



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

AMANDA OLÍMPIA DA SILVA

**PROSPECÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS DO SEMIÁRIDO COM POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO COMO BIOFERTILIZANTES**

FORTALEZA

2022

AMANDA OLÍMPIA DA SILVA

PROSPECÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS DO SEMIÁRIDO COM POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO COMO BIOFERTILIZANTES

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Suzana Cláudia Silveira Martins.

Coorientador: Mestre Fernando Gouveia Cavalcante

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S578u Silva, Amanda Olímpia da.
 Uso de actinobactérias do semiárido com potencial biotecnológico como biofertilizantes /
 Amanda Olímpia da Silva. – 2022.
 42 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro
 de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2022.
 Orientação: Prof. Dr. Suzana Claudia Silveira Martins .
 Coorientação: Prof. Me. Fernando Gouveia Cavalcante.
1. colorimetria. 2. solubilização. 3. fitohormônio. 4. auxina. 5. fósforo. I. Título.

CDD 661

AMANDA OLÍMPIA DA SILVA

PROSPECÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS DO SEMIÁRIDO
COM POTENCIALBIOTECNOLÓGICO COMO BIOFERTILIZANTES

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovada em: 13/07/2022.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Suzana Cláudia Silveira Martins (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Me. Fernando Gouveia Cavalcante
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meus amados pais, por tudo o que fizeram por mim desde o dia em que nasci.

Aos meus avós, tios e tias por todo o apoio ao longo dessa etapa.

A todos os meus amigos e colegas de curso por dividirem as dores e alegrias da faculdade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma com a minha caminhada durante esses cinco anos, principalmente:

Aos meus pais, por todos os sacrifícios e apoio na minha escolha pela Biotecnologia, e por sempre acreditarem em mim.

E também aos meus avós, tios, tias e todos os familiares que me apoiaram e me incentivaram.

A minha orientadora pela oportunidade de participar do Lamab, por sempre ser atenciosa e por toda a ajuda nesse ano.

Ao meu coorientador, amigo, exemplo de pessoa e profissional, por ter muita paciência com as minhas diversas dúvidas e pelo aprendizado enorme que me deu.

Aos meus companheiros de laboratório pela parceria e ajuda no dia a dia de pesquisa. Em especial aos meus amigos que compartilhavam o turno da tarde e noite comigo, por todas as conversas e risadas.

A todos que trabalham na cantina da Geologia, pelo atendimento e acolhimento maravilhoso.

As minhas duas amigas de infância que sempre estiveram lá por mim, compartilhando essa experiência da faculdade e da vida adulta, espero que isso nunca mude.

E a todos os meus amigos e colegas, da T8 em especial, do curso por tornarem mais fácil e feliz a minha trajetória na UFC.

“Aprender é a única coisa que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

(Leonardo da Vinci)

RESUMO

O semiárido é uma região notavelmente rica em biodiversidade e berço de organismos com características particulares de sobrevivência a situações adversas. Apesar disso ainda há uma lacuna a ser explorada no que diz respeito a microrganismos capazes de serem usados em aplicações biotecnológicas na agricultura. Dentre estes, as actinobactérias com sua reconhecida capacidade de produzir múltiplos metabólitos secundários ganham destaque na formulação de biofertilizantes. O objetivo desse estudo foi analisar a capacidade de 36 cepas de actinobactérias provenientes do semiárido cearense no que diz respeito a capacidade de produção de ácido indol acético e solubilização de fosfato, ambos importantes para a promoção do crescimento vegetal. Os isolados foram analisados quanto a solubilização de fosfato nos meios sólidos Pikovskaya e Katznelson e Bose e método colorimétrico usando o $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ como fonte de fosfato insolúvel. Para medir a capacidade das bactérias produzirem AIA foi usado método colorimétrico com ácido indol acético comercial como referencial. Os testes em placa se mostram com uma menor precisão em comparação ao teste quantitativo, foram detectadas 23 cepas capazes de solubilizar fosfato no meio KB e 18 no meio PVK com valores de índices enzimáticos variando de 1,06 a 1,57 e 1,11 a 1,84 respectivamente. Número desses discrepantes do total de 30 cepas solubilizadoras detectadas com o método colorimétrico com a quantidade de fósforo solubilizado entre 1,25 e 37,18 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. Já no que diz respeito a produção de AIA 29 bactérias apresentaram essa habilidade variando a concentração entre 0,54-6,37 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. O presente trabalho contribui para a averiguação das actinobactérias com potencial biotecnológico para atuação como rizobactérias promotoras de crescimento de plantas. E, por meio deste, concluiu-se que as actinobactérias do semiárido apresentam potencial para uso na formulação de biofertilizantes.

Palavras-chave: ácidos orgânicos; colorimetria; solubilização; fitohormônio; auxina; fósforo.

ABSTRACT

The particular semi-arid region is remarkably rich in biodiversity and is home to organisms with survival characteristics in adverse situations. There is still a gap to be explored, despite not having the ability to be tested in biotechnological applications in agriculture. Among these, actinobacteria with their recognized ability to produce secondary metabolites as a highlight of biofertilizers. The objective of this study was to analyze the capacity of 36 strains of actinobacteria from the semi-arid region of Ceará with regard to the production capacity of indole acetic acid and phosphate solubilization, both important for the promotion of the plant. The isolates were analyzed for phosphate solubilization in Pikovskaya and Katznelson and Bose solid media and colorimetric method using $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ as a source of insoluble phosphate. To measure the ability of bacteria to produce AIA, the colorimetric method was used with commercial indole acetic acid as a reference. The examples show with a lower precision compared to the tested ones, 23 were prepared in phosphate plate and 18 in PVK medium, solving values from 1.06 to 1.5 and 1.11 to 1.84 respectively. Outliers from the total of 3 solubilizer numbers as produced with the colorimetric method with the amount of phosphorus between 1.25 and 37.18 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. With regard to the production of AIA 29, the trend was this variation in concentration between 0.54-6.37 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The present work contributes to the investigation of actinobacteria with biotechnological potential to act as plant growth-promoting rhizobacteria. And, through this, it was concluded that actinobacteria from the semiarid region have potential for use in the formulation of biofertilizers.

Keywords: organic acids; colorimetry; solubilization; phytohormone; auxin; phosphorus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema do funcionamento interno de um espectrofotômetro	8
Figura 2 – Produção de ácido indol acético e solubilização de fosfato	14
Figura 3 – Representação das distâncias de halos e colônias para cálculo dos índices de solubilização (mm)	15
Figura 4 – Histograma de frequência de cepas em cada análise	15
Figura 5 – Histograma de médias e desvios-padrão das cepas solubilizadoras de fosfato e produtoras de AIA	19
Figura 6 – Matriz das cepas quanto a solubilização de fosfato e produção de AIA agrupadas de acordo com a similaridade das características em um dendrograma	20

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1.	RPCP e a Biotecnologia Vegetal	3
2.2.	Bactérias Solubilizadoras de Fosfato	4
2.3.	Rizobactérias Produtoras de Ácido Indol Acético	5
2.4.	Colorimetria e Espectrofotometria.....	7
3.	OBJETIVOS.....	10
3.1.	Objetivo Geral.....	10
3.2.	Objetivos Específicos	10
4.	METODOLOGIA	11
4.1.	Solubilização de Fosfato em Meio Sólido.....	11
4.2.	Análise Colorimétrica de Solubilização de Fosfato	11
4.3.	Análise Colorimétrica de Produção de AIA.....	12
4.4.	Análise de Dados	13
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
6.	CONCLUSÃO	21
7.	REFERÊNCIAS.....	22
8.	APÊNDICE A – CURVAS-PADRÃO DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO E SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO	33

1. INTRODUÇÃO

Actinobactérias compõem um filo de bactérias Gram-positivas que estão espalhadas pelos mais diversos ambientes aquáticos e terrestres, visto como um dos mais diversos grupos de microrganismos com um genoma rico em guanina e citosina (DORIS *et al.*, 2020). São consideradas uma das linhagens mais antigas de procariotos com uma grande diversidade morfológica como bastonetes, cocos e cocobacilos; com ramificação do micélio, produção de pigmentos e esporulação como características (LAW *et al.*, 2020). Os membros deste filo podem ser classificados em diferentes gêneros: *Actinomyces*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Bifidobacterium* e *Streptomyces*; o filo das actinobactérias compreende 46 ordens, 79 famílias e 425 gêneros (SALAM *et al.*, 2020).

Um clima predominantemente quente e seco e com chuvas escassas compõem as condições restritivas do semiárido brasileiro que limitam o desenvolvimento de muitos microrganismos. Esse ecossistema determina as características diferenciadas das espécies que se desenvolvem nesse cenário. Como as actinobactérias que estão presentes em larga escala e grande diversidade, principalmente na microbiota do solo (MEDEIROS, 2018; DE OLIVEIRA *et al.*, 2020) e podem ser úteis para melhorar o crescimento de plantas sob condições adversas, aliviando o estresse abiótico (BONATELLI *et al.*, 2021).

Dentro dessa população microbiana do solo, principalmente os microrganismos rizosféricos (interface raiz-solo), são umas das principais fontes bióticas para o crescimento e desenvolvimento vegetal (ARAÚJO *et al.*, 2008). Nesse cenário, destaca-se o uso das actinobactérias para a produção de fito hormônios, enzimas, sideróforos e antibióticos (MEIJ *et al.* 2018; BAHRAMI *et al.*, 2022; ASSAD *et al.*, 2021; SALWAM e SHARMAN, 2018); também para a mineralização e solubilização de minerais e mobilização de nutrientes presente no solo (SOUMARE *et al.*, 2021; BOUBEKRI *et al.*, 2021; MITRA *et al.*, 2022).

Nesse cenário, podemos destacar as actinobactérias solubilizadoras de fosfato e as produtoras de ácido indolacético como importantes fontes de estudo (NAFIS *et al.*, 2019; HAMIM *et al.*, 2019; MITRA *et al.*, 2022; SANTOS, 2019). O uso desses microrganismos como biofertilizantes pode ser potencializado com a ajuda da biotecnologia, através do uso de engenharia genética e metabólica para melhorar o

desempenho de estirpes que já possuem um bom potencial natural e resistência a condições adversas (LI *et al.*, 2019; HORBAL, SIEGL e LUZHETSKYY, 2018; YARADODDI *et al.*, 2021).

A comercialização industrial de biofertilizantes só teve seu início em 1920, com o uso de bactérias fixadoras de nitrogênio (SUNDH, GIUDICE e CEMBALO, 2021); E em 2019 o mercado de biofertilizantes atingiu cerca de 1,57 bilhão de dólares (SOUMARE *et al.*, 2020). E segundo estimativas feitas pela Mordor Intelligence (2022) esse mercado global deve apresentar uma taxa de crescimento anual composta de 12,1% entre os anos de 2022 a 2027.

A biotecnologia microbiana abre portas para a descoberta de novas cepas e formulações eficazes para promoção do desenvolvimento vegetal com reduzido custo e impacto ambiental. O largo espectro de atuação desses microrganismos aliado às diversas abordagens e técnicas da Biotecnologia apontam o potencial presente nessa área (LOPES *et al.*, 2021; MENDONÇA, *et al.*, 2020). Genômica, metaproteômica e nanotecnologia são exemplos de aliados dessa área de pesquisa (BONALDI 2021; IJAZ *et al.*, 2019; KUMARI *et al.*, 2019; MANOJ *et al.*, 2020; O'CALLAGHAN *et al.*, 2001).

Grandes aliados da microbiologia nesse âmbito são as bactérias promotoras de crescimento de plantas, que quando presente na rizosfera ou na superfície da raiz da planta são denominadas rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP). Com uma ampla variedade de características de interesse para uso na agricultura como uma abordagem mais sustentável (CAVALCANTE *et al.*, 2022).

Nesse contexto, considerando a rica biodiversidade do semiárido aliada com a capacidade das actinobactérias produzirem diversos metabólitos secundários, o objetivo deste trabalho é validar a hipótese de que as actinobactérias do semiárido são produtoras de ácido indol acético e solubilizadoras de fosfato.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Rizobactérias Produtoras de Crescimento e a Biotecnologia Vegetal

A demanda por comida é uma preocupação global que cresce constantemente e aliada aos problemas climáticos atuais se torna um dos focos de estudo para a área da biotecnologia vegetal. As problemáticas como o aumento da contaminação do solo por metais pesados (cádmio, níquel e zinco, por exemplo) e o maior uso de agroquímicos em plantações agrícolas que leva a deterioração do solo e perda da sustentabilidade ecológica serviram como incentivo para os estudos sobre microorganismos benéficos para o meio ambiente, as rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (KUMAR, *et al.*, 2019).

Pode-se definir as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) com uma classe de bactérias que colonizam ativamente a zona radicular das plantas e que são capazes de melhorar seu desenvolvimento e sua produtividade por múltiplas formas (WU *et al.*, 2012). E ainda podem ser divididas nas que vivem no âmbito extracelular (rizosfera, rizoplane ou entre células radiculares) e intracelular (nas estruturas nodulares especializadas das células da raiz) (BUBANZ, 2018).

Essa classe de bactérias possui várias características de interesse identificadas: tolerância a estresse salino, degradação/tolerância a pesticidas, desintoxicação de metais pesados, controle biológico de patógenos, produção metabólitos secundários como fitohormônios, sideróforos, antibióticos produção de amônia, capacidade de fixar de nitrogênio, solubilização de fosfato e potássio, etc (PRASAD, *et al.*, 2019; ODOH, *et al.*, 2017). No geral, as RPCPs podem atuar como biocontroles, biofertilizantes, bioestimulantes rizorremediadores e biopesticidas (Somers, *et al.*, 2004).

Esses microorganismos são fortemente afetados pelas interações existentes com o solo, a microfauna do meio e com as plantas desse ambiente. E uma importante fonte nutritiva dessas bactérias se encontra nos exsudados provenientes das raízes, como: açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos, vitaminas etc; que atuam estimulando o metabolismo dessa microbiota e a interação com o sistema radicular (KUMAR *et al.*, 2017; PRASAD *et al.*, 2019).

A eficácia do uso de RPCP se relaciona com o tempo de sobrevivência do organismo no solo, da sua capacidade de lidar com condições adversas de pH e

temperatura, por exemplo, e capacidade de manter seu metabolismo funcionando sem comprometer as funções pelas quais ele foi inserido naquele ambiente (HOYOS, 2018). Nesse contexto, o uso de cepas provenientes de biomas como a Caatinga são importantes pela sua grande versatilidade metabólica (CARVALHO, *et al.*, 2016).

São inúmeras as técnicas e abordagens que permitem hoje um estudo mais preciso e aprofundado desses microrganismos e seu potencial de uso. Como as derivadas da PCR: PCR quantitativa (JIAN *et al.* 2020), gel de gradiente desnaturante (KAYASHIMA, 2021), sequenciamento em larga escala da região 16S rRNA (GOU *et al.* 2020); que exploram as relações e interações entre o habitat e os microrganismos (RODRIGUES, 2019).

Esses avanços tecnológicos possibilitaram estudos aprofundados como a taxonomia baseada no genoma completo de um microrganismo, modificações de vias biossintéticas, edições genômicas precisas e produção melhorada para fins específicos (SALWAN e SHARMA, 2020; ARULPRAKASAM e DHARUMADURAI, 2021).

2.2 Bactérias Solubilizadoras de Fosfato

O fósforo (P) é um dos macronutrientes mais importante para o crescimento das plantas, tendo funções tanto na estrutura quanto no metabolismo vegetal. Está presente na constituição dos ácidos nucleicos, nos fosfolipídios da membrana celular, síntese proteica e contribui para a tolerância a doenças, formação das sementes e alongamento das raízes (KOUR *et al.*, 2019). É também um dos nutrientes mais limitantes do processo de crescimento vegetal e normalmente é o mineral limitante para a produção de biomassa no meio ambiente (YADAV *et al.*, 2018).

A utilização desse nutriente não depende apenas da quantidade em que está presente no solo, mas também da disponibilidade em que se encontra no solo. Pode assumir formas como fósforo inorgânico insolúvel e fósforo orgânico insolúvel, sendo a maior parte que se encontra fixada no solo não sendo disponível para as plantas (BEHERA *et al.*, 2013). A deficiência de fosfato pode acarretar na atrofia e morte de caules e folhas e comprometer a maturação dos frutos. Quando esse nutriente é aplicado diretamente no solo podem ser rapidamente imobilizados e inacessíveis para a planta (YADAV *et al.*, 2018).

As rizobactérias promotoras de crescimento de plantas têm sido amplamente exploradas para uso em aplicações biotecnológicas em várias áreas

como biofertilizantes, fito estimuladores e biorremediadores dependendo do seu modo de ação nas práticas agrícolas; essas estratégias podem funcionar de forma aliada, uma só bactéria pode prover a redução de acúmulo de organofosforados mas também promover o desenvolvimento vegetal em aspectos qualitativos (NATHIYA *et al.*, 2020).

Essa classe de bactérias pode atuar de maneiras diferentes, direta ou indiretamente. Através do mecanismo direto as bactérias sintetizam compostos que serão incorporados pela planta, como os fitohormônios, ou por meio da facilitação da absorção desses nutrientes presentes no meio (KAUR *et al.*, 2016). Produção de auxinas, excreção de amônia, solubilização de fosfatos e produção de sideróforos são alguns exemplos desse tipo de atuação. Já o mecanismo indireto se dá por meio da diminuição ou do bloqueio dos efeitos deletérios de fitopatógenos, induzindo resistência ou produzindo substâncias antagonistas.

A agricultura sustentável necessita do uso de estratégias para aumentar a taxa de produção agrícola enquanto reduz os danos para o ambiente e a saúde humana (YADAV, *et al.*, 2018). Esse cenário levou ao desenvolvimento de estratégias alternativas, dentre essas, o uso de microrganismos benéficos do solo como as bactérias solubilizadoras de fosfato que podem atuar como biofertilizantes é uma área que está recebendo grande destaque (Kour *et al.*, 2019).

Vale ressaltar que existem diferentes meios desses microrganismos tornarem o fósforo disponível no solo, seja através da mineralização ou da solubilização. A primeira abordagem está relacionada à atividade enzimática (atuação de fosfatases, no geral) e a segunda é atribuída ao metabolismo de ácidos orgânicos excretados e a diminuição do pH (SILVA, 2019). As plantas e os microrganismos absorvem, majoritariamente, o P que se encontra no solo na forma inorgânica (HPO^{2-} ou H_2PO_4^-) (NOVAIS, SMYTH e NUNES, 2007).

As RPCP solubilizadoras de fosfato, em especial, podem ser úteis para várias finalidades além do uso como biofertilizantes, como: aumento da produtividade na área de aquicultura, por meio da estimulação da vegetação de fitoplânctons e desenvolvimento de zooplânctons; produção de ácidos orgânicos (ácido glicólico, cítrico, láctico etc), sendo o principal mecanismo de mineralização do fósforo presente no solo; e na fitorremediação sendo usado para melhorar a bioavaliação e fitoextração de Cádmiu, por exemplo (BEHERA *et al.* 2013).

2.3 Bactérias Produtoras de Ácido Indol Acético (AIA)

As RPCP são caracterizadas por estarem presente, em sua maioria, na rizosfera em associação com as raízes, nas suas superfícies ou mesmo vivendo livres pelo solo, e são responsáveis por influenciar no crescimento vegetal de maneira direta ou indireta (BHARUCHA, *et al.*, 2013).

Essas bactérias são capazes de produzir fitohormônios como ácido indolacético, citocininas, giberelinas e inibidores de etileno. Dentre a variedade de auxinas, a forma de ácido indol-3-acético é a mais comum delas sendo responsável pelo alongamento, divisão e diferenciação celular, entre outras respostas de curto e longo prazo nas plantas (KAUR *et al.*, 2016). Uma das rotas de produção desse ácido usa o triptofano como precursor e esse processo permite a desintoxicação do excesso desse composto e seus análogos que podem atuar de maneira deletéria na célula bacteriana.

As auxinas produzidas pelas bactérias podem influenciar nesses processos vegetais pela alteração da reserva de auxinas da planta. Isso depende não só da quantidade de AIA produzida, mas também da sensibilidade do tecido para mudar os níveis de auxina. Dentre os tecidos, as raízes são os que possuem maior grau de sensibilidade, aumentando o comprimento das suas raízes primárias, formando raízes adventícias e laterais (BHARUCHA *et al.*, 2013).

Mais de uma via de produção de AIA pode estar presente em uma bactéria, sendo as dependentes de triptofano as que produzem o fitohormônio em maior quantidade (NAVEED, *et al.*, 2015). No solo, esse triptofano é proveniente de exsudatos de raízes e células em decomposição, podendo ser produzido por transformação microbiana de forma aeróbica ou anaeróbica (MOHITE, 2013).

Alguns fatores são importantes de se considerar quanto a produção de AIA pelas bactérias, como: efeito de diferentes fontes de carbono e nitrogênio, efeito das concentrações de L-triptofano, efeitos da temperatura e pH, viabilidade biológica para da bactéria para o crescimento da planta (MOHITE, 2013). Esses fatores são dependentes da espécie e precisam ser avaliados adequadamente.

Outro ponto importante a se considerar é as diferentes vias de produção do ácido indolacético. Pois, dependendo da capacidade do metabolismo da bactéria, este terá uma tendência a produzir vários compostos indólicos em conjunto com a produção do AIA e isso pode estar relacionado a diferentes efeitos nos vegetais (MALIK, 2018).

O AIA gerado pela via do indol-3-acetamida está ligado a geração de tumores e galhas, já o ácido indol acético produzido na via do ácido indol-3-pirúvico se relaciona com o crescimento e proliferação radicular. Dessa forma, é importante

identificar o tipo de derivado indólico produzido pela RPCP para determinar sua influência (SACCO, 2017).

Dentre os hormônios vegetais que as actinobactérias associadas às plantas são capazes de produzir, a auxinas está como o mais comum a todas essas espécies, entre elas podemos citar a *Streptomyces*, *Arthrobacter* e *Micrococcus*. Mesmo que a produção de AIA não tenha uma função hormonal nas células microbiana, a habilidade das bactérias produzirem esse composto pode ter evoluído a partir das relações estabelecidas entre planta e microorganismo (YADAV *et al.*, 2018).

As rizobactérias promotoras de crescimento vegetal podem também servir como agentes de biocontrole, como inoculantes e em conjunto com outros microorganismos que também são capazes de melhorar o desenvolvimento de plantas. Além disso, com o aparato das modificações genéticas podem ainda mais promover a comercialização de estirpes voltadas para a agricultura sustentável e mais efetiva, (LASLO *et al.*, 2012).

Já são reportadas cepas de bactérias que possuem múltiplas características promotoras de crescimento para as plantas, como: capacidade de produzir enzimas celulasas, pectinases, amilases, fixadores de nitrogênio, produtoras de amônia, entre outros compostos (SÁNCHEZ-CRUZ *et al.*, 2019).

2.4 Colorimetria e Espectrofotometria

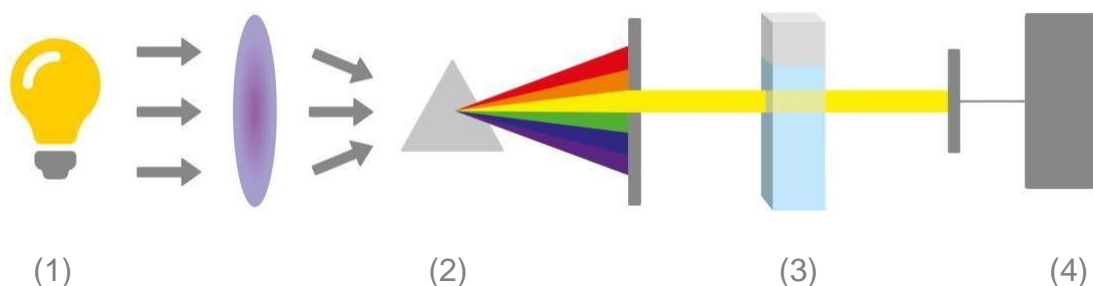
A transformação da cor em um formato numérico é possível através da colorimetria, aliada ao uso do espectrofotômetro que permite medir a absorbância de luz. Intervalos de comprimento de ondas são relacionados a determinadas cores e cada objeto possui sua capacidade própria de absorver específicas faixas do espectro de luz (BERTOLINI, 2010). O uso da espectrofotometria se baseia na lei de Lambert-Beer, através dela é estabelecido que: “A absorbância é diretamente proporcional à concentração da solução de amostra.” (WENTWORTH, 1966; HARDESTY e ATILLY, 2010).

A interpretação das cores sob a ótica humana é bastante subjetiva e por esse motivo a ciência conta com o auxílio de colorímetros e espectrofotômetros para a análise analítica desse componente. O espectrofotômetro de refletância constrói uma curva de distribuição de reflectância da amostra a partir da medição d absorbâncias, de acordo com a faixa de comprimento de onda (FERREIRA e SPRICIGO, 2017).

O equipamento é basicamente compostos pelos seguintes componentes

(Figura 1): (1) uma fonte de luz (a composição da lâmpada varia de acordo com a faixa de luz, seja UV, visível ou infravermelho); (2) um monocromador que transforma a luz incidida em monocromática; (3) uma ou mais cubetas, os recipientes que contém a amostra; e (4) um detector que transforma a fração de luz resultante em uma forma numérica (SILVA, 2011).

Figura 1: Esquema do funcionamento interno de um espectrofotômetro.



Fonte: kasvi.com.br

O primeiro passo para o uso dessa técnica é o desenvolvimento de condições que estabeleçam uma reprodutibilidade no teste. Dessa forma, é necessário a determinação do comprimento de onda característico do analito e no qual se tenha a absorvância máxima. Para a construção da curva de calibração (que relaciona a absorvância e a concentração do analito), é necessário abranger uma faixa razoável de concentração e que nela a composição da amostra seja englobada (HARVEY, 2000).

Alguns fatores enquadram a espectrofotometria como uma técnica notavelmente útil para análises quantitativas, como: ampla aplicabilidade, alta sensibilidade, seletividade, boa exatidão e acessibilidade. Nesse cenário, é possível analisar um número enorme de compostos (orgânicos e inorgânicos); detectar concentrações da ordem de 10^{-7} mol.L⁻¹, em alguns casos; é possível trabalhar em um comprimento de onda específico do seu composto de interesse; a taxa de erro relativos é de 1-5%, podendo alcançar décimos por cento; e as mensurações são rápidas e fáceis de serem feitas (SKOOG *et al.*, 2007).

Dentre as variáveis que podem influenciar a absorvância estão: a natureza do solvente, o pH da solução, a temperatura, concentração de eletrólitos e presença de substâncias interferentes (HARRIS, 2008). É necessário saber o impacto desses

elementos e eliminar ou minimizar ao máximo.

Essa abordagem é bastante utilizada no âmbito da microbiologia analítica para a precisa quantificação de metabólitos secundários produzidos (MONOWAR, *et. al.* 2019; RAMOS, *et. al.* 2021). A concentração do composto de interesse é estimada pelo ajuste de equações de regressão para as curvas de calibração entre absorvância e concentração de composto no meio de cultivo (BALDOTTO,2009).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar a capacidade das cepas de actinobactérias isoladas do semiárido brasileiro solubilizarem fosfato e produzirem ácido indolacético.

3.2 Objetivos Específicos

- Análise semi-quantitativa da solubilização de fosfato das cepas em diferentes meios de cultura e cálculo dos Índices de Solubilização (IS).
- Análise colorimétrica da produção de AIA e solubilização de fosfato através do método da colorimetria aliada a espectrofotometria.
- Determinação da metodologia mais eficiente para determinação da solubilização de fosfato.
- Construção de uma matriz binária aliada a um dendrograma para agrupamento das cepas com maior potencial para a solubilização de fosfato e produção de AIA.

4. METODOLOGIA

4.1 Solubilização de Fosfato em Meio de Cultura Sólido

As cepas de actinobactérias foram provenientes da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Ambiental (Lamab) e foram cultivadas em dois meios de cultura. No meio Ágar Pikovskaya (PVK) composto por dextrose, 10 g; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 5 g; extrato de levedura, 0,5 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 g; KCl, 0,2 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g; NaCl, 0,2 g; FeSO_4 , 0,002 g; MnSO_4 , 0,002 g; ágar 15 g e água destilada, 1000 mL; pH 7 (GOENADI e SUGIARTO, 2000; PIKOVSKAYA, 1948).

O outro meio utilizado foi descrito por Katznelson e Bose (1959) composto por glicose, 10 g; ágar, 20 g; asparagina, 2 g; MgSO_4 , 0,5 g; NaCl, 0,1 g; KCl, 0,1 g; extrato de levedura 0,5 g; água destilada, 1000 mL e pH ajustado para 7,0 e depois de passar pelo processo de esterilização é necessário a adição asséptica demais 50 mL de solução esterilizada de K_2HPO_4 (10%) e 100 mL de solução esterilizada de CaCl_2 (10%).

Ambos os meios foram vertidos em placas de Petri e após inoculação, as cepas foram incubadas por 40 e 20 dias, respectivamente, a 28°C. Para determinação de resultado as colônias que apresentaram halos claros ao seu redor foram consideradas solubilizadoras de fosfato inorgânico.

O índice de solubilização (IS), usado em trabalhos como os de Silva *et al.* (2014), Inácio *et al.* (2020) e Silva (2019), representa a relação entre o diâmetro médio do halo de solubilização (dH) e o diâmetro médio da colônia (dC), sendo um método semi-quantitativo, de acordo com Berraquero *et al.* (1976). As medições foram feitas em milímetros (Figura 2).

$$IS = dH/dC$$

Para quesito de classificação quanto a solubilização, utilizou-se a escala de Silva e Visor (2000): baixa solubilização (IS menor que 2), média solubilização (IS entre 2 e 3) e alta solubilização (IS maior que 3).

4.2 Análise Colorimétrica de Solubilização de Fosfato

Para quantificar a capacidade das actinobactérias de solubilizar fosfato de cálcio foi utilizado o meio de cultura líquido NBRIP descrito por Nautiyal (1999) e

composto por glicose, 10 g; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 5 g; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5 g; KCL, 0,2 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 g; água bidestilada, 1000 mL e pH 7,0. Foi adicionado 5 mL de meio em tubos e após inoculação das cepas foram mantidos sob agitação constante por 14 dias.

Após o tempo de incubação, foi adicionado 1,5 mL do meio de cultura de cada tratamento em microtubos e submetidos à centrifugação a $9500 \times g$ por um período de 5 minutos. Em seguida, foi transferido 1.050 μL do sobrenadante de cada tratamento, 150 μL de água bidestilada e 350 μL do reagente vanado-molíbídico (Malavolta *et al.*, 1989). O espectrofotômetro foi zerado utilizando o branco composto pela adição de 1.050 μL do meio NBRIP sem inóculo, 150 μL de água bidestilada e 350 μL do reagente vanado-molíbídico.

Esse reagente colorímetro foi preparado de acordo com o método descrito pela APHA (1998): preparo de uma solução A através da dissolução de 25 g de molibdato de amônio em 300 mL de água destilada; preparo de uma solução B composta por 1,25 g de metavanadato de amônio em 300 mL de água, aquecendo a mistura até completa dissolução do sal, após a solução esfriar adicionou-se 300 mL de HCl concentrado; após o resfriamento da solução B até atingir a temperatura ambiente à ela é adicionada a solução A e misturada com posterior diluição para 1L.

A curva padrão foi construída por meio da preparação de uma solução estoque de KH_2PO_4 e H_2SO_4 (10N), dissolvidos em água bidestilada. A leitura das absorbâncias foi feita dez minutos depois da adição do reagente colorimétrico, no comprimento de onda de 420 nm. Para zerar o espectrofotômetro foi utilizado um branco composto por 1.050 μL de meio NBRIP sem inóculo, 150 μL de água bidestilada e 350 μL do reagente colorímetro. Os experimentos foram realizados em triplicata e o resultado positivo foi evidenciado pela coloração amarelada do analito.

Para classificação da capacidade de solubilizar fosfato, foram utilizados os estudos de Montaldo (2016), Celestino (2019) e Silva *et al.* (2018). A classificação é dividida em: baixa solubilização ($<50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); média solubilização ($50-100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), alta solubilização ($101-500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) e elevada solubilização ($>501 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$).

4.3. Análise Colorimétrica da Produção de Ácido Indol Acético

Para a quantificação da produção de AIA foi utilizado o método proposto por Bric *et al.* (1991), adaptado para o método quantitativo (HUSEN, 2003), com ressalva para a modificação do meio de cultura utilizado que foi suplementado com

triptofano. O meio de cultura líquido utilizado foi o Luria Bertani (LB) composto por bacto-triptona, 10 g; extrato de levedura, 5 g; NaCl, 5 g; água destilada, 1000 mL; pH 7,5 esuplementado com 1 g de L-triptofano. Os microrganismos foram cultivados nos tuboscom 5 mL de LB sob agitação constante durante 10 dias.

Após essa etapa, foi adicionado 1,5 mL de meio de cultura em microtubos que foram levados à centrífuga a 9500 x g por 2 minutos. Em seguida, foi transferido 750 µL de sobrenadante para microtubos de 1,5 mL e 750 µL do reagente de Salkowski, composto por 1 mL de FeCl₃ (0,5 mol/L) e 49 mL de HClO₄ (35%). A leitura das absorbâncias foi feita em 530 nm, meia hora após a adição do reagente colorido e para a obtenção da curva padrão foi utilizado o ácido indolil acético com AIA comercial (BRIC *et al.*, 1991).

O branco foi constituído de 750 µL de meio LB sem inóculo e 750 µL de reagente Salkowski. O experimento foi realizado em triplicata e o resultado positivo foi perceptível pela apresentação de uma coloração róseo-avermelhada.

As cepas foram classificadas quando a produção de AIA segundo os parâmetros estabelecidos por Hartmann *et al.* (1983), sendo eles: baixa produção (<1 µg.mL⁻¹); média produção (1-10 µg.mL⁻¹); alta produção (11-50 µg.mL⁻¹) e elevada produção (>51 µg.mL⁻¹).

4.4. Análise de Dados

Os dados quantitativos, obtidos a partir dos cálculos de concentração de P solúvel e AIA foram submetidos ao teste de normalidade e posteriormente submetidos a análise de variância (ANOVA) ($p < 0,05$), utilizando-se o Programa (PAST). A ANOVA foi utilizada para comparar as cepas com relação a capacidade de produzir AIA e solubilizar fosfato. E os gráficos foram plotados no Prism GraphPad 5.

Os dados semi-quantitativo e quantitativos obtidos dos testes de solubilização de P e produção de AIA foram transformados em uma matriz binária quefoi usada para a elaboração de um dendrograma de similaridade que possibilitou o agrupamento de cepas semelhantes (HAMMER *et al.*, 2001). Adotou-se o algoritmo UPGMA (unweighted pair-group method) e coeficiente de Jaccard (MEYER, 2002).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 2. Produção de ácido indol acético e solubilização de fosfato.

UBJ	AIA ($\mu\text{g. mL}^{-1}$)	P $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ A	P $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ B	P $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ C
1	-	15.48	-	1.27
2	3.49	27.03	-	1.14
4	2.97	20.06	-	1.06
5	4.90	5.43	-	1.22
6	-	10.02	-	-
7	2.83	31.77	1.12	1.14
8	-	-	-	-
9	2.69	18.55	-	1.28
10	1.04	11.84	-	1.44
13	4.88	9.66	-	-
14	3.35	7.92	-	1.08
15	2.48	18.68	-	1.15
16	3.35	36.67	-	1.23
17	5.44	18.21	-	-
18	0.91	-	-	1.11
20	2.89	8.85	1.25	1.15
21	2.75	4.25	1.47	-
22	1.48	3.92	-	-
23	0.58	-	-	-
24	2.64	18.83	-	-
25	0.89	-	1.23	-
27	5.86	10.17	-	-
28	3.68	6.08	1.37	-
29	-	5.64	1.22	-
30	3.43	13.48	-	-
31	0.56	-	-	-
32	0.51	13.33	-	1.19
33	4.11	4.90	1.13	-
34	5.41	-	1.12	1.27
35	-	4.28	-	-
36	0.71	10.42	1.17	1.57
37	-	1.33	1.18	-
38	5.18	15.65	-	1.49
39	4.33	16.40	1.25	-
40	2.92	2.44	-	-
41	-	5.37	1.84	1.24

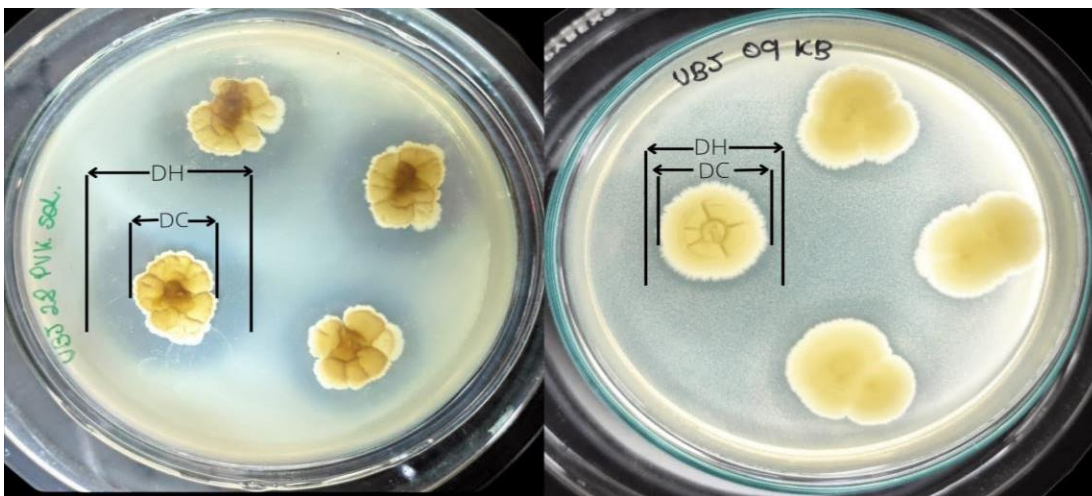
A = Análise colorimétrica feita com meio NBRIP ($\mu\text{g.mL}^{-1}$); B = Teste em placas feito com meio PVK (IS); C = Teste em placas feito com meio KB (IS).

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Todos os dados obtidos neste trabalho foram exposto nessa tabela (Figura 2). Das 36 cepas analisadas 23 (63,88%) solubilização de fosfato em meio KB e 18 (50,00%) em meio PVK. Os índices de solubilização (Figura 3) variaram de 1,06 a 1,57 e 1,11 a 1,84, nos respectivos meios sólidos. No meio KB, 17 cepas foram classificadas com baixa solubilização de fosfato. Já em meio PVK dentre as bactérias

solubilizadoras, 12 foram consideradas com uma baixa solubilização.

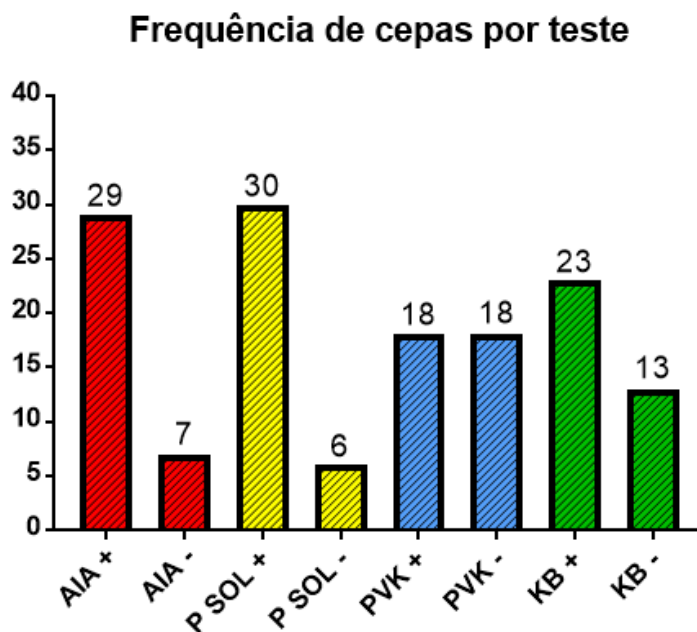
Figura 3. Representação das distâncias de halos e colônias para cálculo do índice enzimático (mm).



Fonte: Elaboração pela autora, 2022.

O restante das cepas: UBJ 05, UBJ 09, UBJ 24, UBJ 30, UBJ 31, UBJ 38e no meio PVK e UBJ 06, UBJ 25, UBJ 29, UBJ 30, UBJ 31 e UBJ 33 no meio KB foram consideradas como qualitativamente positivas por possuírem uma pequena zona mais clara ao redor da colônia de difícil mensuração e foram consideradas na porcentagem de isolados solubilizadores (Figura 4).

Figura 4. Histograma da frequência de cepas em cada análise.



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Esse histograma também é útil para a comparação do desempenho partir do teste colorimétrico que alia a química analítica à microbiologia percebeu-se a subestimação da capacidade das cepas analisadas nos meios sólidos. Além da frequência de positivos ter aumentado grandemente, é fato a maior precisão dos dados que fornecem a concentração estimada de fósforo solubilizado por cada bactéria.

No que diz respeito a análise colorimétrica da solubilização de fosfato, todos os isolados usados neste trabalho foram classificados com baixa solubilização, ou seja, abaixo de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de fósforo solubilizado, com ressalva para duas cepas que apresentaram ausência de solubilização, a UBJ 08 e UBJ 23. Dentre estes, os menores valores foram obtidos pelas UBJ 23 e UBJ 37 com $1,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $1,32 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente; já em relação aos maiores valores alcançados temos a UBJ 02 com $37,18 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e a UBJ 07 com $31,76 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

As absorbâncias obtidas (valores de y) foram convertidas em concentração de P solubilizado por meio da equação da reta $y = 0,0182x + 0,0291$, obtida através construção de uma curva padrão com concentrações de fósforo conhecidas (10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

A porcentagem de isolados que foram capazes de solubilizar fosfato foi de 82,85% em meio NBRIP e é coerente segundo estudos de Barea *et al.* (2005) e Santos *et al.* (2012), pois a abundância de microrganismos capazes de solubilizar fosfato e com metabolismos mais ativos quando comparado com outras microbiotas se explica pela existência das secreções exsudadas das raízes que atuam como fonte de carbono para a microbiota do solo. Também pelo teor de aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares e substâncias promotoras de crescimento (KUMAR e NARULA, 1999).

Já a incapacidade de algumas espécies bacterianas não serem capazes de solubilizar fosfato, pode ser explicada pela característica da cepa não conseguir produzir exsudados suficientes para acidificar o meio e permitir a solubilização do mineral; essa característica também está relacionada a interação dos microrganismos com o meio ambiente (SANTOS *et al.*, 2012).

Supõe-se que o meio KB teve uma maior eficiência para a descoberta de microrganismos solubilizadores de fosfato devido a granulometria da sua fonte de fosfato, ou seja, as partículas de fosfato menores desse meio quando comparado com o PVK, facilitam o processo de solubilização de fósforo pelas bactérias.

Outro aspecto a se considerar nos testes com meio sólido é a taxa de

difusão de diferentes ácidos orgânicos que são secretados pelos isolados e que influencia na variação da dimensão dos halos de solubilização (JOHRI, SURANGE e NAUTIYAL, 1999). Os tipos de ácidos orgânicos produzidos variam entre os microrganismos e a concentração desses ácidos também depende da fonte de fosfato disponível (GADAGI e SA, 2002).

Já a ligação entre os ácidos orgânicos e o fosfato solubilizado é devido a propriedade quelante desses compostos que possibilita a formação de complexos estáveis com os íons de Fe^{+3} , Ca^{+3} (TIAN *et al.*, 2021; DEY *et al.*, 2021).

Essa proporção obtida no trabalho foi superior ao obtido por Souza *et al.* (2017), que estudou a capacidade de bactérias endofíticas isoladas de *E. scaber* produzirem AIA e solubilizarem fosfato, que dentre as 61 bactérias analisadas 47 (78%) foram capazes de solubilizar fosfato.

Os resultados das absorvâncias (valores de y) foram convertidos em concentração de AIA produzido ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) por meio da equação $y = 0,1406x + 0,0124$, obtida através da construção de uma curva padrão a partir de valores padrões de concentração de AIA já estabelecidas (8,66; 7,00; 5,83; 4,65; 3,50; 2,32; 1,16 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$).

Dos isolados estudados, todos foram capazes de produzirem AIA, dentre eles: 7 foram classificados com baixa produção e os 28 restantes foram enquadrados com uma média produção do fitohormônio. Com destaque para as cepas UBJ 17 e UBJ27 que atingiram os maiores valores de 5,95 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ e 6,37 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$; já os valores mais baixos foram os da UBJ 08 com 0,54 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ e da UBJ 29 0,75 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$.

As variações nas absorvâncias de AIA podem ser entendidas pelo fator descrito por Cerigioli (2005), Lins (2012) e Inui (2009), que abordam a questão do ácidoindolilacético bacteriano ser um metabolito secundário que é produzido durante a fase estacionária, fase esta que possui um período de duração específico que varia entre as bactérias.

Além deste, outros fatores são decisivos e evidenciam a particularidade de cada espécie entre as espécies como: as fontes de carbono e nitrogênio utilizadas, as concentrações de L-triptofano, efeito da temperatura e pH e viabilidade biológica da estirpe para o crescimento vegetal (MOHITE, 2013).

Outro fator que explica os valores das absorvâncias obtidas explica-se pela não padronização do inóculo, dessa forma, os valores variam entre os isolados e tratamentos. Uma possível alternativa futura seria o uso da suspensão de esporos, onde se pode manter o controle preciso sobre a quantidade de inóculo (AMATTO, 2019).

Um ponto importante a se considerar é a produção de pigmentos por algumas cepas no meio utilizado, pelo menos 17 actinobactérias (UBJ 02, UBJ 04, UBJ 05, UBJ 09, UBJ 13, UBJ 14, UBJ 15, UBJ 17, UBJ 20, UBJ 21, UBJ 24, UBJ 28, UBJ 30, UBJ 33, UBJ 34, UBJ 38 e UBJ 39) deste estudo produziram pigmentos em algum grau. Esse tipo de interferência já foi descrita por Griffiths *et al.* (2011), para a estimada concentração de biomassa de microalgas.

Uma sugestão também descrita por Griffiths *et al.* (2011) para contornar essa interferência seria realizar testes para determinação de um comprimento de onda fora do intervalo de absorção do pigmento, minimizando ou eliminando as alterações nos valores de absorvância de AIA.

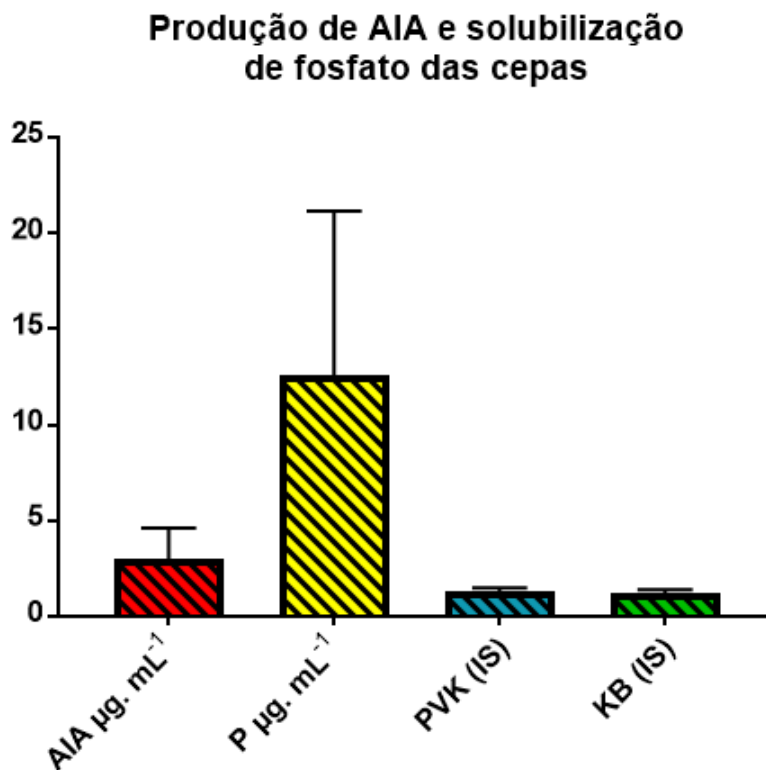
Outra alternativa bastante difundida para controle de pigmentação é o uso de fontes de carbono que normalmente favorecem o metabolismo primário do microrganismo, já que muitas vezes a produção de pigmento apresenta característica típica de metabólito secundário, e isso geralmente reprime o metabolismo secundário (menos ativo). Porém, para a produção de AIA essa estratégia não é útil devido a característica do ácido indol acético ser um metabólito secundário.

Vale ressaltar, que a pigmentação das cepas utilizadas possuía uma coloração amarronzada o que difere da coloração que atesta a produção de AIA (róseo-avermelhada), sendo assim não houve falso-positivo no estudo.

A escolha de actinobactérias rizosféricas para a produção de AIA se fundamenta também no fato de que o L-triptofano é um precursor fisiológico para a produção de auxinas nas plantas e nos microrganismos (RIBEIRO, 2010). Os compostos que são exsudados pelo sistema radicular são fontes de triptofano, o que potencializa a síntese desse fitohormônio na rizosfera (KAHMNA, 2008).

O gráfico abaixo (Figura 5) ilustra as médias e desvios-padrão dos testes, destacando que o mais discrepante foi a análise colorimétrica de solubilização de fosfato com uma média entre 10-15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e desvio-padrão de aproximadamente 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Figura 5. Histograma de médias e desvios-padrão das cepas solubilizadoras de fosfato e produtoras de AIA

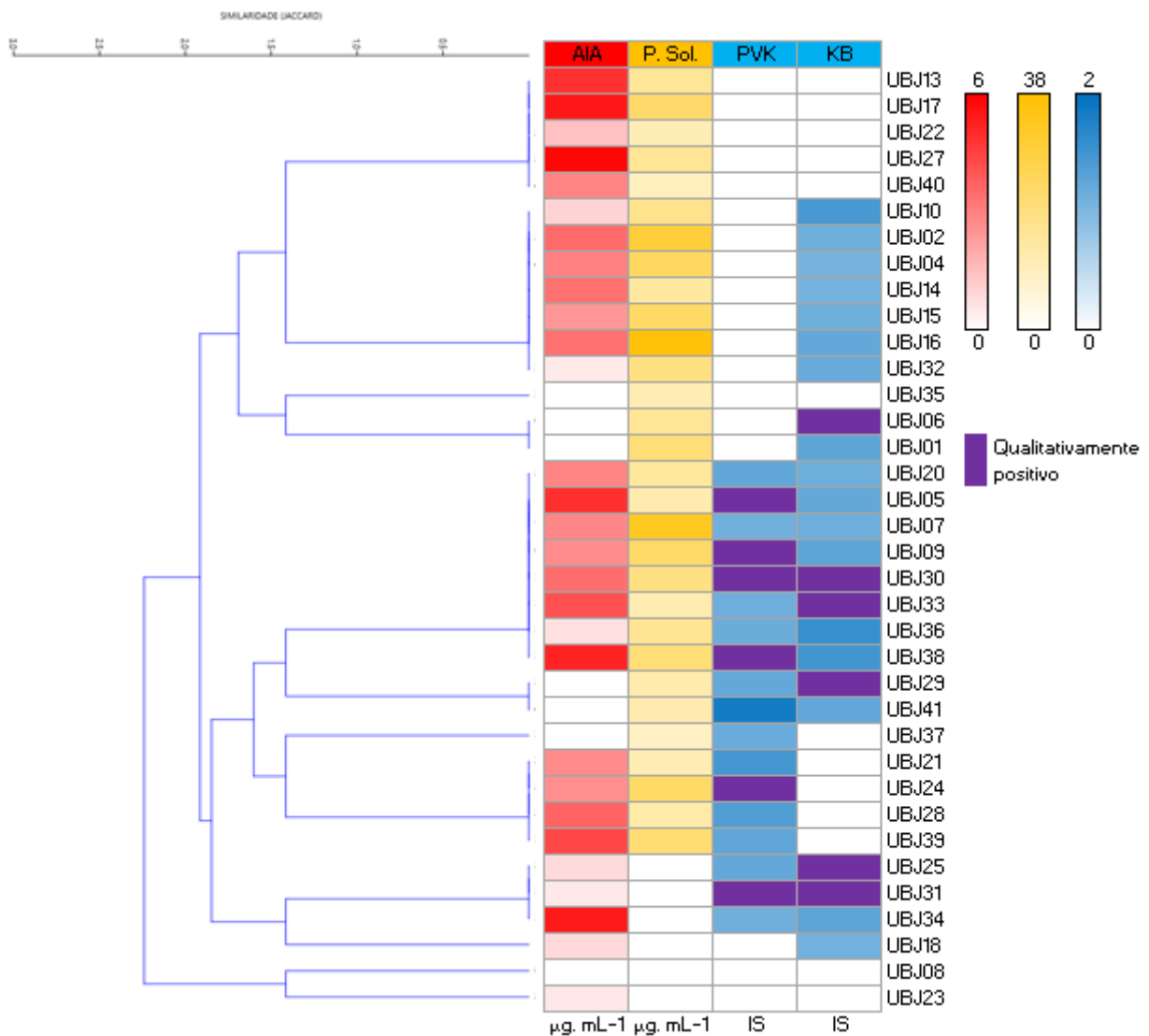


Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Vale destacar que em ambas as análises colorimétricas as cepas diferiram entre si na análise e apresentaram um $p < 0,05$ o que confirma a relevância dos dados obtidos nos testes.

A matriz representada (Figura 6) reúne os dados obtidos nos testes feitos neste trabalho e relaciona com um dendrograma que determina a similaridade (similaridade de Jaccard) entre as cepas para as características analisadas elencando as com maior potencial de atingir a meta estabelecida.

Figura 6. Matriz das cepas quanto a solubilização de fosfato e produção de AIA agrupadas de acordo com a similaridade das características em um dendrograma.



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

A prospecção feita nas cepas de actinobactérias é uma triagem inicial que tem como finalidade restringir a amostra para que as etapas seguintes da pesquisa sejam focadas nas bactérias mais promissoras para a finalidade da biofertilização.

6. CONCLUSÃO

A partir deste trabalho, conclui-se que, as actinobactérias possuem a capacidade de solubilizar fosfato, com destaque para as cepas UBJ 07 e UBJ 16 que alcançaram $31,76 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $36,67 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Já no que diz respeito a produção de ácido indolilacético, UBJ 17 e UBJ 27 se destacaram produzindo respectivamente, $5,43 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $5,85 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Esses dados revelam o potencial biotecnológico dos isolados de actinobactérias para serem utilizados no desenvolvimento de biofertilizantes.

REFERÊNCIAS

AMATTO, Isabela Victorino da Silva. **Produção de L-asparaginase por *Aspergillus niveus* em Fermentação em Estado Sólido (FES)**. Dissertação (Mestrado). Programade Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Química, UNESP, Araraquara/SP, 2019. Acesso em: 03 de junho de 2022.

APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 20th ed. American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) and Water Environment Federation (WEF), Washington, DC, 1998. Acesso em: 21 de junho de 2022.

ARAÚJO, Antonio Edilson da Silva. **Caracterização e Uso de Bactérias Diazotróficas Isoladas de Diferentes Cultivares de Arroz Originárias do Estado do Maranhão**. Tese (Doutorado). UFRRJ - Instituto de Agronomia - Curso de Pós- Graduação em Fitotecnia, 2008. Acesso em: 02 de junho de 2022. Disponível em: <https://tede.ufrrj.br/jspui/handle/tede/550>

ASSAD, B. M. *et al.* **Endophytic actinobacteria of *Hymenachne amplexicaulis* from the Brazilian Pantanal wetland produce compounds with antibacterial and antitumor activities**. Microbiological Research. V. 248, 2021. Acesso em: 11 de junho de 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126768>

BALDOTTO, L. & OLIVARES, L. **Phylloepiphytic Interaction between bacteria and different plant Species in a tropical agricultural system**. CanadianJournal of Microbiology, v.54, p.918-931, 2008.

BAREA, J. M.; POZO, M. J.; AZCÓN, R.; AGUILAR, C. A. **Microbial cooperation in the rhizosphere**. Journal of Experimental Botany, v. 56, p. 1761-1778,2005. Acesso em: 23 de junho de 2022. DOI: 10.1093/jxb/eri197

BAHRAMI, Y. *et al.* **Endophytic Actinobacteria in Biosynthesis of Bioactive Metabolites and Their Application in Improving Crop Yield and Sustainable Agriculture**. Natural Products from Actinomycetes. P. 119-150, 2022. Acesso em: 06de junho de 2022. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-16-6132-7_5

BEHERA, B. C. *et al.* **Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove—A review**. Elsevier – Biocatalysisand Agricultural Biotechnology. V. 3, p. 97-110, 2014. Acesso em: 09 de junho de 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2013.09.008>

BERRAQUERO, F. R.; BAYA, A. M.; CORMENZANA, A. R. **Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo**. Ars

Pharmaceutica, v. 17, n. 4, p. 399-406, 1976. Acesso em: 09 de junho de 2022. Disponível em: <https://revistaseug.ugr.es/index.php/ars/article/view/24869>

BERTOLINI, Cristiano. **Sistema para medição de cores utilizando espectrofotômetro**. Trabalho de Conclusão de Curso (Centro de Ciências Exatas e Naturais Curso de Ciência da Computação, Bacharelado), Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2010.

BHARUCHA, U.; PATEL, K.; TRIVEDI, U. B. **Optimization of Indole Acetic Acid Production by *Pseudomonas putida* UB1 and its Effect as Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Mustard (*Brassica nigra*)**. Agricultural Research.V. 2, p. 215-221, 2013. Acesso em: 12 de junho de 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40003-013-0065-7>

BONATELLI, M. L. *et al.* **On the genetic architecture in a public tropical maize panel of the symbiosis between corn and plant growth-promoting bacteria aiming to improve plant resilience**. Molecular Breeding, v. 41 (10), p. 1-16, 2021. Acesso em: 05 de junho de 2022. DOI: 10.3389/fmicb.2022.906365

BOUBEKRI, K. *et al.* **The Screening of Potassium- and Phosphate Solubilizing Actinobacteria and the Assessment of Their Ability to Promote Wheat Growth Parameters**. Microorganisms. v. 9, n. 3, 2021. Acesso em: 07 de junho de 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030470>

BRIC, J. M. *et al.* **Rapid In Situ Assay for Indoleacetic Acid Production by Bacteria Immobilized on a Nitrocellulose Membrane**. Applied and environmental Microbiology 57 (2), 535-538, 1991. Acesso em: 03 de junho de 2022. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.57.2.535-538.1991>

BUBANZ, H. C. S. **Potencial de Rizobactérias para a Promoção de Crescimento Vegetal**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal da Fronteira Sul –UFFS, Campus de Cerro Largo, Curso de Agronomia. Acesso em: 11 de junho de 2022. Disponível em: <https://rd.uffs.edu.br/handle/prefix/2367>

CAVALCANTE, F. G. *et al.* **Actinobactérias benéficas para o solo: potencialidades de uso como promotores de crescimento vegetal**. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer – Jandaia-GO, v.19 n.40; p.15, 2022. DOI: 10.18677/EnciBio_2022B2

CELESTINO, Érica Lívea Ferreira Guedes. **Bactérias Promotoras de Crescimento Isoladas da Caatinga Alagoana**. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Alagoas – Instituto de Química e Biotecnologia, 2019. Acesso em: 15 de junho de 2022. Disponível em: <http://www.repositorio.ufal.br/handle/riufal/6548>

CERIGIOLI, Márcia Maciel. **Diversidade de bactérias endofíticas de milho (*Zea mays L.*) e seleção para promoção de crescimento**. Tese (Doutorado). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/UFSCar, 2005. Acesso em: 20 de junho de 2022. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1022164>

DEY, G. *et al.* **Management of Phosphorus in Salinity-Stressed Agriculture for Sustainable Crop Production by Salt-Tolerant Phosphate-Solubilizing Bacteria—A Review.** *Agronomy*. v. 2021. Acesso em: 15 de junho de 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy11081552>

DORIS, A. V. B. *et al.* **Ecology and genomics of Actinobacteria: new concepts for natural product discovery.** *Nature Reviews Microbiology*. V. 18, n. 6, 2020. Acesso em: 02 de junho de 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-020-0379-y>

FERREIRA, M. D.; SPRICIGO, P. C. **Colorimetria: princípios e aplicações na agricultura.** Embrapa Instrumentação, São Carlos, p. 209-220, 2017. Acesso em: 13 de junho de 2022. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1084379>

FILHO, Henrique Bergamin *et al.* **Espectrofotometria no Ultravioleta e Visível.** São Paulo, 2010. Apresentação em slide, 21 slides. Acesso em: 05 de junho de 2022. Disponível em: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4275863/mod_resource/content/1/Apostila-espectrofotometria.pdf

GADAGI R.S., SA T. **New isolation method for microorganisms Solubilizing iron and aluminium phosphates using dyes.** *Soil Science and Plant Nutrition*, v. 48, p. 615-618, 2002. Acesso em: 26 de junho de 2022. DOI: <https://doi.org/10.1080/00380768.2002.10409246>

GRIFFITHS, M. J. *et al.* **Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density.** *Journal of Microbiology Methods*. v. 85, p. 119-123, 2011. Acesso em: 21 de junho de 2022. DOI: 10.1016/j.mimet.2011.02.005

GOENADI, D. H.; SUGIARTO, Y. **Bioactivation of poorly soluble phosphate rocks with a phosphorus-solubilizing fungus.** *Soil science society of America journal*, v. 64, n. 3, p. 927-932, 2000. Acesso em: 12 de junho de 2022. DOI: <https://doi.org/10.2136/sssaj2000.643927x>

GOU, J. *et al.* **Biofertilizers with beneficial rhizobacteria improved plant growth and yield in chili (*Capsicum annuum* L.).** *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 36, n. 86, 2020. Acesso em: 13 de junho de 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02863-w>

HAMIM, A. *et al.* **Phosphate solubilizing and PGR activities of ericaceous shrubs microorganisms isolated from Mediterranean forest soil.** *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 19, 2019. Acesso em: 04 de junho de 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101128>

HARDESTY, Jon H.; ATTILI, Bassam. **Spectrophotometry and the Beer Lambert Law: An important analytical technique in chemistry.** Collin College, Department of Chemistry, 2010.

HARRIS, Daniel C. **Análise Química Quantitativa**. 7 ed. Tradução de Bordinhão, J. [et al.]. Rio de Janeiro: LTC, 2008. Disponível em: <https://www.travessa.com.br/analise-quimica-quantitativa-7-ed-2008/artigo/c0dcee2c-4365-41ae-8d8d-96a44a26df7e>. Acesso em: 14 de junho de 2022.

HARTMANN, A.; SINGH, M.; KLINGMÜLLER W. **Isolation and characterization of Azospirillum mutants excreting high amounts of indoleacetic acid**. Canadian Journal of Microbiology, 29 (8), p. 916-923, 1983. Acesso em: 19 de junho de 2022. DOI: <https://doi.org/10.1139/m83-147>

HARVEY, David. **Modern Analytical Chemistry**, 1st edition, Boston, McGraw Hill, 2000. Disponível em: [https://gtu.ge/Agro-Lib/Harvey%20D.%20Modern%20analytical%20chemistry%20\(MGH,%202000\)\(816s\).pdf](https://gtu.ge/Agro-Lib/Harvey%20D.%20Modern%20analytical%20chemistry%20(MGH,%202000)(816s).pdf). Acesso em: 11 de junho de 2022.

HORBAL, L.; SIEGL, T., LUZHETSKYY, A. **A set of synthetic versatile genetic control elements for the efficient expression of genes in Actinobacteria**. Scientific Reports. v. 8, n. 491, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-01718846-1>

HUSEN, E. **Screening of soil bacteria for plant growth promotion activities in vitro**. Indonesian Journal of Agricultural Science, Cibinong, v. 4, n. 1, p. 27-31, 2003. Acesso em: 22 de junho de 2022. DOI: 10.21082/ijas.v4n1.2003.p27-31

IJAZ, M. *et al.* **Molecular approaches to study plant growth-promoting rhizobacteria (PGPRs)**. Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Agricultural Sustainability, p. 215-232, 2019. Acesso em: 26 de junho de 2022. DOI: 10.1007/978-981-13-7553-8_11

INÁCIO, A. C. F. *et al.* **Caracterização morfofisiológica de bactérias solubilizadoras de fosfatos provenientes da rizosfera de plantas alimentícias não convencionais**. Brazilian Journal of Development, Curitiba, v. 6, n.5, p.24567-24585, 2020. Acesso em: 11 de junho de 2022. DOI:10.34117/bjdv6n5-055

INUI, R. N. **Isolamento e Identificação de Bactérias Solubilizadoras de Fósforo e Produtoras de Auxinas em Solo de Cana-de-Açúcar**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, 2009. Acesso em: 14 de junho de 2022. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/92654>

JIAN, C. *et al.* **Quantitative PCR provides a simple and accessible method for quantitative microbiota profiling**. PLoS ONE, v. 15, n. 1, 2020. Acesso em: 06 de junho de 2022. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227285>

JOHRI, J.K.; SURANGE, S.; NAUTIYAL, C. S. **Occurrence of salt, pH, and temperature-tolerant, phosphate-solubilizing bacteria in alkaline soils**. Current Microbiology. v. 39, p. 89-93, 1999. Acesso em: 03 de junho de 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s002849900424>

KAYASHIMA, Momoko. **Seedling production of Brazilian native species by**

inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting rhizobacteria. 2021. 65 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2021. Acesso em: 06 de junho de 2022. Disponível em: <https://locus.ufv.br/handle/123456789/28242>

KHAMNA, S.; YOKOTA, A.; LUMYOUNG, S. **Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production.** World Journal of Microbiology and Biotechnology. v. 25, p. 649-655, 2008. Acesso em: 16 de junho de 2022. DOI: 10.1007/s11274-008-9933-x

KAUR, H.; KAUR, J.; GERA, R. **Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Boon to Agriculture.** International Journal of Cell Science and Biotechnology. V. 5, p.17-22, 2016. Acesso em: 23 de junho de 2022. Disponível em: <http://inpressco.com/category/ijcsb/>

KOUR, D. *et al.* **Biodiversity, current developments and potential biotechnological applications of Phosphorus-solubilizing and -mobilizing microbes: A review.** Pedosphere. V. 31(1), p. 43-75, 2021. Acesso em: 20 de junho de 2022. DOI:10.1016/S1002-0160(20)60057-1

KUMAR, A. **Phosphate solubilizing bacteria in agriculture biotechnology: diversity, mechanism and their role in plant growth and crop yield.** International Journal of Advanced Research. V. 4(4), p. 116-124, 2016. Acesso em: 09 de junho de 2022. DOI: 10.21474/IJAR01

KUMAR, V.; NARULA, N. **Solubilization of Inorganic Phosphates and Growth Emergence of Wheat as Affected by *Azotobacter chroococcum*.** Biology and Fertility of Soils, Biology and Fertility of Soils. v. 28, p. 301-305, 1999. Acesso em: 10 de junho de 2022. DOI: 10.1007/s003740050497

KUMARI, B. *et al.* **Applying nanotechnology to bacteria: an emerging technology for sustainable agriculture.** Role of Plant Growth Promoting Microorganisms in Sustainable Agriculture and Nanotechnology, p. 121-143, 2019. Acesso em: 18 de junho de 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817004-5.00008-7>

LASLO, E.; *et al.*; **Screening of plant growth promoting rhizobacteria as potential microbial inoculants.** Elsevier – Crop Protection. V. 40, p. 43-48, 2012. Acesso em: 07 de junho de 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2012.05.002>

LAW, J. W. *et al.* **The Rising of “Modern Actinobacteria” Era.** Progress In Microbes & Molecular Biology. V. 3 (1), 2020. Acesso em: 24 de junho de 2022. DOI: 10.36877/pmmb.a0000064

LI, L. *et al.* **Recent Advances in Synthetic Biology Approaches to Optimize Production of Bioactive Natural Products in Actinobacteria.** Frontiers in Microbiology. v. 10, n. 2467, 2019. Acesso em: 17 de junho de 2022. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02467

LINS, Milca Raquel da Costa Ribeiro. **Bactérias endofíticas com potencial para promoção de crescimento Vegetal**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Pernambuco, 2012. Acesso em: 05 de junho de 2022. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/155924>

LINS, Milca Raquel da Costa Ribeiro. **Seleção de Actinobactérias da Rizosfera da Caatinga com Potencial para Promoção de Crescimento Vegetal**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, 2014. Acesso em: 16 de junho de 2022. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/12154>

LOPES, M. J. S. *et al.* **Biotechnology microbiana: inoculação, mecanismos de ação e benefícios às plantas**. Research, Society and Development, v. 10 (12), 2021. Acesso em: 12 de junho de 2022. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i12.20585>

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Metodologia para análise de elementos em material vegetal. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potássio e do Fósforo, p. 135-189, 1989. Acesso em: 08 de junho de 2022. Disponível em: <https://repositorio.usp.br/item/001070906>

MALIK, Z. A. *et al.* **Effect of salicylic acid and indole acetic acid on tomato crop under induced salinity and cadmium stressed environment: A Review**. Int. J. Plant Soil Sci, v. 26, p. 1-6, 2018.

MANOJ, S. R. *et al.* **Understanding the molecular mechanisms for the enhanced phytoremediation of heavy metals through plant growth promoting rhizobacteria: A review**. Journal of Environmental Management, v. 254, 2020. Acesso em: 22 de junho de 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109779>

MEDEIROS, E. J. T. *et al.* **Diversidade Cultural de Cepas de Actinobactérias do Semiárido**. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer – Goiânia, v.15 n.27; p. 205, 2018. Acesso em: 27 de junho de 2022. DOI: 10.18677/EnciBio_2018^a87

MEIJ, A. V. D. *et al.* **Inter- and intracellular colonization of Arabidopsis roots by endophytic actinobacteria and the impact of plant hormones on their antimicrobial activity**. Antonie van Leeuwenhoek. V. 111, p. 679-690, 2018. Acesso em: 07 de junho de 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1014-z>

MENDONÇA, J. J. *et al.* **Diversidade, mecanismos de atuação e potencial agrícola de bactérias promotoras de crescimento de plantas, usando milho como cultura exemplo**. Pesquisa Agropecuária Pernambucana, v. 25 (2), 2020. Acesso em: 08 de junho de 2022. DOI: <https://doi.org/10.12661/pap.2020.010>

MEYER, A. S. **Comparação de coeficientes de similaridade usados em análises de agrupamento com dados de marcadores moleculares dominantes**. 2002. 118f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luís de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002. Acesso em: 04 de junho de 2022. Disponível em:

<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11134/tde-24072002-165250/publico/andreia.pdf>

MITRA, D. *et al.* **Actinobacteria-enhanced plant growth, nutrient acquisition, and crop protection: Advances in soil, plant, and microbial multifactorial interactions.** *Pedosphere*. V. 32, n. 1, p. 149-170, 2022. Acesso em: 14 de junho de 2022. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(21\)60042-5](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(21)60042-5)

MOHITE, B. **Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth.** *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, v.13(3), p. 638-649, 2013. Acesso em: 04 de junho de 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162013005000051>

MONOWAR, T. *et al.* **Endophytic Bacteria *Enterobacter hormaechei* Fabricated Silver Nanoparticles and Their Antimicrobial Activity.** *Pharmaceutics*, 13 (4), 511, 2021. Acesso em: 10 de junho de 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040511>

MONTALDO, Yamina Coentro. **Bioprospecção e isolamento de bactérias associadas à cana-de-açúcar (*Saccharum Officinarum L.*) com características para promoção de crescimento vegetal.** Tese (Doutorado) Universidade Federal de Alagoas – Rede Nordeste de Biotecnologia, Maceió, 2016. Acesso em: 10 de junho de 2022. Disponível em: <http://www.repositorio.ufal.br/handle/riufal/1817>

NAFIS, A. *et al.* **Actinobacteria from Extreme Niches in Morocco and Their Plant Growth-Promoting Potentials.** *Diversity*, v. 11, n. 139, 2019. Acesso em: 18 de junho de 2022. DOI: 10.3390/d11080139

NATHIYA, S.; JANANI, R.; KANNAN, V. R. **Potential of plant growth promoting Rhizobacteria to overcome the exposure of pesticide in *Trigonella foenum – graecum* (fenugreek leaves).** Elsevier – Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. Rhizosphere Biology Laboratory, Department of Microbiology, Bharathidasan University, Tiruchirappalli. v. 23, 2020. Acesso em: 17 de junho de 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101493>

NAUTIYAL, C. S. **An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms.** *FEMS Microbiology Letters*, v. 170, n. 1, p. 265-270, 1999. Acesso em: 04 de junho de 2022. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>

NAVEED, M. **L-Tryptophan-dependent biosynthesis of indole-3-acetic acid (IAA) improves plant growth and colonization of maize by *Burkholderia phytofirmans PsJN*.** *Annals of microbiology*, v. 65, n. 3, p. 1381-1389, 2015. Acesso em: 11 de junho de 2022. DOI: 10.1007/s13213014-0976-y

NOVAIS, R. F.; *et al.* **Fertilidade do solo.** Viçosa, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Ceará, SBCS, 2007. Disponível em: <https://www.editoraufv.com.br/produto/fertilidade-do-solo/1109451>. Acesso em: 09 de junho de 2022.

ODOH, Chuks Kenneth. **Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a bioprotectant bioinoculant for sustainable agrobiology. A review.** *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, v. 4, n. 5, 2017. Acesso em: 21 de junho de 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.22192/ijarbs.2017.04.05.01>

OLIVEIRA, Mariane Pereira de. **Caracterização cultural e micromorfológica de actinobactérias do semiárido nordestino em diferentes níveis de cobertura vegetal**. 2020. 55 f. Monografia (Graduação em Agronomia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2020. Acesso em: 03 de junho de 2022. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/56882>

O'CALLAGHAN, K. J.; DIXON, R. A.; COCKING, E. C. ***Arabidopsis thaliana*: a model for studies of colonization by non-pathogenic and plant-growth promoting rhizobacteria**. Functional Plant Biology, v. 28 (9), p. 975-982, 2001. Acesso em: 16 de junho de 2022. DOI: <https://doi.org/10.1071/PP01048>

PIKOVSKAYA, R. I. **Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species**. Mikrobiologiya, v. 17, p. 362-370, 1948. Acesso em: 21 de junho de 2022. Disponível em: [https://www.scirp.org/\(S\(351jmbntvnsjt1aadkposzje\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1](https://www.scirp.org/(S(351jmbntvnsjt1aadkposzje))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1)

PRASAD, M. *et al.* **Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for sustainable agriculture: perspectives and challenges**. PGPR amelioration in sustainable agriculture, p. 129-157, 2019. Acesso em: 23 de junho de 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12815879-1.00007-0>

RAMOS, P. P. *et al.* **Isolamento, caracterização de rizobactérias e análise da produção de ácido indolacético visando ao enraizamento de estacas de oliveira (*Olea europaea* L.)**. Ciência Florestal, v. 31, p. 1612-1630, 2022. Acesso em: 10 de junho de 2022. DOI: <https://doi.org/10.5902/1980509838041>

RIBEIRO, Carlos Marcelo. **Isolamento, seleção e caracterização de rizobactérias com potencial para promoção do crescimento em *Araucaria angustifolia***. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, 2010. Acesso em: 25 de junho de 2022. DOI: 10.11606/D.11.2010.tde-20102010-105528

RODRIGUES, Ariana Alves. **Diversidade e prospecção de rizobactérias associadas à cana-de-açúcar sob manejo orgânico: metodologias clássicas e moleculares a serviço da agroecologia**. 2018. 184 f. Tese (Doutorado em Ciências Ambientais) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2018. PGPR amelioration in sustainable agriculture, 129-157, 2019.

SACCO, Laís Postai. **Isolamento de bactérias produtoras de enzimas de interesse em processos biotecnológicos**. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013. Acesso em: 12 de junho de 2022. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/94874>

SACCO, Laís Postai. **Potencial de isolados bacterianos para uso em processos biotecnológicos e agroindustriais**. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017. Acesso em: 17 de junho de 2022. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/150947?show=full>

SALAM, N.; JIAO, J. Y.; ZHANG, X. T.; LI, W. J. **Update on the classification of**

Higher ranks in the phylum Actinobacteria. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 70, n. 2, p. 1331-1355, 2020. Acesso em: 15 de junho de 2022. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003920>

SALWAN, R.; SHARMAN, V. **Molecular and biotechnological aspects of secondary metabolites in actinobacteria.** Microbial Research. v. 231, 2020. Acesso em: 03 de junho de 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126374>

SÁNCHEZ-CRUZ, N. D. **Phosphate solubilization and indole-like compounds production by bacteria isolated from forest soil with plant growth promoting activity on pine seedlings.** Geomicrobiology Journal, v. 37, n. 10, p. 909918, 2020. Acesso em: 06 de junho de 2022. DOI: <https://doi.org/10.1080/01490451.2020.1797945>

SANTOS, I. B. *et al.* **Bactérias diazotróficas associadas a raízes de cana-de-açúcar: solubilização de fosfato inorgânico e tolerância à salinidade.** Bioscience World, v.28, p. 142-149, 2012. Acesso em: 02 de junho de 2022. Disponível em: <https://search.bvsalud.org/gim/resource/fr/biblio-912171?lang=pt>

SANTOS, Joel Vidal dos. **Rizobactérias promotoras de crescimento vegetal associadas à *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. em área suscetível à desertificação delrauçuba, Ceará.** 2019. 46 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019. Acesso em: 19 de junho de 2022. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/48264>

SILVA, Antônio Marcos Miranda. **Aumento da produtividade e mudanças na microbiota do solo em cultivo de cana-de-açúcar com aplicação de composto e Inoculação de bactérias solubilizadoras de fosfato.** Dissertação (Mestrado), USP /Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2018. Acesso em: 10 de junho de 2022. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/Disponiveis/11/11140/tde-04102018-153553/publico/Antonio_Marcos_Miranda_Silva.pdf

SILVA, C. S. **Solubilização de Fosfatos Inorgânicos por Bactérias Endofíticas Isoladas de Maracujá Amarelo (*Passiflora edulis Sims f. flavicarpa*).** Encontro Regional de Agroecologia do Nordeste, Rio Largo, v. 1, número 1, 2018. Acesso em: 03 de junho de 2022. Disponível em: <https://www.seer.ufal.br/index.php/era/article/view/5096>

SILVA, Edivan Cirino da. **Métodos de Análise Química Instrumental. Disciplina - Química Analítica III.** Universidade Federal da Paraíba – UFPB; Centro de Ciências Exatas e da Natureza; Departamento de Química, 2018. Acesso em: 12 de junho de 2022. Disponível em: <https://www.studocu.com/pt-br/document/universidade-estadual-da-paraiba/quimica-analitica/metodos-de-analise-quimica-instrumental-disciplina-quimica-analitica-iii/9437466>

SILVA, José Maciel Mariano. **Bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico em solo preservado e antropizado da reserva biológica de Pedra Talhada – AL.** 2019. 33 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Agronomia) – Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Garanhuns, 2019. Acesso em: 26 de junho de 2022. Disponível em: <http://hdl.handle.net/123456789/1894>

SILVA, M. L. R. B. **Diversidade e potencial de solubilização de fosfato in**

vitro por bactérias endofíticas associadas à cultura da palma forrageira (*Opuntia e Nopalea*) em Pernambuco. Pesq. agropec. pernamb., Recife, v. 19, n. 2, p. 85-88, 2014. Acesso em: 08 de junho de 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.12661/pap.2014.013>

SALWAM, R; SHARMAN, V. **Actinobacteria: Diversity and Biotechnological Applications. Chapter 14 – The Role of Actinobacteria in the Production of Industrial Enzymes.** Microbial Biotechnology and Bioengineering. P. 165-177, 2018. Acesso em: 02 de junho de 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63994-3.00011-4>

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica.** Tradução da 8 ed. Americana. Ed. Thomson; São Paulo, 2007. Disponível em: https://www.inesul.edu.br/site/documentos/QUIMICA_ANALITICA_SKOOG.pdf. Acesso em: 19 de junho de 2022.

SOMERS, E.; VANDERLEYDEN, J.; SRINIVASAN, M. **Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet.** Critical reviews in microbiology, v. 30, n. 4, p. 205-240, 2004. Acesso em: 09 de junho de 2022. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408410490468786>

SOUMARE, A. *et al.* **Efficacy of phosphate solubilizing Actinobacteria to improve rockphosphate agronomic effectiveness and plant growth promotion.** Rhizosphere. v. 17, 2021. Acesso em: 02 de junho de 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100284>

SOUZA, R. D. *et al.* **Potencial Agrônômico de Bactérias Endofíticas de *Echinodorus scaber* Rataj (*macrophyllus*) em Plântulas de Soja.** Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde, v.21, n.3, p. 187-193, 2017.

TIAN, J. **Roles of Phosphate Solubilizing Microorganisms from Managing Soil Phosphorus Deficiency to Mediating Biogeochemical P Cycle.** Biology. v. 10, n.158, 2021. Acesso em: 02 de junho de 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/biology10020158>

YADAV, A. N. *et al.* **Actinobacteria from Rhizosphere: Molecular Diversity, Distributions, and Potential Biotechnological Applications.** New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. V. 1, cap. 2, p.13-41, 2018. Acesso em: 03 de junho de 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63994-3.00002-3>

YARADODDI, J. S. *et al.* **Scope of Actinobacteria in Bioengineering.** Actinobacteria - Rhizosphere Biology, 2021. Acesso em: 21 de junho de 2022. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-16-3353-9_10

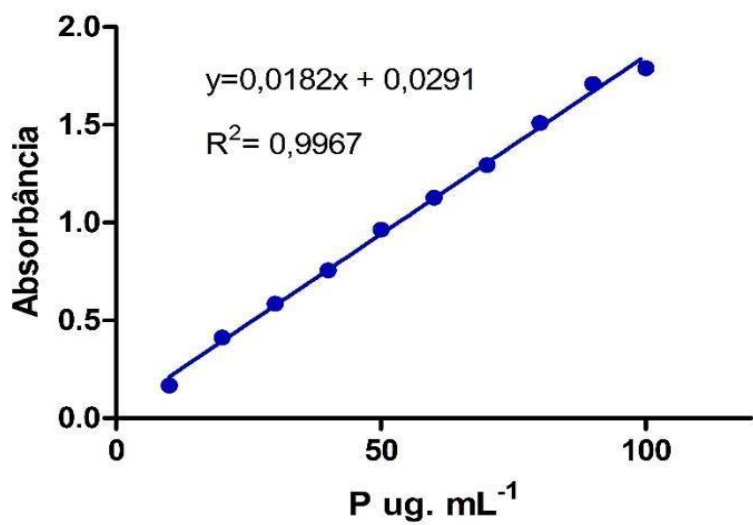
WENTWORTH, W. E. **Dependence of the Beer-Lambert Absorption Law on Monochromatic Radiation: An experiment in spectrophotometry.** Journal of Chemical Education, v. 43, n. 5, p. 262, 1966. Acesso em: 16 de junho de 2022. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ed074p1459>

WU, F. *et al.* **Effects of earthworms and plant growth-promoting**

rhizobacteria (PGPR) on availability of nitrogen, phosphorus, and potassium in soil. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, v. 175, n. 3, p. 423-433, 2012.
Acesso em: 20 de junho de 2022. DOI: <https://doi.org/10.1002/jpln.201100022>

APÊNDICE A – CURVAS-PADRÃO DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO E SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO

Curva padrão P



Curva padrão AIA

