmeros metabólitos bioativos, entre os quais se destacam os compostos derivados do triptofano como o ácido 3-indolacético (AIA), e outros



derivados indólicos. Dentre estes metabólitos, a produção de AIA é o principal mecanismo utilizado pelos micro-organismos para favorecer o crescimento de plantas (LIN; XU, 2013).

Neste trabalho, 80 actinobactérias foram avaliadas quanto à produção de auxina e foi observado que 86,25% (69) das linhagens produzem AIA. Esta produção foi evidenciada por mudança de coloração de amarelo para rosa-avermelhado nos sobrenadantes das amostras após a adição do reagente de Salkoswi, indicando que estes micro-organismos são produtores de auxina (Figura 5.3).

**Figura 5.3** – Presença do ácido 3-indolacético após a adição do Reagente de Salkowski.



No trabalho de Kumar et al. (2012), foi analisada a produção de AIA apenas qualitativamente e foi demonstrado que todos os sete isolados do gênero *Bacillus* mostraram produção de AIA após a adição do reagente de Salkowski, igualmente observado em nosso trabalho. Para quantificação da concentração de auxina foi realizada uma curva-padrão com ácido 3-indolacético nas concentrações de 1,25 a 80,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , originando a equação  $y = 0,0205x + 0,0427$ , com  $R^2 = 0,9982$  (Apêndice A).

As concentrações de AIA variaram de 1,75 a 76,48  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente produzido pela linhagem PR 94 e PR 38, enquanto que 13,75% (11) não foram capazes de produzir o AIA. A análise dos resultados observados na tabela 5.1 mostra que as actinobactérias PR 38 e PR 98 apresentaram concentração maior que o controle positivo *Pantoea agglomerans* UFPEDA 774.

**Tabela 5.1** - Concentração de ácido 3-indolacético ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) produzido pelas actinobactérias isoladas de rizosferas de plantas da Caatinga.

Linhagens de Actinobactérias	Concentração de AIA ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Linhagens de Actinobactérias	Concentração de AIA ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )
PR 01	-	PR 82	$8,17 \pm 0,30$
PR 02	$4,04 \pm 0,78$	PR 84	$6,76 \pm 0,95$
PR 03	-	PR 86	$12,40 \pm 0,48$
PR 04	-	PR 87	$14,59 \pm 0,61$
PR 05	$2,12 \pm 0,36$	PR 88A	$14,07 \pm 1,16$
PR 09	-	PR 88B	$16,92 \pm 1,39$
PR 12	-	PR 89	$15,00 \pm 2,21$
PR 14	$5,55 \pm 0,20$	PR 90	$11,13 \pm 2,01$
PR 15	$9,91 \pm 1,02$	PR 91	$15,76 \pm 2,48$
PR 17	$19,29 \pm 0,22$	PR 92	$46,36 \pm 0,90$
PR 19	-	PR 93	$30,25 \pm 0,77$
PR 20	$18,48 \pm 2,03$	PR 94	$1,75 \pm 0,54$
PR 22	$12,88 \pm 0,54$	PR 95	$7,94 \pm 0,71$
PR 23	$29,71 \pm 0,57$	PR 96	$9,99 \pm 1,06$
PR 25	$11,97 \pm 0,91$	PR 97	$11,89 \pm 2,39$
PR 26	$12,14 \pm 1,33$	PR 97B	$11,24 \pm 0,26$
PR 27	$23,86 \pm 2,30$	PR 98	$73,36 \pm 12,82$
PR 29	$18,45 \pm 2,91$	PR 99	$8,67 \pm 0,51$
PR 32	$5,40 \pm 1,11$	PR 100	$5,81 \pm 0,09$
PR 33	$6,98 \pm 2,79$	MCR 25	$12,49 \pm 1,00$
PR 34	$53,57 \pm 6,83$	MCR 28	$5,21 \pm 1,04$
PR 35	$12,20 \pm 1,04$	MCR 29	$3,11 \pm 0,62$
PR 36	$12,09 \pm 0,78$	MCR 39	$10,43 \pm 0,84$
PR 37	-	MCR 40	$6,74 \pm 1,10$
PR 38	$76,48 \pm 1,3$	MCR 716	$5,18 \pm 1,69$
PR 39	$4,59 \pm 0,14$	TUR 02	$11,42 \pm 0,50$
PR 45	-	TUR 05	$17,80 \pm 0,47$
PR 46	$5,29 \pm 0,75$	TUR 10	$16,74 \pm 2,43$
PR 53	$5,23 \pm 2,27$	TUR 11	$11,29 \pm 1,03$
PR 55B	$8,49 \pm 1,53$	TUR 13	$10,69 \pm 0,88$
PR 61	$29,63 \pm 1,31$	TUR 17	$13,27 \pm 1,24$
PR 63	-	TUR 81	$7,93 \pm 0,50$
PR 66	$21,18 \pm 2,00$	TUR 326	$10,02 \pm 0,70$
PR 67	-	TUR 327	$10,67 \pm 1,25$
PR 68	-	TUR 495	$19,91 \pm 0,64$
PR 71	$11,78 \pm 1,35$	TUR 701	$10,36 \pm 0,56$
PR 76	$23,00 \pm 0,47$	TUR 703	$9,68 \pm 0,29$
PR 78	$1,97 \pm 0,3$	TUR 704	$36,06 \pm 4,74$
PR 79	$8,40 \pm 0,76$	TUR 716	$4,80 \pm 1,13$
PR 80	$16,17 \pm 0,32$	TUR 742	$6,64 \pm 0,48$
<i>Pantoea agglomerans</i>			$50,88 \pm 0,24$

A capacidade de produzir AIA é comum em actinobactérias que habitam vários ambientes, tais como o solo (rizosferas), água marinha, rios, e como hospedeiras de plantas (PATTEN et al., 2013).

Várias actinobactérias já foram relatadas como produtoras de auxina, como foi enfatizado por Nimnoi et al. (2010), os quais observaram que os isolados rizosféricos foram identificados como pertencentes aos gêneros *Actinomadura*, *Streptomyces*, *Nonomura*, *Nocardia* e *Frankia*, e produziram AIA em concentrações variando de 9,85 a 15,14  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  em meio de cultura suplementado com triptofano, sendo concentrações inferiores às obtidas em nosso estudo.

Javaid e Sultan (2013) avaliaram seis cepas de *Streptomyces* isoladas de terras salinas e observaram que todas produzem AIA com máxima produção de 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , resultados este bastante inferior ao que foi observado neste estudo com as actinobactérias isoladas da Caatinga que produzem AIA em concentrações sete vezes maior que os resultados observados por estes autores.

No estudo realizado por Shokri e Emtiazi (2010), foi avaliada a produção de ácido 3-indolacético em 35 bactérias fixadoras de nitrogênio isoladas de solo e raízes de plantas e foi observado que os gêneros *Rhizobium* e *Paenibacillus* apresentaram concentrações de ácido 3-indolacético respectivamente de 5,23 e 4,90  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , sendo também concentrações bastante inferiores em relação ao observado com as actinobactérias nesta pesquisa.

Kavamura et al. (2012) avaliaram 48 rizobactérias isoladas de plantas do bioma Caatinga (*Cereus jamacaru*, *Pilosocereus gounellei* e *Melocactus* sp.), e foi possível detectar que cerca de 30% das cepas produzem AIA em concentrações variando 1,0 a 135,22  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , corroborando assim com os nossos resultados e indicando a grande importância deste bioma exclusivo do Brasil.

Diante dos fatos expostos, os resultados obtidos neste estudo em relação aos descritos na literatura indicam que as actinobactérias isoladas da rizosfera de plantas da Caatinga apresentam alto potencial em promover o crescimento de plantas pela produção de AIA. Além disto, os resultados também demonstram a importância de se avaliar micro-organismos de ambientes inexplorados, pois foi observado diferença entre as concentrações mínima e máxima podendo ser, segundo Kavamura et al. (2012), devido ao fato da produção de AIA ser influenciada pelas condições de cultivo durante a fase de crescimento do micro-organismo e disponibilidade do substrato.

De acordo com Lins M. (2012), a variação das concentrações de cada linhagem pode ter sido ocasionada porque existem diferenças intrínsecas em cada gênero, sendo necessário

conhecer melhor a síntese de AIA em tempos de desenvolvimento bacteriano diferentes possibilitando dessa forma a determinação do tempo em que ocorre a síntese máxima do produto.

### **5.2.2 Avaliação da solubilização de fosfato em meios sólidos NBRIP e VERMA**

Os resultados mostraram que 93,75% (75) das actinobactérias solubilizaram fosfato em pelo menos um dos meios de cultura utilizados. Dentre as linhagens solubilizadoras, 66,25% (53) das linhagens solubilizaram fosfato no VERMA com Índice de Solubilização (IS) variando de 1,15 a 2,17, enquanto que 27,5% (22) solubilizaram o fosfato no NBRIP com IS variando de 1,18 a 2,25. No meio NBRIP os IS foram inferiores ao controle positivo *P. agglomerans* UFPEDA 774 com IS de 3,2. As linhagens que apresentaram IS acima de 2 estão destacadas na tabela 5.2.

**Tabela 5.2** - Índice de Solubilização (IS) das linhagens de actinobactérias isoladas de rizosferas de plantas da Caatinga nos meios VERMA e NBRIP.

Linhagens de Actinobactérias	Índice de Solubilização (IS) Meio VERMA	Índice de Solubilização (IS) Meio NBRIP	Linhagens de Actinobactérias	Índice de Solubilização (IS) Meio VERMA	Índice de Solubilização (IS) Meio NBRIP
PR 01	1,79 ± 0,06	1,27 ± 0,02	PR 82	1,95 ± 0,06	-
PR 02	1,61 ± 0,09	1,26 ± 0,13	PR 84	1,42 ± 0,10	-
PR 03	1,15 ± 0,05	1,29 ± 0,00	PR 86	1,40 ± 0,07	-
PR 04	1,38 ± 0,18	1,40 ± 0,00	PR 87	1,36 ± 0,05	-
PR 05	1,75 ± 0,08	-	PR 88A	1,54 ± 0,12	-
PR 09	1,29 ± 0,10	-	PR 88B	-	-
PR 12	1,50 ± 0,09	-	PR 89	1,38 ± 0,14	-
PR 14	1,21 ± 0,08	1,33 ± 0,00	PR 90	2,05 ± 0,07	-
PR 15	1,89 ± 0,08	-	PR 91	1,62 ± 0,07	-
PR 17	1,26 ± 0,07	1,46 ± 0,12	PR 92	1,79 ± 0,30	-
PR 19	1,15 ± 0,04	-	PR 93	1,38 ± 0,10	-
PR 20	1,53 ± 0,08	-	PR 94	1,36 ± 0,10	-
PR 22	1,35 ± 0,11	-	PR 95	1,57 ± 0,18	-
PR 23	1,59 ± 0,09	-	PR 96	1,72 ± 0,18	-
PR 25	1,46 ± 0,12	-	PR 97	1,48 ± 0,08	-
PR 26	1,48 ± 0,14	-	PR 97B	1,63 ± 0,14	-
PR 27	1,48 ± 0,03	-	PR 98	1,50 ± 0,31	-
PR 29	1,22 ± 0,04	-	PR 99	1,63 ± 0,09	-
PR 32	1,67 ± 0,14	-	PR 100	1,45 ± 0,24	-
PR 33	1,24 ± 0,09	-	MCR 25	1,52 ± 0,03	-
PR 34	1,36 ± 0,08	2,00 ± 0,59	MCR 28	1,15 ± 0,01	-
PR 35	1,68 ± 0,11	1,67 ± 0,24	MCR 29	1,23 ± 0,04	1,28 ± 0,06
PR 36	1,26 ± 0,05	2,25 ± 1,05	MCR 39	1,24 ± 0,01	1,47 ± 0,10
PR 37	-	-	MCR 40	1,19 ± 0,09	1,64 ± 0,31

<b>PR 38</b>	-	-	<b>MCR 716</b>	$1,23 \pm 0,11$	$1,40 \pm 0,00$
<b>PR 39</b>	$1,57 \pm 0,17$	-	<b>TUR 02</b>	$1,86 \pm 0,49$	$1,44 \pm 0,26$
<b>PR 45</b>	$1,59 \pm 0,16$	-	<b>TUR 05</b>	$1,50 \pm 0,28$	$1,53 \pm 0,05$
<b>PR 46</b>	$1,75 \pm 0,08$	-	<b>TUR 10</b>	$1,33 \pm 0,04$	$1,25 \pm 0,00$
<b>PR 53</b>	$1,86 \pm 0,00$	-	<b>TUR 11</b>	$1,23 \pm 0,05$	-
<b>PR 55B</b>	$1,40 \pm 0,03$	-	<b>TUR 13</b>	$1,50 \pm 0,10$	-
<b>PR 61</b>	$1,27 \pm 0,15$	-	<b>TUR 17</b>	$1,35 \pm 0,06$	$1,33 \pm 0,02$
<b>PR 63</b>	$1,37 \pm 0,09$	-	<b>TUR 81</b>	$1,25 \pm 0,07$	-
<b>PR 66</b>	$1,39 \pm 0,07$	-	<b>TUR 326</b>	$1,18 \pm 0,06$	-
<b>PR 67</b>	$2,17 \pm 0,00$	-	<b>TUR 327</b>	$1,22 \pm 0,04$	-
<b>PR 68</b>	$1,64 \pm 0,19$	-	<b>TUR 495</b>	$1,32 \pm 0,08$	-
<b>PR 71</b>	$1,64 \pm 0,14$	-	<b>TUR 701</b>	$1,42 \pm 0,07$	$1,50 \pm 0,01$
<b>PR 76</b>	$1,68 \pm 0,19$	-	<b>TUR 703</b>	$1,41 \pm 0,07$	$1,18 \pm 0,00$
<b>PR 78</b>	-	-	<b>TUR 704</b>	$1,43 \pm 0,16$	$1,68 \pm 0,11$
<b>PR 79</b>	$1,63 \pm 0,17$	-	<b>TUR 716</b>	$1,73 \pm 0,07$	$1,64 \pm 0,06$
<b>PR 80</b>	-	-	<b>TUR 742</b>	$1,23 \pm 0,05$	$1,60 \pm 0,07$
			<b><i>Pantoea agglomerans</i></b>	$3,02 \pm 0,42$	$2,00 \pm 0,00$

Mehnaz et al. (2010) avaliaram o potencial de promover o crescimento vegetal de 32 rizobactérias isoladas da cana de açúcar e observaram qualitativamente que 84,37% (27) solubilizam o fósforo no meio NBRIP.

No estudo de Javaid e Sultan (2013) foram avaliadas seis linhagens de *Streptomyces* quanto à solubilização de fosfato no meio Pikovskaya com o fosfato tricálcico, e foi possível observar que 33,33% (2) foram capazes de solubilizar o fosfato com IS de 1,46 e 1,86, enquanto que neste nosso trabalho algumas actinobactérias da Caatinga como PR 34, PR 36, PR 67 e PR 90 apresentaram valores de IS variando de 2,0 a 2,25 sendo maiores que os encontrados por estes autores.

Segundo Silva Filho e Vidor (2000), o potencial de solubilização de fosfato por micro-organismos pode ser classificado como baixa solubilização ( $IS < 2$ ), média solubilização ( $2 < IS < 3$ ) e alta solubilização ( $IS > 3$ ). Em relação às actinobactérias isoladas da rizosfera da Caatinga, podemos concluir que apenas 5,0% (4) das linhagens, PR 34, PR 36, PR 67 e PR 90, apresentaram melhor solubilização com IS entre 2 e 3 pelo menos em um dos meios utilizados (VERMA ou NBRIP).

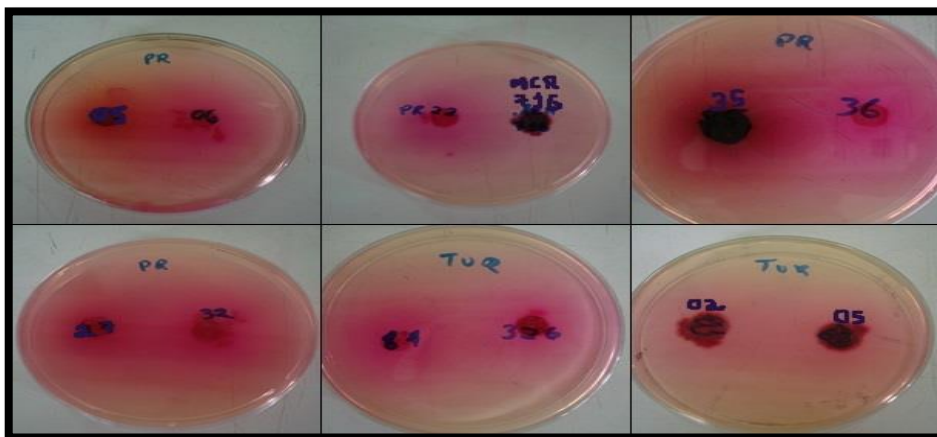
Existem diversas fontes de fosfato no ecossistema as quais os micro-organismos disponibilizam o fósforo tornando-o solúvel para o ambiente no qual estão inseridas. Diante disto, não podemos afirmar que as actinobactérias da Caatinga não são boas solubilizadoras de fosfato, pois existem estudos como o de Sousa (2010) que utiliza vários meios de cultura com várias fontes de fósforo para se conhecer mais profundamente os mecanismos e processos envolvidos na solubilização de fosfato.

### 5.2.3 Detecção da produção de fosfatases

Os micro-organismos realizam a decomposição da matéria orgânica, como a solubilização de fosfato do solo, liberando o radical ortofosfato da estrutura de carbono das moléculas através de processos de respiração e sob forte influência de fatores ambientais. Desta maneira, o fósforo solúvel se torna viável para o consumo das plantas (OLIVEIRA et al., 2003).

Os resultados da avaliação da produção de fosfatases mostram que 97,5% (78) das actinobactérias produzem estas enzimas pela visualização de zona rosada em volta das colônias após a adição de hidróxido de amônio, como pode ser observado na figura 5.4.

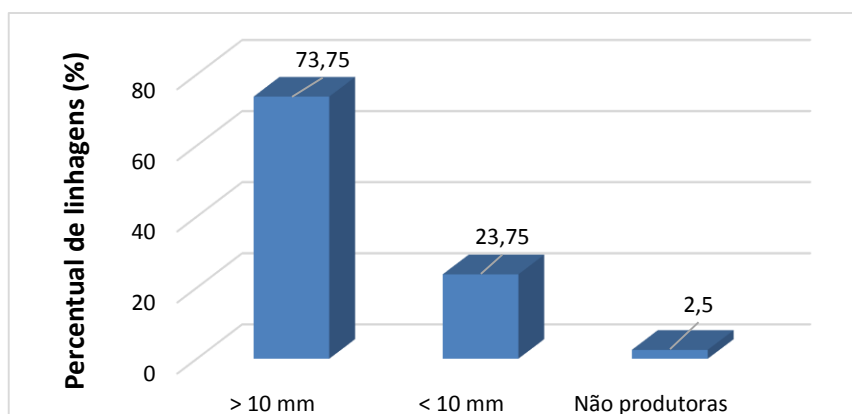
**Figura 5.4** - Produção de fosfatases pela formação de zona rosa em volta das colônias de actinobactérias.



Os resultados da produção de fosfatases foram expressos de acordo com Ribeiro e Cardoso (2012), os quais classificaram zonas rosa acima de 10 mm com duas cruces (++) e abaixo de 10 mm apenas uma cruz (+).

Das linhagens produtoras de fosfatases, 75,64% (59) mostraram halo maior que 10 mm (++), 24,36% (19) das actinobactérias apresentaram zonas menores que 10 mm (+) e apenas duas linhagens não apresentaram produção de fosfatases (Figura 5.5).

**Figura 5.5** – Percentual de actinobactérias quanto à produção de fosfatases.



Correlacionando os resultados obtidos da solubilização de fosfato e produção de fosfatases, foi constatado que todas as linhagens que solubilizaram o fosfato em pelo menos um meio de cultura utilizado produziram fosfatases indicando que é um mecanismo de promoção de crescimento vegetal importante das actinobactérias da Caatinga.



A principal fonte de fosfatases no solo é de origem microbiana, e sua atividade aumenta substancialmente na rizosfera, tornando necessário o conhecimento de quais micro-organismos produzem estas enzimas para elucidar os mecanismos de ação (RIBEIRO; CARDOSO, 2012).

Segundo Young et al. (2013), o aumento da atividade das fosfatases na rizosfera tem muitas vantagens, como por exemplo, apresentar efeito positivo sobre a biodisponibilidade do solo e absorção de fosfato pelas plantas.

A investigação realizada por Meena et al. (2013) mostraram que dentre as 26 actinobactérias isoladas de ambiente marinho, 30,77% (8) produzem fosfatases, além de outras enzimas importantes que podem ser utilizadas nas indústrias.

Ribeiro e Cardoso (2012) também observaram que das 96 bactérias associadas a raízes da *Araucaria angustifolia*, 85% (83) dos isolados produzem fosfatases.

A avaliação do melhor tempo, pH e temperatura para produção desta enzima pelas actinobactérias através da quantificação da atividade enzimática é fundamental para elucidação quanto à produção, uma vez que temperatura do habitat, por exemplo, poderá ser elevada em relação à outros habitats de onde as actinobactérias são isoladas.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram o grande potencial das actinobactérias isoladas da rizosfera da Caatinga em relação à produção de fosfatases, pois confirmam e se correlacionam com os resultados analisados na solubilização de fosfato.

#### **5.2.4 Atividade antimicrobiana para micro-organismos fitopatógenos**

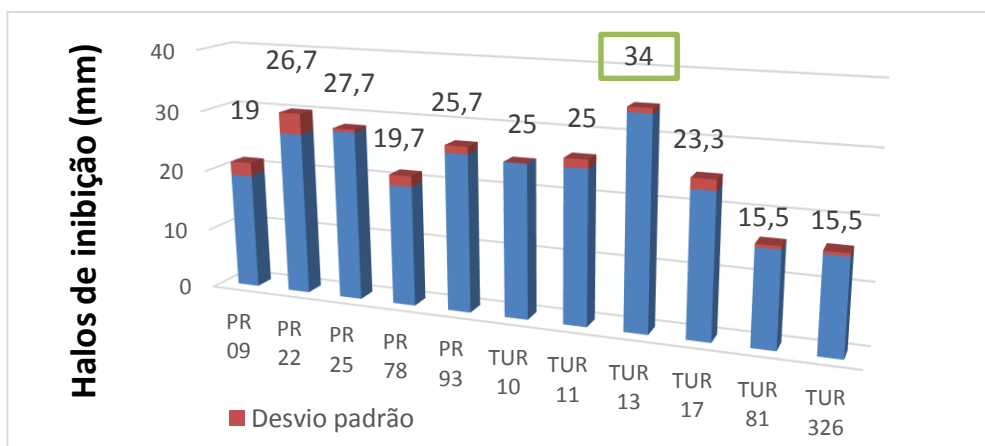
A atividade antimicrobiana das 80 actinobactérias frente fungos fitopatógenos (*Fusarium oxysporum* UFPEDA 2455; *Colletotrichum* sp. UFPEDA 2419) e bactérias fitopatógenas (*Xanthomonas campestris* UFPEDA 407; *Erwinia carotovora* UFPEDA 106) também foi investigada uma vez que é conhecida como um mecanismo indireto em que os micro-organismos podem promover o crescimento vegetal.

Em relação aos fungos fitopatógenos, foi observado que 15,0% (12) das actinobactérias testadas produzem metabólitos antimicrobianos contra os fungos, e dentre estas, uma linhagem PR 86 apresentou atividade apenas para *F. oxysporum* com halo parcial de 29,7 mm, enquanto que as actinobactérias PR 09, PR 78, TUR 10 e TUR 17 inibiram o crescimento apenas de *Colletotrichum* sp. com halos de inibição que variaram de 19 a 25 mm.

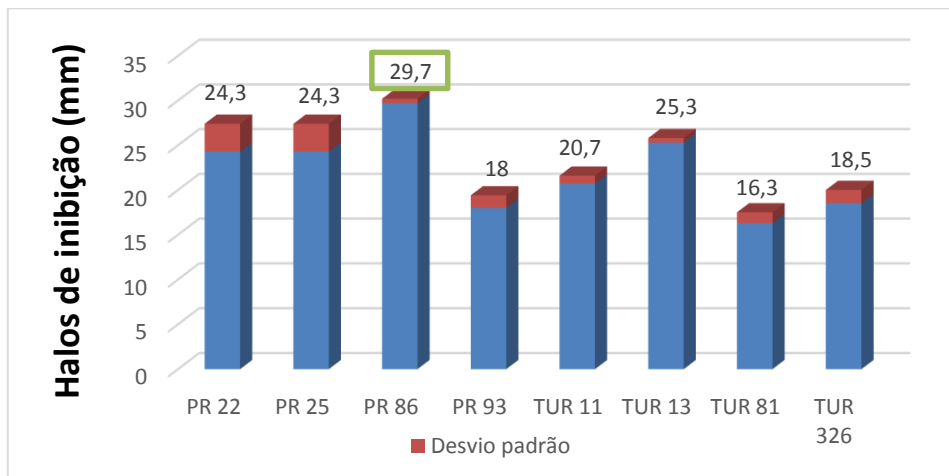
Também foi observado que PR 22, PR 25, PR 93, TUR 11, TUR 13, TUR 81 e TUR 326 apresentaram atividade tanto para *Colletotrichum* sp. quanto para *F. oxysporum* com

halos variando de 15,5 a 34,0 mm e 16,3 a 25,3 mm, respectivamente (Figura 5.6 e figura 5.7).

**Figura 5.6** – Halos de inibição das actinobactérias que apresentaram atividade antimicrobiana para *Colletotrichum* sp. UFPEDA 2419.



**Figura 5.7** - Halos de inibição das actinobactérias que apresentaram atividade antimicrobiana frente *Fusarium oxysporum* UFPEDA 2455.



As rizobactérias (RPCP) se destacam em suprimir o crescimento de vários fitopatógenos através de mecanismos como a competição por nutrientes, limitar a oferta de ferro disponível através da produção de sideróforos, produção de enzimas líticas e também através da antibiose (BHATTACHARYYA; JHA 2012).

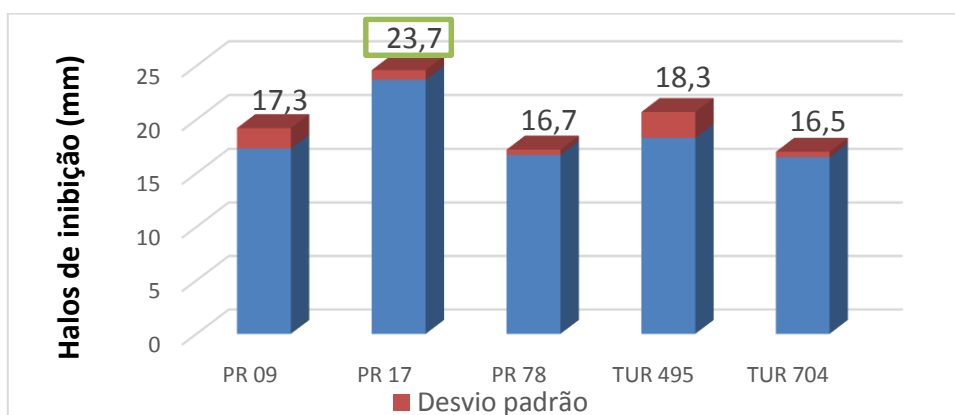
Kumar et al. (2012) analisaram *Bacillus* spp. rizosféricos frente a fungos fitopatógenos. Todas as sete linhagens avaliadas apresentaram atividade antagônica com máxima inibição no crescimento radial de *Macrophomina phaseolina* (62,10%), *Fusarium*

*oxysporum* (65,91%), *F. solani* (64,38), *Sclerotinia sclerotiorum* (55,59%), *Rhizoctonia solani* (54,86%) e *Colletotrichum* sp. (52,39%). Neste mesmo trabalho foi evidenciado também que um aumento no período de cultivo correspondia a um aumento na inibição dos fungos.

Cao et al. (2004) avaliaram *Streptomyces* endofíticos de raízes de tomate (*Lycopersicon esculentum*) e observaram que 65% dos isolados inibiram o crescimento de *Rhizoctonia solani*. Taechowisan et al. (2003) também isolaram actinobactérias endofíticas de espécies de plantas da Tailândia, das quais 10% apresentaram atividade para *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum musae*.

Das actinobactérias testadas frente às bactérias fitopatógenas, apenas 6,25% (5) apresentaram atividade apenas para *X. campestris* UFPEDA 407 com halos que variaram de 16,5 a 23,7 mm, enquanto que não foi observado atividade inibitória para *E. carotovora* UFPEDA 106 pelas linhagens avaliadas (Figura 5.8).

**Figura 5.8** - Halos de inibição das actinobactérias que apresentaram atividade para *Xanthomonas campestris* UFPEDA 407.



Bactérias fitopatogênicas são responsáveis por perdas de muitas culturas agrícolas importantes economicamente causando prejuízos de milhões de reais anualmente. Por este motivo, as atenções de pesquisadores estão voltadas para estes micro-organismos, uma vez que podem atuar na promoção indireta do crescimento vegetal (NADARASAH; STAVRINIDES, 2011).

No estudo realizado por Venturi e Fuqua (2013) envolvendo bactérias fitopatogênicas mostrou que houve evolução nos sistemas de sensibilidade e respostas aos compostos produzidos pelas plantas visando à regulação de características associadas à virulência. Portanto, a busca por novos micro-organismos capazes de inativar o crescimento de

fitopatógenos é importante para indução de resistência sistêmica nas plantas (OLIVEIRA et al., 2003).

Trias et al. (2008) avaliaram 484 bactérias isoladas de frutas, legumes e derivados do leite em relação à atividade antagonista para bactérias fitopatógenas, incluindo *Erwinia carotovora* e *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* e observaram que *X. campestris* foi o fitopatógeno mais frequentemente inibido enquanto *E. carotovora* mostrou menor inibição.

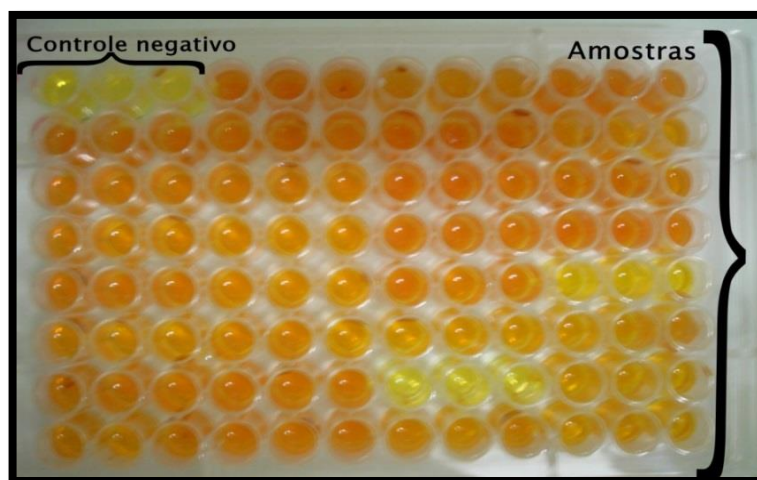
Bactérias Gram-negativas como *X. campestris* e *E. carotovora* apresentam uma membrana externa lipopolissacarídica diferentemente das bactérias Gram positivas, o que lhes confere, uma resistência maior aos mecanismos de antibiose (MADIGAN et al., 2010).

Diante dos fatos expostos, os nossos resultados corroboram com outros descritos na literatura, e o diferencial do nosso estudo é o fato de ainda não se ter análises detalhadas de actinobactérias isoladas da rizosfera da Caatinga com o potencial de promover o crescimento vegetal através da antibiose, como também outros mecanismos envolvidos nesta característica.

### 5.2.5 Avaliação da produção de amônia (NH<sub>3</sub>)

O teste qualitativo indicou que 80% (64) das actinobactérias produzem NH<sub>3</sub>, como pode ser observado na figura 5.9, mostrando o grande potencial destas bactérias filamentosas isoladas da rizosfera da Caatinga.

**Figura 5.9** - Avaliação da produção de amônia pelas linhagens de actinobactérias isoladas de plantas da Caatinga após a adição do reagente de Nessler.



Para quantificação de amônia produzida pelas linhagens de actinobactérias foi realizada uma curva-padrão em concentrações de sulfato de amônio variando de 1,25 a 240  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (Apêndice B).

Os resultados apresentados na tabela 5.3 mostram que as concentrações de amônia produzida pelas linhagens de actinobactérias variaram de 3,59 a 292,31  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , destacando três linhagens PR 03, PR 04 e PR 05 como as maiores produtoras de amônia: 251,72; 292,31; e 254,26  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente. A linhagem que apresentou produção mínima de amônia foi a TUR 02 com 3,59  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Além disto, os resultados mostram que das 80 linhagens testadas, 7,5% (6) apresentaram concentração superior a 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , enquanto 12,5% (10) não produziram amônia.

**Tabela 5.3** - Concentração de amônia ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) produzida pelas actinobactérias isoladas de rizosferas de plantas da Caatinga.

<b>Linhagens de Actinobactérias</b>	<b>Concentração de <math>\text{NH}_3</math> (<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b>	<b>Linhagens de Actinobactérias</b>	<b>Concentração de <math>\text{NH}_3</math> (<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b>
PR 01	122,26 $\pm$ 3,84	PR 82	171,00 $\pm$ 20,52
PR 02	186,00 $\pm$ 5,00	PR 84	135,92 $\pm$ 11,21
PR 03	251,72 $\pm$ 70,23	PR 86	33,46 $\pm$ 0,29
PR 04	292,31 $\pm$ 0,96	PR 87	36,95 $\pm$ 5,62
PR 05	254,26 $\pm$ 45,87	PR 88A	-
PR 09	46,92 $\pm$ 3,22	PR 88B	55,85 $\pm$ 6,14
PR 12	162,92 $\pm$ 10,37	PR 89	23,42 $\pm$ 6,13
PR 14	184,85 $\pm$ 35,38	PR 90	53,36 $\pm$ 16,21
PR 15	157,59 $\pm$ 10,29	PR 91	34,12 $\pm$ 2,45
PR 17	162,05 $\pm$ 9,26	PR 92	43,65 $\pm$ 6,37
PR 19	8,05 $\pm$ 0,15	PR 93	22,71 $\pm$ 0,22
PR 20	14,46 $\pm$ 0,63	PR 94	74,54 $\pm$ 18,77
PR 22	119,56 $\pm$ 18,82	PR 95	40,15 $\pm$ 6,64
PR 23	-	PR 96	14,38 $\pm$ 0,13
PR 25	28,67 $\pm$ 0,44	PR 97	17,97 $\pm$ 0,85
PR 26	24,56 $\pm$ 0,39	PR 97B	38,38 $\pm$ 3,35
PR 27	166,87 $\pm$ 45,81	PR 98	39,59 $\pm$ 5,45
PR 29	60,90 $\pm$ 11,89	PR 99	54,38 $\pm$ 6,27
PR 32	128,46 $\pm$ 3,57	PR 100	63,59 $\pm$ 6,93
PR 33	167,15 $\pm$ 24,53	MCR 25	178,08 $\pm$ 25,86
PR 34	227,21 $\pm$ 63,91	MCR 28	103,97 $\pm$ 6,00
PR 35	151,36 $\pm$ 3,33	MCR 29	107,33 $\pm$ 8,04
PR 36	139,90 $\pm$ 3,74	MCR 39	232,44 $\pm$ 53,29
PR 37	152,13 $\pm$ 3,96	MCR 40	118,08 $\pm$ 4,75
PR 38	95,54 $\pm$ 12,16	MCR 716	12,28 $\pm$ 2,47
PR 39	-	TUR 02	3,59 $\pm$ 0,01
PR 45	19,67 $\pm$ 3,41	TUR 05	8,46 $\pm$ 1,65
PR 46	135,36 $\pm$ 12,10	TUR 10	39,36 $\pm$ 13,47
PR 53	141,38 $\pm$ 2,08	TUR 11	101,94 $\pm$ 17,72
PR 55B	-	TUR 13	62,97 $\pm$ 7,16
PR 61	133,54 $\pm$ 9,96	TUR 17	19,13 $\pm$ 0,33
PR 63	196,74 $\pm$ 0,27	TUR 81	-
PR 66	73,47 $\pm$ 16,40	TUR 326	53,29 $\pm$ 7,38
PR 67	145,05 $\pm$ 22,24	TUR 327	40,44 $\pm$ 8,41
PR 68	162,79 $\pm$ 3,86	TUR 495	-
PR 71	172,23 $\pm$ 8,84	TUR 701	-
PR 76	17,08 $\pm$ 2,88	TUR 703	-
PR 78	118,77 $\pm$ 9,22	TUR 704	203,00 $\pm$ 0,36
PR 79	158,87 $\pm$ 21,57	TUR 716	-
PR 80	162,62 $\pm$ 3,03	TUR 742	-

Entre os mecanismos indiretos os quais os micro-organismos utilizam para promover o crescimento vegetal, é possível considerar como forma de antibiose a produção de compostos voláteis, como a amônia ( $\text{NH}_3$ ) (KAVAMURA et al., 2012).

Di et al. (2009) sugeriram que a nitrificação é impulsionado por bactérias não archaea em solos ricos em nitrogênio, sendo importante o conhecimento de toda a microbiota do solo, como a presença de actinobactérias, para melhor elucidação dos mecanismos envolvidos no crescimento vegetal pelos micro-organismos.

Arun et al. (2012) avaliaram qualitativamente a promoção do crescimento de plantas pelo mecanismo da produção de amônia em 35 bactérias e foi observado que 85,71% (30) produzem amônia, além de apresentar outros mecanismos de promoção do crescimento vegetal. Pesquisa similar foi realizada por Kavamura et al. (2012), na qual foi observado que 71% das rizobactérias isoladas de plantas da Caatinga (*Cereus jamacaru*, *Pilosocereus gounellei* e *Melocactus* sp.) produzem amônia.

No trabalho de Nimnoi et al. (2010), 10 actinobactérias endofíticas da planta *Aquilaria crassna* Pierre ex Lec foram isoladas, e todas apresentaram produção de amônia que variou de 2 a 60 mg.mL<sup>-1</sup>.

Portanto os resultados obtidos neste estudo mostram produção de amônia pelas actinobactérias isoladas da rizosferas do *Melocactus* sp., *Pereiro* e *Terminalia fagifolia*, indicando que podem exercer um papel fundamental na fixação biológica do nitrogênio e possivelmente influenciar a antibiose frente aos fitopatógenos.

Micro-organismos que possam exercer vários mecanismos na promoção de crescimento vegetal são importantes, pois apresentam um alto potencial de serem utilizados na agroindústria. Shahi et al. (2011) constataram que dentre 114 bactérias diazotróficas isoladas da rizosfera do arroz, 18,42% (21) estavam envolvidas em pelo menos três mecanismos de promoção do crescimento de plantas: produção de AIA, produção de sideróforos e solubilização do fosfato.

Em nosso estudo, alguns mecanismos para promoção de crescimento vegetal foram avaliados em 80 actinobactérias e foi observado que todas as linhagens apresentaram pelo menos dois mecanismos, e somente uma linhagem PR 37 apresentou um mecanismos como pode ser observado na tabela geral no apêndice C.

### **5.3 Testes estatísticos para seleção de linhagens com maior potencial em promover o crescimento vegetal**

Após a realização dos testes para produção de ácido 3-indolacético, amônia e solubilização de fosfato nos dois meios de cultura utilizados, foi observado que 18,75% (15) das linhagens (PR 02, PR 14, PR 17, PR 34, PR 35, PR 36, MCR 29, MCR 39, MCR 40,

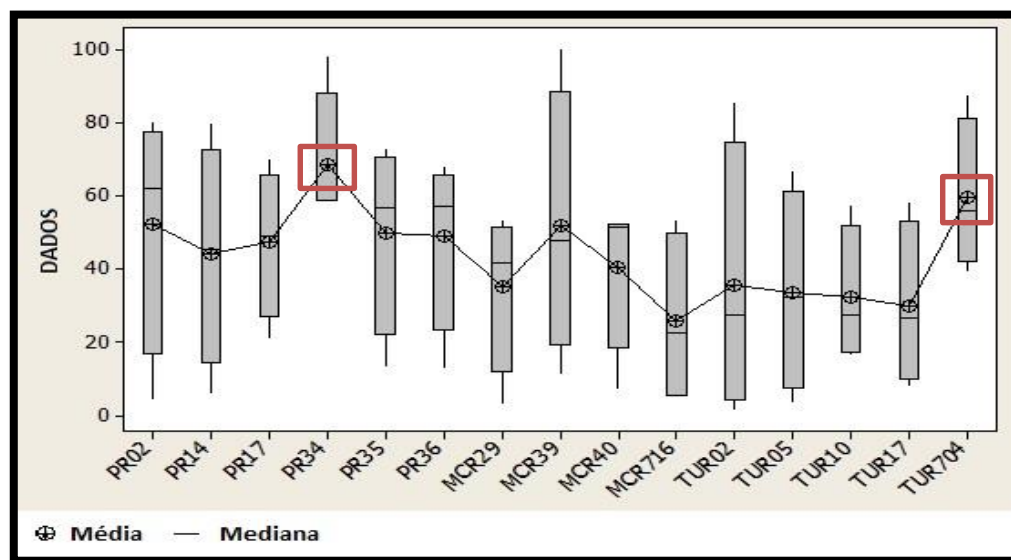
MCR 716, TUR 02, TUR 05, TUR 10, TUR 17 e TUR 704) apresentaram estas quatro características mostrando um maior potencial em promover o crescimento vegetal.

Para avaliar se houve diferenças entre as médias dos resultados dos quatro testes *in vitro*, foi realizado o teste ANOVA de fator único no programa Excel e Minitab. Foi observado que, dentre os testes de produção de AIA, solubilização de fosfato nos dois meios de cultura utilizados e produção de amônia, existem evidências mostrando que as médias dos resultados obtidos são estatisticamente iguais, ou seja, as linhagens apresentam características semelhantes na produção destes metabólitos e solubilização de fosfato indicando que a escolha da linhagem não iria interferir nos resultados esperados para os testes *in vivo*.

A análise de variância evidenciou que o  $F$  calculado (0,8048) das amostras foi menor que o  $F$  crítico (1,9182) além do valor- $p$  (0,659) demonstrando que não existem diferenças significativas entre as médias obtidas nos quatro testes realizados.

Entretanto, foram selecionadas as linhagens PR 34 e TUR 704, pois as médias foram maiores em relação às outras, como pode ser observado na figura 5.10.

**Figura 5.10** - Análise estatística dos resultados da produção de ácido 3-indolacético, amônia e solubilização de fosfato.



Igualmente a análise estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) mostrou que as médias dos resultados das linhagens não apresentaram diferenças estatísticas, entretanto, foi sugerido que as linhagens PR 34 e TUR 704 são as actinobactérias que se destacaram, pois apresentaram o valor  $q$  maior que as outras linhagens. Por isso, foram selecionadas para



posteriormente serem avaliadas em casa de vegetação para confirmar o potencial biotecnológico destas linhagens em promover o crescimento de plantas.

Em relação a avaliação do melhor meio de cultura para solubilização de fosfato, foi realizada a ANOVA no programa Minitab, a qual mostrou que as médias entre os dois meios são estatisticamente diferentes. A análise comprovou que o  $F$  calculado (118,2374) das amostras foi maior que o  $F$  crítico (3,900989) além do valor- $p$  (6,53E-21) demonstrando que existem diferenças significativas entre as médias obtidas nos meios de cultura VERMA e NBRIP.

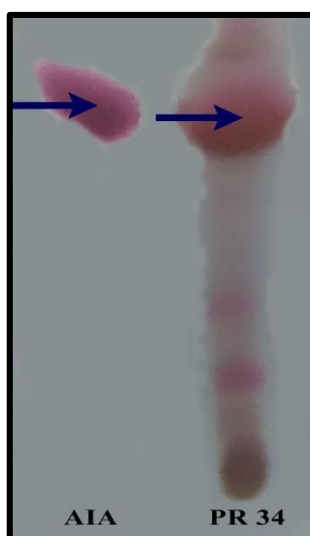
Pelo teste de Tukey (5%), foi observado que o VERMA é o melhor meio de cultura para solubilização de fosfato em relação ao meio NBRIP, tanto em relação a quantidade de linhagens solubilizadoras quanto aos valores de IS obtidos.

#### 5.4 Extração e identificação do ácido 3-indolacético por análises cromatográficas

A melhor linhagem selecionada pelos testes estatísticos, PR-34, foi cultivada em meio líquido ISP-2 para confirmação da produção de ácido 3-indolacético através de análises cromatográficas em TLC e HPLC.

A cromatografia em camada delgada (TLC) em placas de sílica gel mostrou que o valor de  $R_f$  do extrato foi muito próximo do AIA padrão, sendo  $R_f$  da amostra de 0,84 e do padrão foi aproximadamente 0,88, sugerindo que o ácido indolacético está presente no extrato bruto (Figura 5.11).

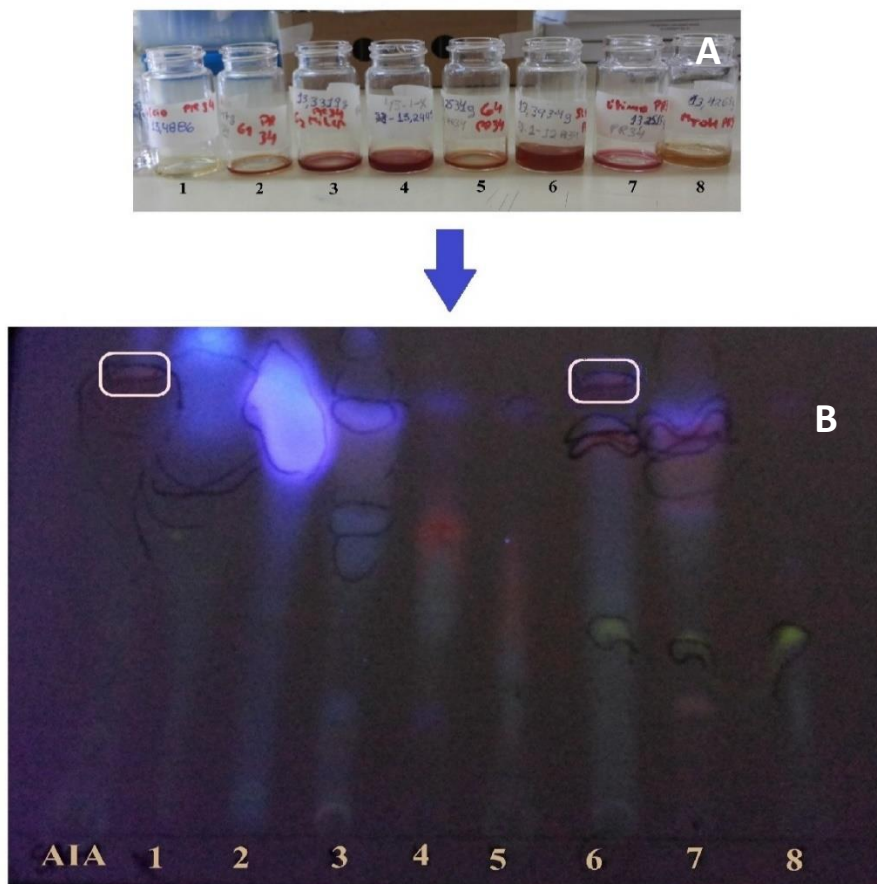
**Figura 5.11** - Cromatograma da placa de TLC do extrato bruto da linhagem PR-34 e do padrão ácido 3-indolacético (AIA).



O extrato bruto da linhagem PR 34 foi então particionado em 4 frações (hexano, clorofórmio, acetato de etila e aquoso) para realizar a semipurificação do extrato e quantificar a concentração do AIA produzido. Foi observado que o ácido 3-indolacético está presente na fração do clorofórmio após cromatografia em TLC comparado ao padrão AIA. Por este motivo, foi realizada cromatografia em coluna com esta fração.

A cromatografia em coluna com sílica foi realizada adicionando-se solventes com polaridades diferentes a partir do mais apolar, no caso o hexano. As frações foram coletadas em volumes de 10 mL, totalizando aproximadamente 55 frações. Foi realizada cromatografia em camada delgada para agrupamento das frações que apresentaram o mesmo Rf. Assim, foram obtidos 8 grupos e novamente foi realizada cromatografia em TLC para comparar o Rf das frações com o Rf do padrão AIA. Foi evidenciado que a fração 6 obteve mesmo Rf do padrão (Figura 5.12).

**Figura 5.12** - Partição do extrato clorofórmico: A) Frações obtidas da cromatografia em coluna; B) Cromatograma em TLC das frações.

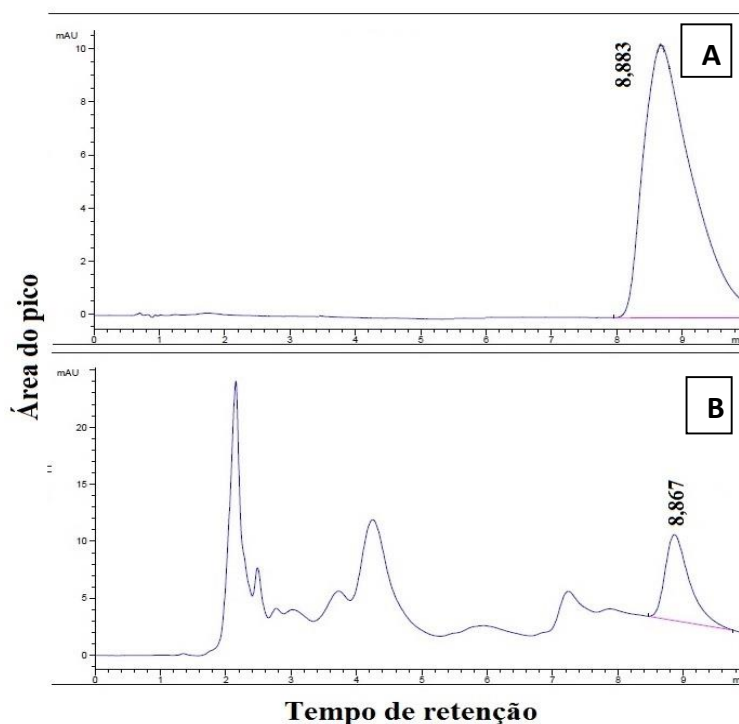


A fração 6 foi submetida à análise por HPLC para confirmar a presença do ácido 3-indolacético além da quantificação deste composto.

Para quantificação do AIA foi necessária a realização de uma curva-padrão em concentrações conhecidas de AIA padrão (Vetec), a qual gerou a equação  $y=7239,6x - 10,347$  com  $R^2 = 0,9994$  (Apêndice D).

Após a análise em HPLC foi possível determinar que a fração 6 contém o ácido 3-indolacético em concentração de  $23,406 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . O tempo de retenção do padrão foi de 8,17 a 8,88 minutos e o da amostra foi de 8,87 indicando a presença do AIA (Figura 5.13).

**Figura 5.13** - Perfil cromatográfico em cromatografia líquida de alta eficiência-HPLC: A) padrão do ácido 3-indolacético; B) fração 6 do extrato clorofórmico da linhagem PR 34.



Análises por HPLC têm sido empregadas em vários trabalhos na literatura para determinar a presença e quantificar compostos indólicos, como o AIA, em extratos obtidos do cultivo de micro-organismos com potencial em promover o crescimento vegetal (LIN; XU, 2013; SCHREY et al., 2012; YANDIGERI et al., 2012; DASTAGER et al., 2011; LEGAULT et al., 2011; KATAYAMA et al. (2008).

Abd-Alla et al. (2013) investigaram actinobactérias rizosféricas quanto à produção de AIA que foram identificadas através de cromatografias em TLC e HPLC. Foi observado que os extratos apresentaram o AIA com valores de Rf de 0,9 e tempo de retenção entre 6-7 minutos corroborando assim com os nossos resultados.

## 5.5 Identificação das actinobactérias isoladas da rizosfera de plantas da Caatinga

### 5.5.1 Identificação a nível de gênero pela técnica de microcultivo

Em relação à microscopia óptica para a identificação a nível de gênero das 80 linhagens utilizadas neste estudo, até o presente momento foram realizados microcultivos de 57,5% (46) das actinobactérias, das quais 97,83% (45) das linhagens pertencem ao gênero *Streptomyces*, pois foram observados esporos espiralados ao longo das cadeias (Figura 5.14), enquanto apenas 2,17% (1) apresentou micromorfologia típica de *Actinomadura* com cadeias de esporos curtas que será confirmada pela análise da parede celular (DAP) que é do tipo meso-DAP.

**Figura 5.14** – Microscopia óptica (40x) da linhagem PR 03 identificada como *Streptomyces* spp..



As actinobactérias podem ser identificadas a nível de gênero através da análise micromorfológica da cadeia de esporos que é específica para cada gênero (MEENA et al., 2013).

No trabalho de Nimnoi et al. (2010), foram isoladas 10 actinobactérias endofíticas da planta *Aquilaria crassna* Pierre ex Lec e identificadas com base nas suas características micromorfológicas, sendo pertencentes aos gêneros *Streptomyces*, *Nonomuraea*, *Actinomadura*, *Pseudonocardia*, e *Nocardia*.

Lins C. (2012) isolou 71 actinobactérias da rizosfera da Catingueira (árvore frequentemente encontrada no bioma Caatinga) e verificou que 76,1% dos isolados pertencem ao gênero *Streptomyces*. Da mesma forma, Bernardo (2012) analisou 16 actinobactérias isoladas da rizosfera da *Terminalia fagifolia* e identificou que 12 (75%) das linhagens pertencem ao gênero *Streptomyces*, enquanto 25% das linhagens foram identificadas como *Actinomadura* sp., por apresentar cadeias pequenas de esporos.

Jog et al. (2012) também identificaram actinobactérias rizosféricas que apresentaram mecanismos de promoção de crescimento vegetal e observou que todas pertencem ao gênero *Streptomyces* que são bactérias Gram positivas e filamentosas que apresentam parede celular com isômero L-DAP.

Linhagens de *Streptomyces* (*S. matansisi*, *S. vinaceus*, *S. pulcher*, *S. griseoincarnatus*) foram estudadas no trabalho de Javaid e Sultan (2013), no qual observaram que estas actinobactérias apresentam mecanismos de promoção do crescimento vegetal. Por isto é importante analisar e identificar micro-organismos, como as actinobactérias isoladas da Caatinga, pois podem apresentar características importantes para o desenvolvimento de plantas.

### **5.5.2 Identificação molecular através do sequenciamento do gene 16S rRNA**

A análise do gene 16S rRNA das actinobactérias da Caatinga é importante para confirmação dos gêneros determinados pela análise da micromorfologia, além de indicar as linhagens mais próximas a nível de espécie visando o conhecimento da biodiversidade deste habitat pouco explorado.

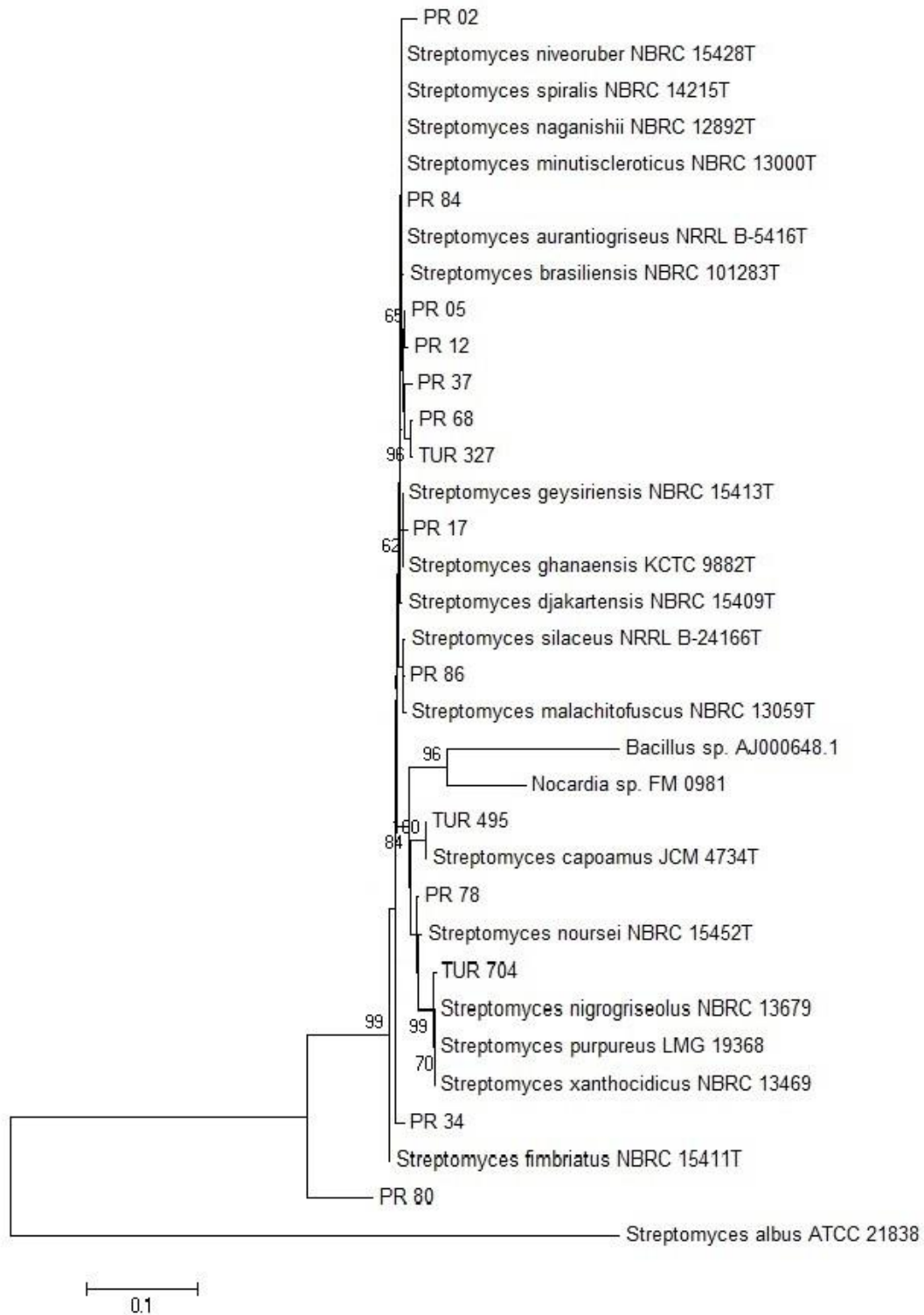
Foi possível identificar através do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA que 17,5% (14) das actinobactérias investigadas pertencem ao gênero *Streptomyces* e a diferentes espécies com similaridade acima de 96,77%, como pode ser observado na tabela 5.4.

**Tabela 5.4** – Linhagens mais próximas às actinobactérias isoladas de rizosferas de plantas da Caatinga após sequenciamento do gene 16S rRNA e análise no GenBank.

<b>Linhagens de actinobactérias</b>	<b>Linhagem tipo mais próxima</b>	<b>Similaridade (%)</b>	<b>Pares de bases (bp)</b>
<b>PR 02</b>	<i>Streptomyces naganishii</i> NBRC 12892	97,73	938
<b>PR 05</b>	<i>Streptomyces minutiscleroticus</i> NBRC 13000	99,66	908
<b>PR 12</b>	<i>Streptomyces naganishii</i> NBRC 12892	97,88	963
<b>PR 17</b>	<i>Streptomyces geysiriensis</i> NBRC 15413	98,52	979
<b>PR 32</b>	<i>Streptomyces naganishii</i> NBRC 12892	98,97	1113
<b>PR 34</b>	<i>Streptomyces fimbriatus</i> NBRC15411	98,06	965
<b>PR 37</b>	<i>Streptomyces fimbriatus</i> NBRC15411	97,97	961
<b>PR 68</b>	<i>Streptomyces naganishii</i> NBRC 12892	97,07	1198
<b>PR 78</b>	<i>Streptomyces noursei</i> NBRC 15452	99,03	1163
<b>PR 84</b>	<i>Streptomyces naganishii</i> NBRC 12892	99,46	1135
<b>PR 86</b>	<i>Streptomyces malachitofuscus</i> NBRC 13059	97,69	1201
<b>TUR 327</b>	<i>Streptomyces naganishii</i> NBRC 12892	98,08	1180
<b>TUR 495</b>	<i>Streptomyces capoamus</i> JCM 4734	96,77	969
<b>TUR 704</b>	<i>Streptomyces xanthocidicus</i> NBRC 13469	99,93	1432

Foi realizada árvore filogenética das actinobactérias correlacionando com micro-organismos mais próximos pela similaridade que estão depositadas no GenBank (Figura 5.15). Em relação às actinobactérias que se destacaram nos testes estatísticos, a linhagem PR 34 apresentou similaridade de 98,06% com *Streptomyces fimbriatus* NBRC15411 e a actinobactéria TUR 704 apresentou similaridade de 99,93% com *Streptomyces xanthocidicus* NBRC 13469.

**Figura 5.15** - Árvore filogenética ‘*Neighbor-Joining*’ referente as sequências do gene 16S rRNA das actinobactérias isoladas de plantas da Caatinga em relação a micro-organismos depositados no GenBank.



A região 16S rRNA tem aproximadamente 1500 bp e a amplificação desta região tem sido amplamente utilizada na identificação de bactérias e actinobactérias (VOLOKHOV et al., 2012).

Schrey et al. (2012) estudaram actinobactérias e as identificaram pelo sequenciamento do gene 16S mostrando que pertencem ao gênero *Streptomyces*. Assim como, Yandigeri et al. (2012) identificaram actinobactérias endofíticas, e entre estas, também foi observada a linhagem tipo mais próxima *Streptomyces geysiriensis* que produz ácido 3-indolacético e amônia. Dimkpa et al. (2008) avaliaram linhagens de *Streptomyces* spp. e foi possível a identificação da espécie *Streptomyces naganishii* também produtora de AIA.

No estudo de Palaniyandi et al. (2013) foram avaliadas actinobactérias associadas à rizosfera de inhame e foram identificados *S. fimbriatus* e *S. capoamus* pelo sequenciamento do gene 16S rRNA e foram descritas como produtoras de AIA além de substâncias antimicrobianas para controle biológico de fitopatógenos, como foi também observado neste estudo com as actinobactérias isoladas da Caatinga.

O gênero *Streptomyces*, como foi citado anteriormente, é amplamente distribuído em diversos habitats e apresentam rápido crescimento em cultivos convencionais sendo facilmente isolado em relação à outras actinobactérias (HOP et al., 2011). Por este motivo, os resultados encontrados na literatura corroboram com este estudo, pois o gênero *Streptomyces* foi o mais prevalente pela análise da micromorfologia e foi confirmado através do sequenciamento do gene 16S rRNA.



## 6) CONCLUSÕES

- Todas as actinobactérias isoladas de rizosferas de plantas da Caatinga (Pereiro, Capitão-do seco e Coroa-de-frade) apresentaram pelo menos dois mecanismos para promoção do crescimento vegetal, enquanto a linhagem PR 37 apresentou apenas um mecanismo para produção de amônia.
- As linhagens PR 34 e TUR 704 apresentaram características promissoras quanto a produção de auxina, amônia e solubilização de fosfato nos meios de cultura VERMA e NBRIP.
- Foi possível a identificação e quantificação do ácido 3-indolacético do extrato bruto da linhagem PR 34 por técnicas cromatográficas.
- O gênero *Streptomyces* prevaleceu na identificação pela técnica de microcultivo e no sequenciamento do gene 16S rRNA.
- Os resultados obtidos mostram que as actinobactérias isoladas de rizosferas de plantas da Caatinga são de grande importância na agricultura, pois apresentam mecanismos que auxiliam no desenvolvimento de plantas, sugerindo o potencial biotecnológico destas linhagens.

## 7) PERSPECTIVA

- Realizar testes *in vivo* em câmara de crescimento e em casa de vegetação para verificar o efeito da promoção de crescimento de plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. WALP.) pela presença das actinobactérias PR 34 e TUR 704 inoculadas isoladamente e em consórcio.

## 8) REFERÊNCIAS

- (ANVISA) AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. "Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos. Relatório de Atividades de 2001-2006." Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/residuos/rel\\_anual\\_2001-2006.pdf](http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/residuos/rel_anual_2001-2006.pdf)>.
- ABD-ALLA, M. H.; EL-SAYED, E. S. A.; RASMEY, A. H. M.. "Indole-3-Acetic Acid (IAA) Production by *Streptomyces atrovirens* Isolated from Rhizospheric Soil in Egypt." *Journal of Biology and Earth Sciences*, 3 (2): B182–B193. 2013.
- AMORA, T. D.; BELTRÃO-MENDES, R.; FERRARI, S. F. "Use of Alternative Plant Resources by Common Marmosets (*Callithrix jacchus*) in the Semi-arid Caatinga Scrub Forests of Northeastern Brazil." *American Journal of Primatology*, 75 (4): 333–341. 2013.
- ARAÚJO, F. F.; PEDROSO, R. A. B. "Interação de *Bacillus* sp. Com a Rizosfera de Três Espécies de Plantas Forrageiras" *Bioscience Journal*, 29 (1): 152–158. 2013.
- ARUN, B.; GOPINATH, B.; SHARMA S. "Plant Growth Promoting Potential of Bacteria Isolated on N Free Media from Rhizosphere of *Cassia occidentalis*." *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 28 (9): 2849–2857. 2012.
- BARRETO, T. R. "Densidade Populacional, Diversidade Genética E Atividade De Promoção De Crescimento De Actinomicetos Associados À Rizosfera De Cacaueiro." Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. 2007.
- BATISTA, W. B.; NOBRE, S. A. M.; NOBRE, P. B.; FERNANDES, B. H. A.; GOMES, H. A. R. G.; AGUIAR, R. M.; MELO, G. A.; PEREIRA, G. V. N. "Avaliação de Actinomicetos Com Potencial Para Promoção de Crescimento Em Plântulas de Tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) de Diferentes Cultivares" *Unimontes Científica*, 12 (1/2): 60–69. 2010.
- BERNARDO, G. R. B. "Atividade Antifúngica de Actinobactérias Da Rizosfera de *Terminalia fagifolia* (Bioma Caatinga) Ativas Contra *Candida* Spp." Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Pernambuco. 2012.
- BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle Biológico. In: BERGAMIN, A.F.; KIMATI, H.; AMORIN, L. "Manual De Fitopatologia. Princípios E Conceitos." 3ª ed. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 717-728. 1995.
- BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. "Plant Growth-promoting Rhizobacteria (PGPR): Emergence in Agriculture." *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 28 (4): 1327–1350. 2012.
- BLUMAN, A. G. "Elementary Statistics: A Step by Step Approach". 4<sup>th</sup> ed. chapter 13. 2001.
- BROOKS, D. D.; CHAN, R.; STARKS, E. R.; GRAYSTON, S. J.; JONES, M. D. "Ectomycorrhizal Hyphae Structure Components of the Soil Bacterial Community for Decreased Phosphatase Production." *FEMS Microbiology Ecology*, 76 (2) (May): 245–255. 2011.

CAMERINI, S.; SENATORE, B.; LONARDO, E.; IMPERLINI, E.; BIANCO, C.; MOSCHETTI, G.; ROTINO, G. L.; CAMPION, B.; DEFEZ, R. "Introduction of a Novel Pathway for IAA Biosynthesis to Rhizobia Alters Vetch Root Nodule Development." *Archives of Microbiology*, 190 (1): 67–77. 2008.

CANFIELD, D. E.; GLAZER, A. N.; FALKOWSKI, P. G. "The Evolution and Future of Earth's Nitrogen Cycle." *Science* 330: 192–196. 2010.

CAO, L.; QUI, Z.; YOU, J.; TAN, H.; ZHOU, S. "Isolation And Characterization Of Endophytic *Streptomyces* Strains From Surface-Sterilized Tomato (*Lycopersicum esculentum*) Roots." *Letters in Applied Microbiology*, 39: 425–430. 2004.

CARNEIRO-TORRES, D. S.; CORDEIRO, I.; GIULIETTI, A. M.; BERRY, P. E.; RIINA, R. "Three New Species of Croton (*Euphorbiaceae* s.s.) from the Brazilian Caatinga." *Brittonia*, 63 (1): 122–132. 2011.

CERIGIOLI, M. M. "Diversidade de Bactérias Endofíticas de Raízes de Milho (*Zea mays* L.) e Potencial Para Promoção Do Crescimento Vegetal". Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos. 2005.

(CLSI) CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. "Performance Standards For Antimicrobial Susceptibility Testing." 18<sup>th</sup> informational supplement. CLSI document M100-18. Wayne, PA. 2008.

CREMONESE, C.; FREIRE, C.; MEYER, A.; KOIFMAN, S. "Exposição a Agrotóxicos e Eventos Adversos Na Gravidez No Sul Do Brasil, 1996-2000." *Cadernos de Saúde Pública*, 28 (7): 1263–1272. 2012.

DANTAS, J. S.; SOUZA, A. P.; FARIAS, M. F.; NOGUEIRA, V. F. B. "Interações Entre Grupos de Microorganismos Com a Rizosfera." *Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia*, 2 (2): 213–218. 2009.

DASTAGER, S. G.; DEEPA C. K.; PANDEY, A. "Potential Plant Growth-promoting Activity of *Serratia nematodiphila* NII-0928 on Black Pepper (*Piper nigrum* L.)." *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27 (2): 259–265. 2011.

DI, H. J.; CAMERON, K. C.; SHEN, J. P.; WINEFIELD, C. S.; O'CALLAGHAN, M.; BOWATTE, S.; HE, J. Z. "Nitrification Driven by Bacteria and Not Archaea in Nitrogen-rich Grassland Soils." *Nature Geoscience*, 2: 621–624. 2009.

DIMKPA, C. O.; SVATOS, A.; DABROWSKA, P.; SCHMIDT, A.; BOLAND, W.; KOTHE, E. "Involvement of Siderophores in the Reduction of Metal-Induced Inhibition of Auxin Synthesis in *Streptomyces* Spp." *Chemosphere*, 74: 19–25. 2008.

DINIZ, P. F. A.; OLIVEIRA, L. E. M.; LOPES, N. A.; FLORENTINO, L. A.; CARVALHO, T. S.; MOREIRA, F. M. S. "Bactérias Diazotróficas Em Solos Sob Seringueira." *Revista Brasileira de Ciência Do Solo*, 36: 1426–1433. 2012.

EGLER, W. A. "Contribuição ao Estudo da Caatinga Pernambucana." *Revista Brasileira de Geografia*, (4): 577–590. 1951.

EL-TARABILY, K. A. "Promotion Of Tomato (*Lycopersicon Esculentum* Mill) Plant Growth By Rhizosphere Competent 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Deaminase-Producing Streptomycete Actinomycete." *Plant and Soil*, 308: 161-174. 2008.

FARIA, N. M. X. "Modelo de Desenvolvimento, Agrotóxicos e Saúde: Prioridades Para Um Agenda de Pesquisa e Ação." *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional*, 37 (125): 31–39. 2012.

FELSENSTEIN, J. "Confidence Limits on Phylogenies: an Approach Using the Bootstrap." *Evolution*, 39:783–791. 1985.

FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. S. "Microrganismos E Agrobiodiversidade: O Novo Desafio Para A Agricultura." Guaíba: Agrolivros, 568 p. 2008.

FIGUEIREDO, M. V. B.; KUKLINSKY-SOBRAL, J.; STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M. "Bactérias Promotoras Do Crescimento de Plantas: Estratégia Para Uma Agricultura Sustentável." In *Biotechnologia Aplicada à Agricultura: Textos de Apoio e Protocolos Experimentais*, 385–414. Recife/PE e Brasília/DF. 2010.

FIGUEIREDO, M. V. B.; SELDIN, L.; ARAUJO, F. F.; MARIANO, R. L. R. "Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Fundamentals and Applications." In *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*, 21–43. 2011.

GLICKMANN, E.; DESSAUX, Y. "A Critical Examination of the Specificity of the Salkowski Reagent for Indolic Compounds Produced by Phytopathogenic Bacteria." *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (2): 793–796. 1995.

GOODFELLOW, M.; FIEDLER, H. P. "A Guide to Successful Bioprospecting: Informed by Actinobacterial Systematics." *Antonie van Leeuwenhoek*, 98 (2): 119-142. 2010.

HAMEEDA, B.; HARINI. G.; RUPELA, O. P.; WANI, S. P.; REDDY, G. "Growth Promotion of Maize by Phosphate-solubilizing Bacteria Isolated from Composts and Macrofauna." *Microbiological Research*, 163 (2): 234–242. 2008.

HAYAT, R.; ALI, S.; AMARA, U.; KHALID, R.; AHMED, I. "Soil Beneficial Bacteria and Their Role in Plant Growth Promotion: a Review." *Annals of Microbiology*, 60 (4): 579–598. 2010.

HERNÁNDEZ-MENDOZA, J. L.; QUIROZ-VELÁSQUEZ, J. D.; MORENO-MEDINA, V. R.; MAYEK-PÉREZ, N. "Biosíntesis de Ácido Antranílico y Ácido Indolacético a Partir de Triptofano En Una Cepa de *Azospirillum brasilense* Nativa de Tamaulipas, México." *Avances En Investigación Agropecuaria*, 12 (1): 57–66. 2008.

HEUER, H.; SMALA, K. "Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) and Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE) for Studying Soil Microbial

Communities." In: van Elsas, J.D., Wellington, E.M.H., Trevors, J.T. (eds): *Modern Soil Microbiology*. Marcel Dekker New York, 353–373. 1997.

HOP, D. V.; SAKIYAMA, Y.; BINH, C. T. T.; OTOGURO, M.; HANG, D.T.; MIYADOH, S.; LUONG, D. T.; ANDO, K. "Taxonomic and Ecological Studies of Actinomycetes from Vietnam: Isolation and Genus-Level Diversity." *The Journal of Antibiotics*, 64: 599–606. 2011.

HUNG, P. Q.; KUMAR, S. M.; GOVINDSAMY, V.; ANNAPURNA, K. "Isolation and Characterization of Endophytic Bacteria from Wild and Cultivated Soybean Varieties." *Biology and Fertility of Soils* 44 (1): 155–162. 2007.

(IBGE) INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2004. "Mapas de Biomas e de Vegetação." Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>>. Acesso em: 25 ago. 2013.

JAVAID, M.; SULTAN, S. "Plant Growth Promotion Traits and Cr (VI) Reduction Potentials of Cr (VI) Resistant *Streptomyces* Strains." *Journal of Basic Microbiology*, 53 (5): 420–428. 2013.

JOG, R.; NARESHKUMAR, G.; RAJKUMAR, S. "Plant Growth Promoting Potential and Soil Enzyme Production of the Most Abundant *Streptomyces* Spp. from Wheat Rhizosphere." *Journal of Applied Microbiology*, 113: 1154–64. 2012.

JUKES, T. H.; CANTOR, C. R. "Evolution of protein molecules." In: Munro, H. N. (ed) *Mammalian protein metabolism*, vol 3. Academic Press, New York, pp 21–123. 1969.

KATAYAMA, M.; MASUI, Y.; KAGEYAMA, E.; KAWABATA, Y.; KANAYAMA, K. "4-Trifluoromethylindole-3 Acetic Acid: New Fluorinated Indole Auxin" *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 72 (8): 2025–2033. 2008.

KAVAMURA, V. N.; SANTOS, S. N.; SILVA, J. L.; PARMA, M. M.; AVILA, L. A.; VISCONTI, A.; ZUCCHI, T. D.; TAKETANI, R. G.; ANDREOTE, F. D.; MELO, I. S. "Screening of Brazilian Cacti Rhizobacteria for Plant Growth Promotion Under Drought." *Microbiological Research*, 168 (4): 183–91. 2012.

KIM, D.; CHUN, J.; SAHIN, N.; HAH, Y. C.; GOODFELLOW, M. "Analysis of Thermophilic Clades Within the Genus *Streptomyces* by 16S rRNA Ribosomal DNA Sequence Comparisons. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46:581–587. 1996.

KIM, O. S.; CHO, Y. J.; LEE, K.; YOON, S. H.; KIM, M.; NA, H.; PARK, S.C.; JEON, Y. S.; LEE, J. H.; YI, H.; WON, S.; CHUN, J. "Introducing EzTaxon-e: a Prokaryotic 16S rRNA Gene Sequence Database with Phylotypes that Represent Uncultured Species." *International Journal of Systematic Microbiology*, 62:716–721. 2012.

KUKLINSKY-SOBRAL, J. "A Comunidade Bacteriana Endofítica e Epifítica de Soja (*Glycine max*) e Estudo Da Interação Endófitos-planta". Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo. 2003.

- KUMAR, P.; DUBEY, R. C.; MAHESHWARI, D. K. "Bacillus Strains Isolated from Rhizosphere Showed Plant Growth Promoting and Antagonistic Activity Against Phytopathogens." *Microbiological Research*, 167 (8): 493–9. 2012.
- LEGAULT, G. S.; LERAT, S.; NICOLAS, P.; BEAULIEU, C. "Tryptophan Regulates Thaxtomin A and Indole-3-Acetic Acid Production in *Streptomyces scabiei* and Modifies Its Interactions wi Radish Seedlings." *Phytopathology*, 101 (9): 1045–1051. 2011.
- LEHMANN, T.; HOFFMANN, M.; HENTRICH, M.; POLLMANN, S. "Indole-3-acetamide-dependent Auxin Biosynthesis: a Widely Distributed Way of Indole-3-acetic Acid Production?" *European Journal of Cell Biology*, 89 (12): 895–905. 2010.
- LIMA, G. M. S. "Toxinas Recombinantes Cry2Aa e Cry11A de *Bacillus thuringiensis* Expressas Em Células de Inseto São Tóxicas Para Larvas de Lepidoptera e Diptera". Tese de Doutorado. Departamento de Biologia Celular. Universidade de Brasília. 2009.
- LIN, L.; XU, X. "Indole-3-Acetic Acid Production by Endophytic *Streptomyces* sp. En-1 Isolated from Medicinal Plants." *Current Microbiology*, 67 (2): 209–217. 2013.
- LINS, C. V. "Isolamento e avaliação da atividade antimicrobiana de actinobactérias da rizosfera da planta catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul.)." Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Pernambuco. 2012.
- LINS, M. R. C. R. "Bactérias endofíticas com potencial para promoção de crescimento vegetal." Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Pernambuco. 2012.
- LOPER, J. E.; SCHROTH, M. N. "Influence of Bacterial Sources of Indole-3-acetic on Root Elongation of Sugar Beet." *Phytopathology*, 76 (4): 386-389.
- LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. "Pant-growth-promoting Rhizobacteria." *Annual Reviem of Microbiology*, 63: 541–556. 2009.
- MA, Y.; PRASAD, M. N. V.; RAJKUMAR, M.; FREITAS, H. "Plant Growth Promoting Rhizobacteria and Endophytes Aceletare Phytoremediation of Metalliferous Soils." *Biotechnology Advances*, 29: 248–258. 2011.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARCK, D. P. "Microbiologia de Brock." Porto Alegre: Artmed, 2010. Cap. 4 e 27. 2010.
- MAIER, R. M.; PEPPER, I. L. "Distribution Of Microorganisms In Soil." In: MAIER, R. M.; PEPPER, I. L; GERBA, C. P. (eds), *Environmental microbiology*. Academic Press, San Diego. 2ªed. p. 57-76. 2009.
- MARDAD, I.; SERRANO, A.; SOUKRI, A. "Solubilization of Inorganic Phosphate and Production of Organic Acids by Bacteria Isolated from a Moroccan Mineral Phosphate Deposit" *African Journal of Microbiology Research*, 7 (8): 626–635. 2013.
- MEENA, B.; RAJAN, L. A.; VINITHKUMAR, N. V.; KIRUBAGARAN, R. "Novel Marine Actinobacteria from Emerald Andaman & Nicobar Islands: a Prospective Source for Industrial and Pharmaceutical Byproducts." *BMC Microbiology*, 13: 1-17. 2013.

MEHNAZ, S.; BAIG, D. B.; LAZAROVITS, G. "Genetic and Phenotypic Diversity of Plant Growth Promoting Rhizobacteria Isolated from Sugarcane Plants Growing in Pakistan." *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20: 1614–1623. 2010.

MENDES, I. C.; REIS-JUNIOR, F. B.; HUNGRIA, M.; FERNANDES, M. F.; CHAER, G. M.; MERCANTE, F. M.; ZILLI, J. E. "Microbiologia Do Solo e Sustentabilidade de Sistemas Agrícolas." In *Biotecnologia: Estado Da Arte e Aplicações Na Agropecuária*, 219–246. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 2011.

MERZAEVA, O. V.; SHIROKIKH, I. G. "The Production of Auxins by the Endophytic Bacteria of Winter Rye." *Applied Biochemistry and Microbiology*, 46 (1): 44–50. 2010.

MMA) MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE; (IBAMA) INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. "Monitoramento Do Desmatamento Nos Biomas Brasileiros Por Satélite." Brasília, D.F. 2011.

NADARASAH, G.; STAVRINIDES, J. "Insects as Alternative Hosts for Phytopathogenic Bacteria." *FEMS Microbiology Reviews*, 35: 555–575. 2011.

NASCIMENTO, C. S.; JÚNIOR, M. A. L.; STAMFORD, N. P.; FREIRE, M. B. G. S.; SOUSA, C. A. "Nodulação e Produção do Caupi (*Vigna unguiculata* L. WALP) Sob Efeito de Plantas de Cobertura e Inoculação." *Revista Brasileira de Ciência Do Solo*, 32: 579–587. 2008.

NASSAR, A. M. "Produtos Da Agroindústria de Exportação Brasileira: Uma Análise Das Barreiras Tarifárias Impostas Por Estados Unidos e União Européia". Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade/ Departamento de Administração. Universidade de São Paulo. 2004.

NIMNOI, P.; PONGSILP, N.; LUMYONG, S. "Endophytic Actinomycetes Isolated from *Aquilaria crassna* Pierre Ex Lec and Screening of Plant Growth Promoters Production." *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26 (2): 193–203. 2010.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I. "Processos e Mecanismos Envolvidos Na Influência de Microrganismos Sobre o Crescimento Vegetal". Embrapa Agrobiologia, 161. Seropédica. 2003.

OLIVEIRA, K. M.; LUCCHESI, G. "Controle Sanitário de Agrotóxicos No Brasil: o Caso Do Metamidofós." *Tempus - Actas de Saúde Coletiva*: 211–224. 2013.

PALANIYANDI, S. A.; YANG, S. H.; ZHANG, L.; SUH, J. W. "Effects of Actinobacteria on Plant Disease Suppression and Growth Promotion." *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97: 9621–9636. 2013.

PATTEN, C. L.; BLAKNEY, A. J. C.; COULSON, T. J. D. "Activity, Distribution and Function of Indole-3-acetic Acid Biosynthetic Pathways in Bacteria". *Critical Reviews in Microbiology*, 39 (4): 395–415. 2013.



PROCÓPIO, R. E. L.; SILVA, I. R.; MARTINS, M. K.; AZAVEDO, J. L.; ARAÚJO, J. M. "Antibiotics Produced by *Streptomyces*" *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16 (5): 466–471. 2012.

QIN, S.; XING, K.; JIANG, J. H.; XU, L. H.; LI, W. J. "Biodiversity, Bioactive Natural Products and Biotechnological Potential of Plant-associated Endophytic Actinobacteria." *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89 (3): 457–73. 2011.

RAJKUMAR, J.; SWARNAKUMAR, N. S.; SIVAKUMAR, K.; THANGARADJOU, T.; KANNAN, L. "Actinobacterial Diversity of Mangrove Environment of the Bhitharkanika Mangroves, East Coast of Orissa, India." *International Journal of Scientific and Research Publications*, 2 (2): 11–16. 2012.

RIBEIRO, C. M.; CARDOSO, E. J. B. N. "Isolation, Selection and Characterization of Root-associated Growth Promoting Bacteria in Brazil Pine (*Araucaria angustifolia*)." *Microbiological Research*, 167 (2): 69–78. 2012.

RODRÍGUEZ, A. M. "Caracterización de Distintos Péptidos Antimicrobianos con Actividad Frente a Hongos Fitopatógenos de Interés Agroalimentario." Tese de Doutorado. Departamento de Tecnología de Alimentos. Universidade Politécnica de Valencia. 2008.

RUANPANUN, P.; TANGCHITSOMKID, N.; HYDE, K. D.; LUMYONG, S. "Actinomycetes and Fungi Isolated from Plant-parasitic Nematode Infested Soils: Screening of the Effective Biocontrol Potential, Indole-3-acetic Acid and Siderophore Production." *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26 (9): 1569–1578. 2010.

SAITOU, N.; NEI, M. "The Neighbour-Joining Method: a New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees." *Molecular Biology and Evolution*, 4:404–425. 1987.

SAMBROOK, J.; FRITSCHI, E. F.; MANIATIS, T. "Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 1989.

SANTOS, S. N. "Bioprospecção de Biomoléculas Isoladas de Fungos Endofíticos de *Combretum leprosum* Do Bioma Caatinga". Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ)/ Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba - SP. 2012.

SARKAR, A.; ISLAM, T.; BISWAS, G. C.; ALAM, S.; HOSSAIN, M.; TALUKDER, N. M. "Screening for Phosphate Solubilizing Bacteria Inhabiting the Rhizosphere of Rice Grown in Acidic Soil in Bangladesh." *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 59 (2): 199–213. 2012.

SCHREY, S. D.; ERKENBRACK, E.; FRUH, E.; FENGLER, S.; HOMMEL, K.; HORLACHER, N.; SCHULZ, D. "Production of Fungal and Bacterial Growth Modulating Secondary Metabolites Is Widespread among Mycorrhiza-Associated Streptomyces." *BMC Microbiology* 12: 164. 2012.

SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. "Biotecnologia: Avanços Na Agricultura E Na Agroindústria." Caxias do Sul: EDUCS. 2002.

SHAHAB, S.; AHMED N.; KHAN, N. S. "Indole Acetic Acid Production and Enhanced Plant Growth Promotion by Indigenous PSBs." *African Journal of Agricultural Research*, 4 (11): 1312–1316. 2009.

SHAHI, S. K.; RAI, A. K.; TYAGI, M. B.; SINHA, R. P.; KUMAR, A. "Rhizosphere of Rice Plants Harbor Bacteria with Multiple Plant Growth Promoting Features." *African Journal of Biotechnology*, 10 (42): 8296–8305. 2011.

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D. "Methods for Characterization of *Streptomyces* Species." *International Journal of Systematic Bacteriology*, 16: 313-340. 1966.

SHOKRI, D.; EMTIAZI, G. "Indole-3-acetic Acid (IAA) Production in Symbiotic and Non-symbiotic Nitrogen-fixing Bacteria and Its Optimization by Taguchi Design." *Current Microbiology*, 61 (3): 217–25. 2010.

SILVA, L. M. F.; ARAÚJO, G. T.; SILVA, A. D. V.; JUNIOR, M. V.; CARVALHO, C. M. "Levantamento Dos Agrotóxicos Utilizados Na Horticultura No Município de Ubajara-CE." *Revista Brasileira de Agricultura Irrigada*, 5 (4): 280–285. 2011.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. "Solubilização De Fosfatos Por Microrganismos Na Presença De Fontes De Carbono." *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 24 (2): 311-319. 2000.

SOARES, E. C. L.; COSTA, E. P.; SILVA, L. C. N.; ARAÚJO, J. M. "Isolamento, Identificação e Atividade Antimicrobiana de *Streptomyces* Sp. UFPE 968." *Scientia Plena*, 8 (12): 01–07. 2012.

SOARES-JR., F. L.; MELO, I. S.; DIAS, A. C. F.; ANDREOTE, F. D. "Cellulolytic Bacteria From Soils in Harsh Environments." *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28 (5): 2195-2203. 2012.

SOLANS, M.; VOBIS, G.; CASSÁN, F.; LUNA, V.; WALL, L. G. "Production of Phytohormones by Root-associated Saprophytic Actinomycetes Isolated from the Actinorhizal Plant *Ochetophila trinervis*." *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27 (9): 2195–2202. 2011.

SOUSA, C. A. "Solubilização de Fósforo Por Bactérias Endofíticas". Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2010.

STACH, J. E. M.; MALDONADO, L. A.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M.; BULL, A. T. "New Primers for the Class Actinobacteria: Application to Marine and Terrestrial Environments." *Environmental Microbiology*, 5: 828–841. 2003.

TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. "Áreas e Ações Prioritárias Para a Conservação Da Biodiversidade Da Caatinga." 47-52. 2000.

TAECHOWISAN, T.; PEBERDY, J. F.; LUMYONG, S. "Isolation Of Endophytic Actinomycetes From Selected Plants And Their Antifungal Activity." *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19: 381-385. 2003.

- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. "MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28:2731–2739. 2011.
- THAMDRUP, B. "New Pathways and Processes in the Global Nitrogen Cycle." *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 43: 407–428. 2012.
- TIAN, X.; ZHENG, Y. "Evaluation of Biological Control Agents for *Fusarium* Wilt in *Hiemalis Begonia*." *Canadian Journal of Plant Pathology*, 35 (3): 363–370. 2013.
- TRIAS, R.; BAÑERAS, L.; MONTESINOS, E.; BADOSA, E. "Lactic Acid Bacteria from Fresh Fruit and Vegetables as Biocontrol Agents of Phytopathogenic Bacteria and Fungi." *Internacional Microbiology*, 11: 231–236. 2008.
- TSAVKELOVA, E.; OESER, B.; YOUNG, L. O.; ISRAELI, M.; SASSON, Y.; TUDZYNSKI, B.; SHARON, A. "Identification and Functional Characterization of Indole-3-acetamide-mediated IAA Biosynthesis in Plant-associated *Fusarium* Species." *Fungal Genetics and Biology*, 49 (1): 48–57. 2012.
- VASCONCELLOS, R. L. F.; SILVA, M. C. P.; RIBEIRO, C. M.; CARDOSO, E. J. B. N. "Isolation and Screening for Plant Growth-promoting (PG) Actinobacteria from *Araucaria angustifolia* Rhizosphere Soil." *Scientia Agricola*, 67 (6): 743–746. 2010.
- VENTURI, V.; FUQUA, C. "Chemical Signaling Between Plants and Plant-pathogenic Bacteria." *Annual Review of Phytopathology* 51: 17–37. 2013.
- 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*, 91: 127–141. 2001.
- VOLOKHOV, D. V.; SIMONYAN, V.; DAVIDSON, M. K.; CHIZHIKOV, V. E. "RNA Polymerase Beta Subunit (rpoB) Gene and the 16S-23S rRNA Intergenic Transcribed Spacer Region (ITS) as Complementary Molecular Markers in Addition to the 16S rRNA Gene for Phylogenetic Analysis and Identification of the Species of the Family Mycoplasm." *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62: 515–528. 2012.
- YAGUE, P.; LÓPEZ-GARCÍA, M. T.; RIOSERAS, B.; SÁNCHEZ, J.; MANTECA, Á. "Pre-Sporulation Stages of *Streptomyces* Differentiation: State-of-the-Art and Future Perspectives." *FEMS Microbiology Letters*, 342 (2): 79–88. 2013.
- YANDIGERI, M. S.; MEENA, K. K.; SINGH, D.; MALVIYA, N.; SINGH, D. P.; SOLANKI, M. K.; YADAV, A. K.; ARORA, D. K. "Drought-Tolerant Endophytic Actinobacteria Promote Growth of Wheat (*Triticum aestivum*) under Water Stress Conditions." *Plant Growth Regulation*, 68: 411–420. 2012.
- WHITMAN, W. B.; GOODFELLOW, M.; KÄMPFER, P.; BUSSE, H. J.; TRUJILLO, M. E.; LUDWIG, W.; SUZUKI, K. I.; PARTE, A. "Bergey's Manual® Of Systematic Bacteriology." vol. 5. Springer. 2012.

YOUNG, L. S.; HAMEED, A.; PENG, S. Y.; SHAN, Y. H.; WU, S. P. "Endophytic Establishment of the Soil Isolate *Burkholderia* sp. CC-A174 Enhances Growth and P-utilization Rate in Maize (*Zea mays* L.)." *Applied Soil Ecology*, 66: 40–47. 2013.

ZAKHAROVA, E.; SHCHERBAKOV, A.; BRUDNIK, V.; SKRIPKO, N.; BULKHIN, N.; IGNATOV, V. "Biosynthesis of Indole-3-acetic Acid in *Azospirillum brasilense*. Insights from Quantum Chemistry." *European Journal of Biochemistry*, 259: 572–576. 1999.

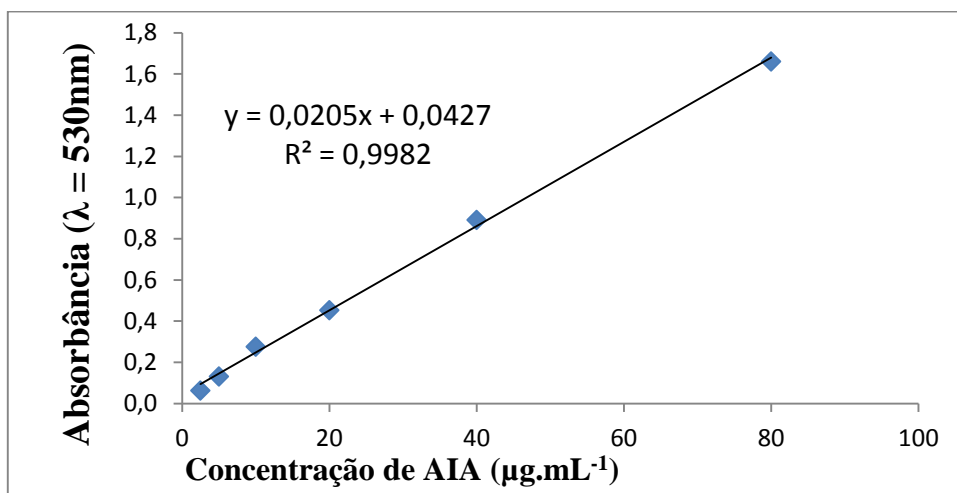
ZAPATA, F.; AXMANN, H. "<sup>32</sup>P Isotopic Techniques for Evaluating the Agronomic Effectiveness of rock Phosphate Materials." *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 41 (3): 189–195. 1995.

ZAPPI, D. "Fitofisionomia Da Caatinga Associada à Cadeia Do Espinheiro." *Megadiversidade* 4: 34–38. 2008.

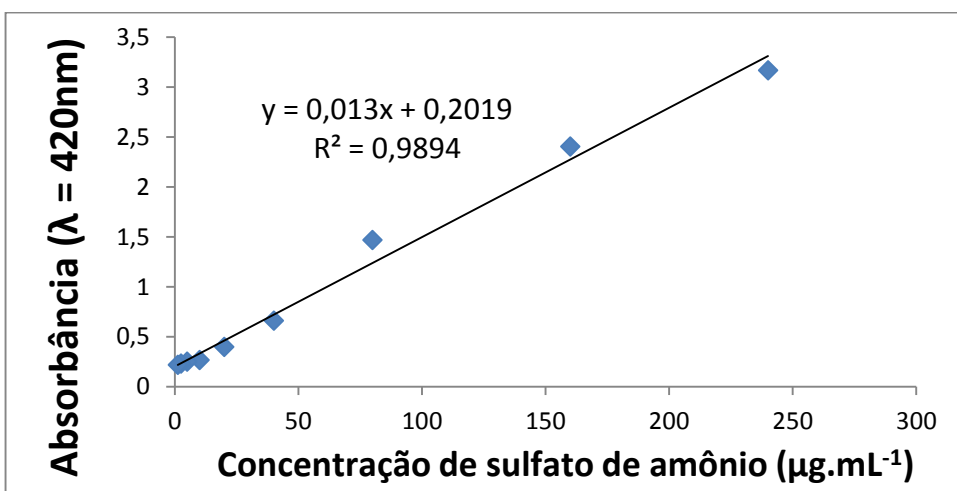
ZILLI, J. É.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; COUTINHO, H. L. C.; NEVES, M. C. P. "Diversidade Microbiana Como Indicador De Qualidade Do Solo" *Cadernos de Ciência & Tecnologia*, 20 (3): 391–411. 2003.

## APÊNDICES

### A. Equação da curva-padrão do ácido 3-indolacético.



### B. Equação da curva-padrão de sulfato de amônio.



C. Resultados gerais relacionados aos mecanismos de promoção do crescimento vegetal obtidos das actinobactérias isoladas de rizosferas de plantas da Caatinga.

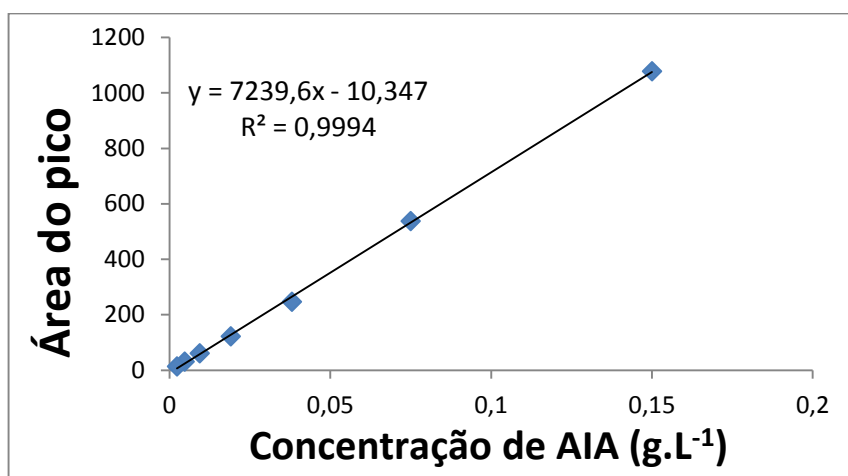
Linhasgens	IS	IS	AIA	Halo de inibição (mm)			Fosfatase	Amônia
	(VERMA)	(NBRIP)	( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	( <i>X. campestris</i> )	( <i>Colletotrichum</i> sp.)	( <i>F. oxysporum</i> )		( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )
PR 01	1,79 $\pm$ 0,06	1,27 $\pm$ 0,02	-	-	-	-	> 1 cm	122,26 $\pm$ 3,84
PR 02	1,61 $\pm$ 0,09	1,26 $\pm$ 0,13	4,04 $\pm$ 0,78	-	-	-	> 1 cm	186,00 $\pm$ 5,00
PR 03	1,15 $\pm$ 0,05	1,29 $\pm$ 0,00	-	-	-	-	> 1 cm	251,72 $\pm$ 70,23
PR 04	1,38 $\pm$ 0,18	1,40 $\pm$ 0,00	-	-	-	-	> 1 cm	292,31 $\pm$ 0,96
PR 05	1,75 $\pm$ 0,08	-	2,12 $\pm$ 0,36	-	-	-	> 1 cm	254,26 $\pm$ 45,87
PR 09	1,29 $\pm$ 0,10	-	-	17,3 $\pm$ 1,9	19,0 $\pm$ 2,2	-	< 1 cm	46,92 $\pm$ 3,22
PR 12	1,50 $\pm$ 0,09	-	-	-	-	-	> 1 cm	162,92 $\pm$ 10,37
PR 14	1,21 $\pm$ 0,08	1,33 $\pm$ 0,00	5,55 $\pm$ 0,20	-	-	-	> 1 cm	184,85 $\pm$ 35,38
PR 15	1,89 $\pm$ 0,08	-	9,91 $\pm$ 1,02	-	-	-	> 1 cm	157,59 $\pm$ 10,29
PR 17	1,26 $\pm$ 0,07	1,46 $\pm$ 0,12	19,29 $\pm$ 0,22	23,7 $\pm$ 0,9	-	-	> 1 cm	162,05 $\pm$ 9,26
PR 19	1,15 $\pm$ 0,04	-	-	-	-	-	> 1 cm	8,05 $\pm$ 0,15
PR 20	1,53 $\pm$ 0,08	-	18,48 $\pm$ 2,03	-	-	-	> 1 cm	14,46 $\pm$ 0,63
PR 22	1,35 $\pm$ 0,11	-	12,88 $\pm$ 0,54	-	26,7 $\pm$ 3,4	24,3 $\pm$ 3,1	> 1 cm	119,56 $\pm$ 18,82
PR 23	1,59 $\pm$ 0,09	-	29,71 $\pm$ 0,57	-	-	-	> 1 cm	-
PR 25	1,46 $\pm$ 0,12	-	11,97 $\pm$ 0,91	-	27,7 $\pm$ 0,5	24,3 $\pm$ 2,9	> 1 cm	28,67 $\pm$ 0,44
PR 26	1,48 $\pm$ 0,14	-	12,14 $\pm$ 1,33	-	-	-	> 1 cm	24,56 $\pm$ 0,39
PR 27	1,48 $\pm$ 0,03	-	23,86 $\pm$ 2,30	-	-	-	> 1 cm	166,87 $\pm$ 45,81
PR 29	1,22 $\pm$ 0,04	-	18,45 $\pm$ 2,91	-	-	-	< 1 cm	60,90 $\pm$ 11,89
PR 32	1,67 $\pm$ 0,14	-	5,40 $\pm$ 1,11	-	-	-	> 1 cm	128,46 $\pm$ 3,57
PR 33	1,24 $\pm$ 0,09	-	6,98 $\pm$ 2,79	-	-	-	> 1 cm	167,15 $\pm$ 24,53
PR 34	1,36 $\pm$ 0,08	2,00 $\pm$ 0,59	53,57 $\pm$ 6,83	-	-	-	> 1 cm	227,21 $\pm$ 63,91
PR 35	1,68 $\pm$ 0,11	1,67 $\pm$ 0,24	12,20 $\pm$ 1,04	-	-	-	> 1 cm	151,36 $\pm$ 3,33
PR 36	1,26 $\pm$ 0,05	2,25 $\pm$ 1,05	12,09 $\pm$ 0,78	-	-	-	> 1 cm	139,90 $\pm$ 3,74
PR 37	-	-	-	-	-	-	-	152,13 $\pm$ 3,96
PR 38	-	-	76,48 $\pm$ 1,3	-	-	-	-	95,54 $\pm$ 12,16

<b>PR 39</b>	1,57 ± 0,17	-	4,59 ± 0,14	-	-	-	> 1 cm	-
<b>PR 45</b>	1,59 ± 0,16	-	-	-	-	-	> 1 cm	19,67 ± 3,41
<b>PR 46</b>	1,75 ± 0,08	-	5,29 ± 0,75	-	-	-	> 1 cm	135,36 ± 12,10
<b>PR 53</b>	1,86 ± 0,00	-	5,23 ± 2,27	-	-	-	> 1 cm	141,38 ± 2,08
<b>PR 55B</b>	1,40 ± 0,03	-	8,49 ± 1,53	-	-	-	> 1 cm	-
<b>PR 61</b>	1,27 ± 0,15	-	29,63 ± 1,31	-	-	-	> 1 cm	133,54 ± 9,96
<b>PR 63</b>	1,37 ± 0,09	-	-	-	-	-	> 1 cm	196,74 ± 0,27
<b>PR 66</b>	1,39 ± 0,07	-	21,18 ± 2,00	-	-	-	> 1 cm	73,47 ± 16,40
<b>PR 67</b>	2,17 ± 0,00	-	-	-	-	-	> 1 cm	145,05 ± 22,24
<b>PR 68</b>	1,64 ± 0,19	-	-	-	-	-	> 1 cm	162,79 ± 3,86
<b>PR 71</b>	1,64 ± 0,14	-	11,78 ± 1,35	-	-	-	> 1 cm	172,23 ± 8,84
<b>PR 76</b>	1,68 ± 0,19	-	23,00 ± 0,47	-	-	-	< 1 cm	17,08 ± 2,88
<b>PR 78</b>	-	-	1,97 ± 0,3	16,7 ± 0,5	19,7 ± 1,7	-	< 1 cm	118,77 ± 9,22
<b>PR 79</b>	1,63 ± 0,17	-	8,40 ± 0,76	-	-	-	> 1 cm	158,87 ± 21,57
<b>PR 80</b>	-	-	16,17 ± 0,32	-	-	-	< 1 cm	162,62 ± 3,03
<b>PR 82</b>	1,95 ± 0,06	-	8,17 ± 0,30	-	-	-	> 1 cm	171,00 ± 20,52
<b>PR 84</b>	1,42 ± 0,10	-	6,76 ± 0,95	-	-	-	> 1 cm	135,92 ± 11,21
<b>PR 86</b>	1,40 ± 0,07	-	12,40 ± 0,48	-	-	29,7 ± 0,5 (halo parcial)	> 1 cm	33,46 ± 0,29
<b>PR 87</b>	1,36 ± 0,05	-	14,59 ± 0,61	-	-	-	< 1 cm	36,95 ± 5,62
<b>PR 88A</b>	1,54 ± 0,12	-	14,07 ± 1,16	-	-	-	< 1 cm	-
<b>PR 88B</b>	-	-	16,92 ± 1,39	-	-	-	> 1 cm	55,85 ± 6,14
<b>PR 89</b>	1,38 ± 0,14	-	15,00 ± 2,21	-	-	-	< 1 cm	23,42 ± 6,13
<b>PR 90</b>	2,05 ± 0,07	-	11,13 ± 2,01	-	-	-	> 1 cm	53,36 ± 16,21
<b>PR 91</b>	1,62 ± 0,07	-	15,76 ± 2,48	-	-	-	> 1 cm	34,12 ± 2,45
<b>PR 92</b>	1,79 ± 0,30	-	46,36 ± 0,90	-	-	-	> 1 cm	43,65 ± 6,37
<b>PR 93</b>	1,38 ± 0,10	-	30,25 ± 0,77	-	25,7 ± 1,2	18 ± 1,4	> 1 cm	22,71 ± 0,22
<b>PR 94</b>	1,36 ± 0,10	-	1,75 ± 0,54	-	-	-	> 1 cm	74,54 ± 18,77
<b>PR 95</b>	1,57 ± 0,18	-	7,94 ± 0,71	-	-	-	> 1 cm	40,15 ± 6,64

<b>PR 96</b>	1,72 ± 0,18	-	9,99 ± 1,06	-	-	-	> 1 cm	14,38 ± 0,13
<b>PR 97</b>	1,48 ± 0,08	-	11,89 ± 2,39	-	-	-	> 1 cm	17,97 ± 0,85
<b>PR 97B</b>	1,63 ± 0,14	-	11,24 ± 0,26	-	-	-	> 1 cm	38,38 ± 3,35
<b>PR 98</b>	1,50 ± 0,31	-	73,36 ± 2,82	-	-	-	> 1 cm	39,59 ± 5,45
<b>PR 99</b>	1,63 ± 0,09	-	8,67 ± 0,51	-	-	-	> 1 cm	54,38 ± 6,27
<b>PR 100</b>	1,45 ± 0,24	-	5,81 ± 0,09	-	-	-	> 1 cm	63,59 ± 6,93
<b>MCR 25</b>	1,52 ± 0,03	-	12,49 ± 1,00	-	-	-	> 1 cm	178,08 ± 25,86
<b>MCR 28</b>	1,15 ± 0,01	-	5,21 ± 1,04	-	-	-	< 1 cm	103,97 ± 6,00
<b>MCR 29</b>	1,23 ± 0,04	1,28 ± 0,06	3,11 ± 0,62	-	-	-	< 1 cm	107,33 ± 8,04
<b>MCR 39</b>	1,24 ± 0,01	1,47 ± 0,10	10,43 ± 0,84	-	-	-	< 1 cm	232,44 ± 53,29
<b>MCR 40</b>	1,19 ± 0,09	1,64 ± 0,31	6,74 ± 1,10	-	-	-	< 1 cm	118,08 ± 4,75
<b>MCR 716</b>	1,23 ± 0,11	1,40 ± 0,00	5,18 ± 1,69	-	-	-	< 1 cm	12,28 ± 2,47
<b>TUR 02</b>	1,86 ± 0,49	1,44 ± 0,26	11,42 ± 0,50	-	-	-	> 1 cm	3,59 ± 0,01
<b>TUR 05</b>	1,50 ± 0,28	1,53 ± 0,05	17,80 ± 0,47	-	-	-	< 1 cm	8,46 ± 1,65
<b>TUR 10</b>	1,33 ± 0,04	1,25 ± 0,00	16,74 ± 2,43	-	25,0 ± 0,0	-	> 1 cm	39,36 ± 13,47
<b>TUR 11</b>	1,23 ± 0,05	-	11,29 ± 1,03	-	25,0 ± 1,4	20,7 ± 0,9	> 1 cm	101,94 ± 17,72
<b>TUR 13</b>	1,50 ± 0,10	-	10,69 ± 0,88	-	34,0 ± 0,8	25,3 ± 0,5	> 1 cm	62,97 ± 7,16
<b>TUR 17</b>	1,35 ± 0,06	1,33 ± 0,02	13,27 ± 1,24	-	23,3 ± 1,7	-	> 1 cm	19,13 ± 0,33
<b>TUR 81</b>	1,25 ± 0,07	-	7,93 ± 0,50	-	15,5 ± 0,5	16,3 ± 1,2	> 1 cm	-
<b>TUR 326</b>	1,18 ± 0,06	-	10,02 ± 0,70	-	15,5 ± 0,5	18,5 ± 1,5	> 1 cm	53,29 ± 7,38
<b>TUR 327</b>	1,22 ± 0,04	-	10,67 ± 1,25	-	-	-	< 1 cm	40,44 ± 8,41
<b>TUR 495</b>	1,32 ± 0,08	-	19,91 ± 0,64	18,3 ± 2,4	-	-	< 1 cm	-
<b>TUR 701</b>	1,42 ± 0,07	1,50 ± 0,01	10,36 ± 0,56	-	-	-	> 1 cm	-
<b>TUR 703</b>	1,41 ± 0,07	1,18 ± 0,00	9,68 ± 0,29	-	-	-	> 1 cm	-
<b>TUR 704</b>	1,43 ± 0,16	1,68 ± 0,11	36,06 ± 4,74	16,5 ± 0,5	-	-	< 1 cm	203,00 ± 0,36
<b>TUR 716</b>	1,73 ± 0,07	1,64 ± 0,06	4,80 ± 1,13	-	-	-	< 1 cm	-
<b>TUR 742</b>	1,23 ± 0,05	1,60 ± 0,07	6,64 ± 0,48	-	-	-	< 1 cm	-



**D.** Equação da curva-padrão do padrão AIA obtida através da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).



## ANEXOS

### A. International Streptomyces Project Medium 2 (Caldo ISP-2)

Extrato de levedura .....4 g  
 Extrato de malte .....10 g  
 Dextrose .....4 g  
 Água destilada .....1000 mL  
 (pH 7,2)

### B. International Streptomyces Project Medium 2 (ISP-2)

Extrato de levedura .....4 g  
 Extrato de malte .....10 g  
 Dextrose .....4 g  
 Ágar .....15 g  
 Água destilada .....1000 mL  
 (pH 7,2)

### C. Internacional Streptomyces Project Medium 3 (ISP-3)

Farinha de aveia .....20g  
 Solução de traços de sais .....1mL  
 Ágar .....15 g  
 Água destilada .....1000 mL

\*Solução de traços de sais:

FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O .....0,1 mg  
 MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O .....0,1 mg  
 ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O .....0,1 mg  
 Água destilada .....1000 mL

### D. International Streptomyces Project Medium 5 (ISP-5)

L-asparagina .....1 g  
 Glicerol .....10 g  
 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> .....1 g  
 \*Solução de traços de sais .....1 mL

Ágar .....15 g  
 Água destilada .....1000 mL  
 (pH 7,0-7,4)

\*Solução de traços de sais:

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  .....0,1 mg  
 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  .....0,1 mg  
 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  .....0,1 mg  
 Água destilada .....1000 mL

### **E. Meio King B**

Proteose peptona .....20g  
 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ .....1,5 g  
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  .....1,5 g  
 Glicose .....10 g  
 Água destilada .....1000 mL  
 (pH 7,4)

### **F. Reagente de Salkowski**

$\text{FeCl}_3$  .....0,5 mol.L<sup>-1</sup>  
 $\text{H}_2\text{SO}_4$  .....7.9 mol.L<sup>-1</sup>

### **G. Meio VERMA**

Glicose .....10 g  
 $\text{CaHPO}_4$  .....8,95 g  
 NaCl .....1 g  
 $\text{NH}_4\text{Cl}$  .....1 g  
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  .....1 g  
 Ágar .....15 g  
 Água destilada .....1000 mL  
 (pH 7,2)

**H. Meio NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate Solubilization)**

Glicose .....	10 g
CaHPO <sub>4</sub> .....	8,95 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	0,25 g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O .....	5 g
KCl .....	0,2 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	0,1 g
Ágar .....	15 g
Água destilada .....	1000 mL
(pH 7,0)	

**I. Meio ISP-2 com difosfato de fenolftaleína**

Extrato de levedura .....	4 g
Extrato de malte .....	10 g
Dextrose .....	4 g
Ágar .....	15 g
Água destilada .....	1000 mL
(pH 7,2)	

Após a autoclavação, o meio ISP-2 em temperatura a 50°C é suplementado com solução de difosfato de fenolftaleína a 0,5% previamente filtrada (membrana de 0,22 µm) na proporção de 50:1 (v/v).

**J. Meio Sabouraud**

Peptona bacteriológica .....	10 g
Glicose .....	40 g
Ágar .....	15 g
Água destilada .....	1000 mL
(pH 5,6)	

**K. Meio Müller-Hinton**

Extrato de carne ..... 5 g  
 Peptona bacteriológica ..... 17,5 g  
 Amido ..... 15 g  
 (pH 7,0)

**L. Reagente de Nessler**

HgI<sub>2</sub> ..... 10%  
 KI ..... 7%  
 Solução de NaOH (32%) ..... 50%

**M. Tampão TAS**

Tris-HCl ..... 50 mmol.L<sup>-1</sup>  
 EDTA (pH 8,0) ..... 50 mmol.L<sup>-1</sup>  
 NaCl ..... 150 mmol.L<sup>-1</sup>

**N. Clorofil**

Clorofórmio ..... 24 mL  
 Álcool isoamílico ..... 1,0 mL

**O. Tampão TE**

Tris-HCl ..... 10 mmol.L<sup>-1</sup>  
 EDTA (pH 8,0) ..... 1,0 mmol.L<sup>-1</sup>