



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

ARIEL DE FIGUEIREDO NOGUEIRA MESQUITA

***CROSS-FEEDING* ENTRE ACTINOBACTÉRIAS E RIZÓBIOS DO SEMIÁRIDO
NORDESTINO E SEU PAPEL NA PROSPECÇÃO DE NOVOS BIOFERTILIZANTES**

FORTALEZA
2022

ARIEL DE FIGUEIREDO NOGUEIRA MESQUITA

CROSS-FEEDING ENTRE ACTINOBACTÉRIAS E RIZÓBIOS DO SEMIÁRIDO
NORDESTINO E SEU PAPEL NA PROSPECÇÃO DE NOVOS BIOFERTILIZANTES

Monografia apresentada ao Curso de 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. Claudia Miranda Martins

Co-orientador: M.Sc. Leonardo Lima Bandeira

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M543c Mesquita, Ariel de Figueiredo Nogueira.

Cross-feeding entre actinobactérias e rizóbios do Semiárido nordestino e seu papel na prospecção de novos biofertilizantes / Ariel de Figueiredo Nogueira Mesquita. – 2022.
74 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2022.

Orientação: Profa. Dra. Claudia Miranda Martins.

Coorientação: Prof. Me. Leonardo Lima Bandeira.

1. Actinomicetos. 2. Bactérias diazotróficas. 3. Coinoculação. 4. Facilitação. 5. Streptomyces. I. Título.
CDD 661

ARIEL DE FIGUEIREDO NOGUEIRA MESQUITA

CROSS-FEEDING ENTRE ACTINOBACTÉRIAS E RIZÓBIOS DO SEMIÁRIDO
NORDESTINO E SEU PAPEL NA PROSPECÇÃO DE NOVOS BIOFERTILIZANTES

Monografia apresentada ao Curso de 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. Cláudia Miranda Martins

Co-orientador: M.Sc. Leonardo Lima Bandeira

Aprovada em: 09/12/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Cláudia Miranda Martins (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dr^ª. Oscarina Viana de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dr^ª. Valéria Maria Araujo Silva
EEEP Francisca Rocha Silva

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará, por ser exemplo nacional de ensino, pesquisa e extensão da mais alta qualidade apesar das sucessivas tentativas de desmonte. Como cearense, e agora, graduado, não poderia ter mais orgulho de onde escolhi passar esses longos 5 anos;

À Central Analítica da UFC, pela tão estimada parceria que rendeu imagens incríveis, algumas das quais são mostradas neste trabalho;

À professora Cláudia Martins, pela excelente orientação que data da época que eu era monitor até hoje, e espero que perdure por muito tempo;

À professora Suzana, por ter me acolhido no LAMAB e me guiado pela mão na escrita dos meus primeiros textos científicos;

A toda equipe do LAMAB, por serem mais que colegas de trabalho, serem amigos de vida e de profissão;

Ao Fernando, por ter me guiado tão bem no início e ao longo dos meus experimentos e proporcionar as melhores fofocas da tarde;

Ao Léo e ao João Neto, por muitas vezes serem minha válvula de escape sem saber e sem pedir nada em troca;

A todos os membros atuais e antigos do ICAFest, o melhor projeto de integração e incentivo a permanência do curso: Amanda, Ariane, Arlene, Arthur, Bárbara, Camila, Daniel, Eric, Fábio, Gabi Sobral, Gui, Igor, Ítalo, Júnior, Livia Cardoso, Livia Pontes, Otávio, Samille;

A todos meus amigos da T8, por serem os melhores veteranos que eu poderia desejar;

Aos membros do Iluminati: Alana, Andrew, Ariane, Arlene, Bell, Biatec, Débora, Duda Guedes, Eric, Gui, Hector, Ianah, Júlia, Laryssa, Lina, Luan, Pedro, Samuel, Yandra. Mesmo distante, não esquecerei de todos os momentos bons, de aconselhamento e diversão. Cuidem bem do curso (principalmente vocês, novas velharais).

Aos ex-membros do QG: Bruno, Gabice, Laís, Thiago. Apesar dos desencontros da vida, sempre estarei aqui para vocês quatro. Obrigado por tudo;

Aos membros do Trio dos Cornos: tudo começou aqui, e apesar das circunstâncias não tão felizes, fico feliz de ter terminado aqui também;

À Camila, minha psicóloga, que foi essencial nos últimos (e mais difíceis) passos da minha graduação;

Aos meus tutores do *crossfit*, Fábio e Mona, pelo trabalho sensacional que tantas vezes me animou em dias sombrios;

À professora Norma Benevides, do Laboratório de Carboidratos e Lectinas, por ter me

recebido para minha primeira experiência de bancada. Trago comigo muito conhecimento dessa época que me ajuda muito até hoje;

A todos os professores que me acompanharam ao longo da minha vida, desde o Centro Educacional Laura Silva, até o Colégio Santa Isabel e agora a Universidade Federal do Ceará. Meu “eu” acadêmico é um retrato dos seus ensinamentos, e espero ser cada vez melhor;

A meu irmão Ádamo, a quem devo boa parte de quem sou hoje;

À minha mãe Margareth, meu modelo, minha “Bu”, minha confidente, minha alma gêmea. Obrigado pelos merecidos puxões de orelha, mas também pela compreensão e aconselhamento nos momentos difíceis. Te amo para sempre e além;

E, por fim, quero agradecer a mim. Isso, a mim. Por ter aguentado tudo isso, e só eu sei que não foi pouca coisa. Por ter passado centenas de horas sentado estudando, planejando experimentos, escrevendo, abdicando de muita coisa (e muitas vezes, de mim mesmo) para ser um profissional de qualidade e respeito. Espero atingir essa meta;

Muito obrigado a todos que passaram por minha vida e me marcaram ao longo desse tempo. Eu não seria o profissional e, acima de tudo, o ser humano que sou hoje se não fossem por vocês.

“Talvez um pouco de loucura seja essencial
para ter sucesso em uma pesquisa.”

-Alhaitham, Genshin Impact

RESUMO

Encontradas em solos, excretas animais, algas, líquens, plantas, oceanos e até ambientes extremos, actinobactérias são microrganismos Gram-positivos filamentosos conhecidos por produzir diversos metabólitos secundários. Sua capacidade de sintetizar antibióticos, imunossuppressores, antivirais e exoenzimas como celulase, amilase e xilanase confere a elas um grande potencial biotecnológico. Também encontrados no solo, os rizóbios são bactérias igualmente importantes econômica e ecologicamente. Responsáveis por transformar nitrogênio atmosférico em amônia, estão presentes principalmente em simbiose em nódulos radiculares de leguminosas. As condições desfavoráveis enfrentadas pelas plantas no solo do Semiárido as tornam dependentes dos microrganismos presentes em sua rizosfera, que são capazes de otimizar a atividade biológica do solo facilitando o crescimento vegetal. O objetivo deste trabalho foi coinocular cepas de bactérias de dois filos bacterianos isoladas de solos do Semiárido nordestino a fim de estudar o potencial das actinobactérias de facilitarem o crescimento dos rizóbios. A partir da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMAB) da Universidade Federal do Ceará, foram selecionadas 10 cepas de actinobactérias com atividade celulolítica, amilolítica e xilanolítica estatisticamente distintas das demais e 7 cepas de rizóbios identificadas geneticamente a nível de espécie e sem as referidas atividades enzimáticas. Foi realizada uma caracterização da macromorfologia e da micromorfologia das actinobactérias, observando suas estruturas via microscopia óptica e eletrônica. Foi feita uma coinoculação dos microrganismos em meios de cultura contendo amido, xilana e carboximetilcelulose como únicas fontes de carbono, a partir da qual o crescimento dos rizóbios foi avaliado. De um total de 70 pares de actinobactérias e rizóbios, 45 foram positivos no meio com CMC, 47 no meio com xilana e 9 no meio com amido. Assim, conclui-se que exoenzimas sintetizadas pelas actinobactérias hidrolisam os substratos em açúcares mais simples, permitindo que mesmo que as bactérias diazotróficas utilizadas não sejam capazes de metabolizar os substratos complexos, elas consigam crescer nesses meios de cultura. Essa interação se apresenta promissora para o desenvolvimento de um novo bioinoculante a base da coinoculação dessas duas rizobactérias promotoras do crescimento vegetal.

PALAVRAS-CHAVE: actinomicetos; bactérias diazotróficas; coinoculação; facilitação; *Streptomyces*.

ABSTRACT

CROSS-FEEDING BETWEEN ACTINOBACTERIA AND RHIZOBIA FROM BRAZILIAN NORTHEAST SEMIARID AND THEIR ROLE ON THE PROSPECTION OF NOVEL BIOFERTILIZERS

Found in soils, animal excreta, algae, lichens, plants, oceans and even extreme environments, actinobacteria are Gram-positive filamentous microorganisms known to produce various secondary metabolites. Their ability to synthesize antibiotics, immunosuppressants, antivirals and exoenzymes such as cellulase, amylase and xylanase gives them great biotechnological potential. Also found in soil, rhizobia are bacteria that are equally important economically and ecologically. Responsible for transforming atmospheric nitrogen into ammonia, they are mainly present in symbiosis in legume root nodules. The unfavorable conditions faced by plants in the semiarid soil make them dependent on the microorganisms present in their rhizosphere, which are capable of optimizing the biological activity of the soil, facilitating plant growth. The aim of this work was to co-inoculate strains from two bacterial phyla isolated from soils from the Brazilian Northeastern semi-arid region in order to study the potential of actinobacteria to facilitate rhizobia growth. From the culture collection of the Laboratory of Environmental Microbiology (LAMAB) of the Federal University of Ceará, 10 strains of actinobacteria with cellulolytic, amylolytic and xylanolytic activity statistically different from the others and 7 strains of rhizobia genetically identified at the species level and without the aforementioned enzymatic activities were selected. A characterization of the macromorphology and micromorphology of actinobacteria was carried out, observing their structures via optical and electron microscopy. Co-inoculation of microorganisms was performed in culture media containing starch, xylan and carboxymethylcellulose (CMC) as the sole carbon sources, from which rhizobia growth was evaluated. Of a total of 70 pairs of actinobacteria and rhizobia, 45 were positive in the medium with CMC, 47 in the medium with xylan and 9 in the medium with starch. Thus, it is concluded that exoenzymes synthesized by actinobacteria hydrolyze substrates into simpler sugars, allowing that even if the used diazotrophic bacteria are unable to metabolize complex substrates, they are able to grow in these culture media. This interaction is promising for the development of a new bioinoculant based on the co-inoculation of these two rhizobacteria that promote plant growth.

KEYWORDS: actinomycetes; co-inoculation; cross-feeding; diazotrophic bacteria; *Streptomyces*;

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 1 | - Coloração de Gram das cepas de actinobactérias sob ampliação de 1000x em microscópio óptico..... | 36 |
| Figura 2 | - Diversidade de cores do micélio aéreo das actinobactérias..... | 37 |
| Figura 3 | - Esporos das cepas de actinobactérias..... | 40 |
| Figura 4 | - Exemplo de interação antagônica entre as cepas de rizóbio L4 (esquerda) e de actinobactéria A146 (direita) no meio com CMC..... | 44 |
| Figura 5 | - Interação positiva entre as cepas de rizóbio L27 (esquerda) e de actinobactéria A143 (direita) no meio com xilana. Exemplo de resultado positivo..... | 45 |
| Figura 6 | - Ausência de interação entre as cepas de rizóbio L27 (inoculado no lado esquerdo da imagem, onde não há crescimento) e de actinobactéria A145 (direita) no meio com amido. Exemplo de resultado negativo..... | 46 |
| Figura 7 | - <i>Heatmap</i> do índice de compatibilidade das actinobactérias (ICA) em relação aos rizóbios do Semiárido nordestino associado a análise de agrupamento..... | 50 |
| Figura 8 | - <i>Heatmap</i> dos índices de compatibilidade dos rizóbios (ICR) em relação às actinobactérias do Semiárido nordestino..... | 51 |
| Figura 9 | - <i>Heatmaps</i> dos índices de antagonismo das actinobactérias (A) e dos rizóbios (B)..... | 52 |
| Figura 10 | - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das cepas A139 e A145..... | 54 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|---|----|
| Gráfico 1 - Aspecto das colônias de actinobactérias..... | 39 |
| Gráfico 2 - Diversidade dos gêneros das cepas de actinobactérias..... | 41 |
| Gráfico 3 - Diversidade das cadeias de esporos das actinobactérias..... | 42 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| Quadro 1 - Relação de alguns bioinoculantes conhecidos e suas respectivas aplicações.... | 26 |
| Quadro 2 - Cepas de rizóbios do Semiárido brasileiro pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMAB) e selecionadas para os testes de coinoculação..... | 31 |
| Quadro 3 - Detalhamento dos componentes e pH ideal dos meios de cultura utilizados na pesquisa..... | 32 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----------|---|----|
| Tabela 1 | - Características culturais macromorfológicas das cepas de actinobactérias..... | 38 |
| Tabela 2 | - Caracterização micromorfológica das cepas de actinobactérias..... | 41 |
| Tabela 3 | - Facilitação <i>in vitro</i> entre cepas de actinobactérias e rizóbios do Semiárido brasileiro no meio com CMC..... | 46 |
| Tabela 4 | - Facilitação <i>in vitro</i> entre cepas de actinobactérias e rizóbios do Semiárido brasileiro no meio com xilana..... | 47 |
| Tabela 5 | - Facilitação <i>in vitro</i> entre cepas de actinobactérias e rizóbios do Semiárido brasileiro no meio com amido..... | 47 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------|---|
| ANOVA | Análise de variância |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| BCG | Biosynthetic gene cluster |
| BNF | Fixação biológica de nitrogênio |
| B.O.D. | Demanda bioquímica de oxigênio |
| CD | Caseína-Dextrose |
| CDA | Caseína-Dextrose-Ágar |
| CMC | Carboximetilcelulose |
| CNPq | Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico |
| EPS | Exopolissacarídeos |
| ET | Etileno |
| FAP's | Fundação de Amparo à Pesquisa |
| IA | Índice de antagonismo |
| IAA | Índice de antagonismo das actinobactérias |
| IAR | Índice de antagonismo dos rizóbios |
| IC | Índice de compatibilidade |
| ICA | Índice de compatibilidade das actinobactérias |
| ICMBio | Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade |
| ICR | Índice de compatibilidade dos rizóbios |
| JA | Ácido jasmônico |
| MANOVA | Análise de variância multivariada |
| MEV | Microscopia eletrônica de varredura |
| NAD | Nicotinamida adenina dinucleotídeo |
| NPK | Nitrogênio, fósforo e potássio |
| PGPR | Rizobactérias promotoras do crescimento vegetal |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| SNF | Fixação simbiótica de nitrogênio |
| YM | Extrato de levedura-Manitol |
| YMA | Extrato de levedura-Manitol-Ágar |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 15 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 17 |
| 2.1 | Interações ecológicas bacterianas | 17 |
| 2.2 | <i>Cross-feeding no solo</i> | 18 |
| 2.3 | Actinobactérias e seu potencial biotecnológico | 19 |
| 2.4 | Rizóbios | 22 |
| 2.5 | Bioinoculantes | 24 |
| 3 | OBJETIVOS | 29 |
| 3.1 | Objetivo geral | 29 |
| 3.2 | Objetivos específicos | 29 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 30 |
| 4.1 | Escolha das cepas | 30 |
| 4.1.1 | <i>Repique das cepas escolhidas</i> | 31 |
| 4.2 | Caracterização das cepas | 33 |
| 4.2.1 | <i>Coloração de Gram</i> | 33 |
| 4.2.2 | <i>Caracterização cultural macromorfológica</i> | 33 |
| 4.2.3 | <i>Caracterização micromorfológica</i> | 33 |
| 4.3 | Facilitação <i>in vitro</i> | 34 |
| 4.4 | Seleção das cepas mais promissoras | 35 |
| 4.5 | Microscopia eletrônica de varredura | 35 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 36 |
| 5.1 | Caracterização das cepas | 36 |
| 5.1.1 | <i>Coloração de Gram</i> | 36 |
| 5.1.2 | <i>Caracterização cultural macromorfológica</i> | 37 |
| 5.1.3 | <i>Caracterização micromorfológica</i> | 40 |
| 5.2 | Facilitação <i>in vitro</i> | 43 |
| 5.3 | Seleção das cepas mais promissoras | 50 |
| 5.4 | Microscopia eletrônica de varredura | 53 |
| 6 | CONCLUSÃO | 56 |
| 7 | PERSPECTIVAS FUTURAS | 57 |
| | REFERÊNCIAS | 58 |
| | ANEXO 1: Artigo publicado | 71 |

1 INTRODUÇÃO

O feijão-caupi é a cultivar mais antiga conhecida pelo homem e tem sido plantado por mais de quatro mil anos (OSIPITAN *et al.*, 2021). Esse grão é fonte de boa parte das proteínas ingeridas em vários países africanos devido a seu baixo custo e crescimento em solos secos e pobres em nutrientes. Isso explica porque essa planta foi a quarta maior fonte de grãos secos no mundo dentre as leguminosas de 2008 a 2017 (JI *et al.*, 2019). Pertencente à família Fabacea, o feijão-caupi, ou *Vigna unguiculata*, cresce majoritariamente nos solos secos tropicais da América Latina, da África e do sul da Ásia (BOUKAR *et al.*, 2018).

Essa leguminosa, assim como muitas outras, tem suas raízes associadas a rizóbios, principalmente dos gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* (GIRIJA *et al.*, 2018). Rizóbios são bactérias conhecidas por formarem nódulos simbióticos nas raízes (e, mais raramente, no caule) de leguminosas e fixar nitrogênio atmosférico em formas assimiláveis pelas plantas. Esse nutriente é um dos elementos essenciais para a manutenção da vida, estando presente em aminoácidos, ácidos nucleicos, ATP e NAD em todas as células vivas, além de ser um componente importante da clorofila (LINDSTRÖM; MOUSAVI, 2019). A suplementação de nitrogênio nas plantações é cara e traz consigo grandes problemas de poluição, como eutrofização de corpos aquíferos e liberação de gases de efeito estufa (CLÚA *et al.*, 2018).

A inoculação de rizóbios, que são bioinoculantes naturais, é uma alternativa ao uso desses fertilizantes químicos pela sua capacidade de biodisponibilizar nitrogênio naturalmente para as plantas por meio de um processo denominado fixação biológica de nitrogênio (BNF). A BNF é responsável por fornecer entre 50 e 70 milhões de toneladas de nitrogênio biodisponível por ano mundialmente (SCHULTE *et al.*, 2021). Desde 2020, o Brasil é o principal produtor de soja no mundo, e a inoculação dessa leguminosa com cepas elite de *Bradyrhizobium* atende à necessidade de nitrogênio da planta e gera uma economia de US\$15 bilhões por ano que seriam gastos com fertilização nitrogenada (RODRIGUES *et al.*, 2020).

Muito se fala de rizóbios para enfatizar sua simbiose com plantas e a fixação de nitrogênio, fazendo com que um ponto muito importante passe despercebido: o ambiente rizosférico é extremamente hostil para os microrganismos ali presentes, e para ser capaz de estabelecer a simbiose com sucesso os rizóbios precisam primeiro sobreviver a competições com a microbiota local (POOLE *et al.*, 2018).

Com uma abundância relativa de aproximadamente 22% e podendo chegar até a 62% em solos desertificados, o filo Actinobacteria é um dos filos bacterianos mais abundantes no solo e, por consequência, interage diretamente com os rizóbios na rizosfera. Essas bactérias

são capazes de aumentar a absorção de umidade no solo e estimular o crescimento microbiano (ARAUJO *et al.*, 2020).

Apesar desse estímulo, as actinobactérias são produtoras de grande variedade de compostos antimicrobianos. De fato, cerca de dois terços dos antibióticos conhecidos são produzidos por actinobactérias, principalmente pelo gênero *Streptomyces* (TAKAHASHI; NAKASHIMA, 2018). Por isso, a compatibilidade entre os rizóbios e as actinobactérias é essencial para o estabelecimento da simbiose entre o rizóbio e a planta e, conseqüentemente, para o crescimento e desenvolvimento adequado do vegetal. Partindo dessas definições, podemos assumir que a capacidade fixadora de nitrogênio dos rizóbios aliada à variedade de metabólitos secundários produzidos pelas actinobactérias pode resultar em um bioinoculante promissor para o crescimento e desenvolvimento das plantas.

Bioinoculantes são microrganismos essenciais no combate a estresses bióticos e abióticos nas plantas. Também chamados de “rizobactérias promotoras do crescimento vegetal” (PGPR), esses microrganismos são capazes de executar atividades como a hidrólise de exsudatos a fim de evitar o estresse osmótico, e a produção de deaminases, ácido indolacético, sideróforos, enzimas solubilizadoras de fosfato e enzimas microbiocidas/bióticas (ENEBE; BABALOLA, 2018).

Segundo Dineshkumar e colaboradores (2017), biofertilizantes são “produtos contendo microrganismos vivos ou dormentes (bactérias, actinobactérias, fungos, algas), sozinhos ou em combinação, que ajudam a fixar o nitrogênio atmosférico ou solubilizar nutrientes do solo”. PGPR também beneficiam a planta por meio da produção e liberação de substâncias promotoras de crescimento, capazes de aumentar a produtividade da planta. Alguns bioinoculantes podem apresentar atividade biofertilizante aliada a antimicrobiana, como algumas espécies de *Pseudomonas* e *Bacillus* que estimulam o crescimento vegetal ao passo que antagonizam patógenos e estimulam as defesas das plantas (OROZCO-MOSQUEDA *et al.*, 2021).

Para que um consórcio microbiano seja capaz de estimular o crescimento de uma planta, assume-se que esses microrganismos devem ser, antes de tudo, compatíveis entre si. Por isso, é válida a realização de coinoculações *in vitro* antes de partir para ensaios *in vivo* em associação com plantas. Esses passos são importantes tanto para a exclusão de pares de microrganismos antagonísticos, quanto para a seleção dos pares que apresentam cooperação metabólica. As interações *in vitro* entre as actinobactérias e os rizóbios foram estudadas mais a fundo neste trabalho, dando ênfase no potencial desse consórcio para o desenvolvimento de um bioinoculante capaz de estimular o crescimento vegetal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Esta seção apresenta alguns tópicos importantes para a compreensão e embasamento teórico do trabalho. Foi feita uma revisão de literatura que apresenta o estado da arte no que diz respeito a actinobactérias, rizóbios, suas interações no solo e seu potencial como bioinoculantes.

2.1 Interações ecológicas bacterianas

Seres vivos em geral interagem quando precisam dividir um mesmo espaço e com microrganismos não é diferente. Ao longo do crescimento de uma colônia, as bactérias podem se especializar em tarefas diferentes, dividindo e otimizando o trabalho. A constante troca de diferentes metabólitos entre as células é fruto de uma maior eficiência metabólica da colônia, o que aumenta suas chances de ser bem-sucedida (EVANS *et al.*, 2020).

Bactérias possuem até 42% de seus genes codificando características envolvidas em relações ecológicas (PHELAN *et al.*, 2011). Na natureza, bactérias costumam competir por inúmeros fatores limitantes como habitats mais favoráveis, minerais e nutrientes diversos. Por isso, esses microrganismos desenvolveram inúmeras estratégias para permitir o crescimento e a reprodução sob essas condições, como secreção de toxinas e antibióticos. A produção desses metabólitos confere uma vantagem para o crescimento da bactéria que as produziu, em detrimento do restante da microbiota local (D'SOUZA *et al.*, 2018).

De forma geral, relações antagônicas costumam se sobrepor a relações neutras, que por sua vez se sobrepõem a relações positivas (LITTLE *et al.*, 2008). Essas relações antagônicas interbacterianas costumam tratar da secreção de pequenas moléculas difusíveis (metabólitos secundários antibacterianos) e de toxinas proteicas antibacterianas (peptídeos antimicrobianos). Quando presentes em um mesmo meio, é bem comum bactérias competirem por nutrientes para conseguir crescer (KLEIN *et al.*, 2020). Contudo, interações mais complexas podem ocorrer, onde o produto do metabolismo de uma cepa pode ser utilizado para o crescimento de outra. Essa relação ecológica positiva é denominada “*cross-feeding*”, cooperação metabólica ou facilitação (SMITH *et al.*, 2019).

Ao transferir moléculas via difusão, as bactérias ficam sujeitas à perda ou degradação dessas moléculas ou até ao consumo por terceiros. Por isso, algumas bactérias evoluíram para possuir alguns métodos de entregar as moléculas pretendidas diretamente ao destinatário. Métodos como vesículas na membrana externa, canais, nanotubos, pili, ou até

mesmo a fusão das membranas com troca de citoplasma podem ser utilizados para viabilizar essa troca de metabólitos de forma mais precisa (PANDE *et al.*, 2015). Esses métodos, contudo, exigem que as bactérias mantenham um contato físico próximo. Como nem sempre essa proximidade é possível, se torna necessária a adoção de outros métodos para que as bactérias possam cooperar.

Smith *et al.* (2019) dedicaram uma boa parte de sua revisão sobre *cross-feeding* bacteriano classificando e descrevendo diversas formas de cooperação metabólica entre bactérias. Em suma, os autores definem quatro classes gerais: *cross-feeding* de metabólitos, *cross-feeding* de substrato, *cross-feeding* mútuo e *cross-feeding* aumentado. O primeiro caso refere-se a quando uma bactéria se aproveita dos subprodutos do metabolismo de outra, que se alimenta de fontes de carbono complexas. O *cross-feeding* de substrato ocorre quando uma bactéria libera enzimas extracelulares para degradar um determinado substrato. Os produtos dessa degradação podem ser aproveitados tanto pela bactéria produtora das exoenzimas quanto pela oportunista. Já o *cross-feeding* mútuo nada mais é do que algum dos exemplos anteriores, mas quando ambas as bactérias alimentam e são alimentadas pela outra. Por fim, o *cross-feeding* aumentado é um tipo de *cross-feeding* mútuo, onde uma bactéria A intensifica o fluxo metabólico de síntese do produto aproveitado pela bactéria B, recebendo subprodutos do metabolismo de B em troca.

2.2 Cross-feeding no solo

O solo é um ambiente heterogêneo onde é comum fatores bióticos e abióticos interagirem e influenciarem um ao outro. Por exemplo, a dinâmica de nutrientes como carbono e nitrogênio, assim como o clima, têm efeito direto na diversidade e ecologia dos microrganismos do solo (MANDAL *et al.*, 2020). A abundância e diversidade das bactérias e fungos edáficos é tamanha que suas atividades metabólicas têm impactos diretos nos ciclos biogeoquímicos a nível de biosfera (SHARMA *et al.*, 2020).

Há uma grande diversidade e complexidade de carboidratos no solo. Como há um elevado custo metabólico para produzir e excretar enzimas para hidrolisar essas fontes de carbono, às vezes se faz necessário que diferentes espécies de microrganismos cooperem para metabolizá-las. Dada a variedade de açúcares no solo, sistemas cooperativos são comuns (LARSBRINK; MCKEE, 2020). Há também vias de mão única, onde microrganismos “trapaceiros” se aproveitam do produto das reações catalisadas por exoenzimas produzidas por outros microrganismos, já que essas moléculas pequenas são capazes de se difundir para longe

do produtor das enzimas (VAN TATENHOVE-PEL *et al.*, 2021).

Um exemplo de cooperação metabólica no solo é a formação de biofilmes multiespécies. A heterogeneidade do solo disponibiliza diversas estruturas para a formação de biofilmes, dentre as quais superfícies ricas em carbono como raízes, hifas de fungos e matéria orgânica em decomposição são as mais utilizadas pelas bactérias. Biofilmes no solo nada mais são do que um agregado de diferentes espécies de microrganismos que produzem uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS). A proximidade entre os microrganismos proporcionada pelo biofilme favorece a troca de metabólitos, mas essa estrutura é mais famosa por proteger as bactérias contra estresses ambientais, predação, desidratação e antibióticos, assim como melhorar a disponibilidade de nutrientes e oxigênio (CAI *et al.*, 2019).

De um ponto de vista evolutivo, o estilo de vida sésil proporcionado pelos biofilmes garante às diversas espécies de microrganismos que o formam vantagens sobre microrganismos de vida livre. Um crescimento melhor durante períodos de desidratação e mais oportunidades de transferência horizontal de genes são alguns exemplos. Apesar dos pontos positivos dos biofilmes serem bem conhecidos e estudados, algumas características como os determinantes ecológicos e biológicos para sua formação, sua influência na atividade metabólica microbiana e a estrutura das comunidades formadas ainda são desconhecidos (WU *et al.*, 2019).

Rizobactérias também são capazes de formar biofilmes, sendo os gêneros *Acetobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus*, *Serratia* e *Streptomyces* alguns exemplos de bactérias largamente encontradas na rizosfera com essa habilidade. No geral, os biofilmes de rizobactérias são os mesmos que os biofilmes normais, mas possuem algumas diferenças ecológicas. Rizobactérias convivem naturalmente em consórcio, interagindo umas com as outras, mas também influenciam o metabolismo das plantas. Biofilmes rizobacterianos multiespécies colonizam as raízes e promovem o crescimento vegetal, além de prevenir os ataques de patógenos, sendo assim de fundamental importância para a agricultura sustentável (NAYAK *et al.*, 2020).

2.3 Actinobactérias e seu potencial biotecnológico

Presentes majoritariamente no solo, mas também em oceanos, ambientes extremos, tecidos vegetais, excretas animais, algas e líquens (SINGH; DUBEY, 2018), o filo *Actinobacteria* é um dos mais antigos do reino Bacteria e teve papel vital na colonização do ambiente terrestre (LAW *et al.*, 2020). Esses microrganismos são muito diversos entre si e entre

as outras bactérias (LEWIN *et al.*, 2016), o que os levou por muito tempo a serem chamados de *Actinomycetes* devido à sua semelhança morfológica com fungos filamentosos. As características em comum entre essas duas classes de microrganismos fizeram com que, por muito tempo, actinobactérias fossem consideradas uma transição entre bactérias e fungos. Contudo, com o avanço das tecnologias, se observou que a morfologia dos “actinomicetos” era muito mais semelhante com a de Procariotos do que com a de Eucariotos, como células delgadas, com um cromossomo armazenado em um nucleóide, parede celular de peptidoglicano e suscetibilidade a antibacterianos (BARKA *et al.*, 2015).

Diferente das bactérias em geral, actinobactérias são capazes de formar micélio aéreo e reverso (ou de substrato) e de se reproduzir por esporulação (por fragmentação e segmentação ou formação de conídios) (ANANDAN *et al.*, 2016). As principais formas de diferenciação fenotípica entre esses microrganismos é a presença ou ausência de micélio aéreo e reverso, cor do micélio, difusão de pigmentos no meio e a estrutura e aparência de suas cadeias de esporos (BARKA *et al.*, 2015). Actinobactérias apresentam-se como Gram-positivas e em geral apresentam altos níveis de guanina e citosina (G + C) em seu cromossomo único, podendo chegar a até 70% (LEWIN *et al.*, 2016). Frequentemente, as actinobactérias apresentam longos plasmídeos lineares, sendo que alguns gêneros como *Streptomyces*, *Actinomyces*, *Amycolatopsis*, *Actinoplanes*, *Streptoverticillium* e *Micromonospora* apresentam também cromossomo linear (VENTURA *et al.*, 2007).

Actinobactérias apresentam uma abundância relativa de 22% no solo, que é um de seus principais habitats. Solos desertificados podem apresentar uma abundância de até 62% desses microrganismos (ARAUJO *et al.*, 2020), onde desempenham papéis vitais como estabilizar partículas de argila e matéria orgânica, aliviar estresse biótico e abiótico das plantas, fixar nitrogênio, solubilizar fontes de fósforo, decompor resíduos vegetais (SOLANS *et al.*, 2021), hidrolisar polímeros complexos e recalcitrantes (como lignocelulose, queratina e quitina) e solubilizar cutículas de insetos, conchas de crustáceos e a parede celular de fungos e plantas (LACOMBE-HARVEY, 2018).

Em ambientes hostis como o Semiárido, onde é comum se observar solos em processo de desertificação, a sobrevivência das plantas depende em boa parte da comunidade de microrganismos a ela associados, seja na rizosfera ou em simbiose. Nesse solo pobre em água, os microrganismos são essenciais para modificar a estrutura do solo de forma a otimizar a atividade biológica, por exemplo, retendo água (SOLANS *et al.*, 2021). O cheiro característico de “terra molhada” é proveniente também das actinobactérias, que produzem um terpeno chamado geosmina, que é o que confere esse odor (SALWAN; SHARMA, 2020).

Algumas actinobactérias inclusive atuam como endofíticos, principalmente de plantas medicinais e em florestas tropicais. As raízes da planta hospedeira liberam exsudatos que impactam diretamente a microbiota presente na rizosfera (TANVIR *et al.*, 2018). Quando em simbiose com plantas (mais comumente nas raízes), as actinobactérias atuam principalmente produzindo fitormônios ou outros fatores de crescimento, aumentando a resistência a estresses bióticos e abióticos, a insetos, a pestes e a patógenos em troca de nutrientes e abrigo na planta hospedeira (SINGH *et al.*, 2018). As actinobactérias são capazes também de suprimir competidores pela síntese de antibióticos (BAO *et al.*, 2021). Essa diversa produção de metabólitos secundários justifica atualmente cerca de 45% dos 22.500 compostos conhecidos com atividade biológica serem extraídos de actinobactérias. Ademais, esses microrganismos produzem 80% dos antibióticos conhecidos, com destaque para os gêneros *Streptomyces* e *Micromonospora* (MAJIDZADEH *et al.*, 2021).

É inegável o valor biotecnológico do filo *Actinobacteria*. Esses microrganismos são famosos por sintetizar e excretar metabólitos secundários de alto interesse industrial, como imunossupressores, compostos anticâncer, antivirais, antifúngicos, antiparasitários, antihelmínticos e, como já mencionado, antibacterianos (GOODFELLOW *et al.*, 2018; MAJIDZADEH *et al.*, 2021; VAN BERGEIJK, 2020). Actinobactérias também sintetizam enzimas extracelulares como amilases, celulasas e xilanases (SATRIA *et al.*, 2020; FATMAWATI *et al.*, 2018).

Amilases são enzimas com potencial de aplicação em diversos campos, como médico, têxtil e produção de etanol, assim como no tratamento de frutas como bananas, mangas e frutas cítricas, lavagem de biorreatores da indústria de alimentos, escarificação de amido e indústrias de fermentação e destilação (AL-AGAMY *et al.*, 2021).

Já celulasas são enzimas capazes de hidrolisar celulose em glicose devido a suas subunidades exoglucanase, endoglucanase e beta-glucosidase. Essa capacidade da celulase a torna relevante em processos industriais têxteis, alimentícios, melhoramento de rações animais, produção de detergentes, indústria de polpa e papel, extração de componentes de chá verde e produção de bioetanol a partir de biomassa lignocelulósica (ISLAM; ROY, 2019; BHATI *et al.*, 2020). A lignocelulose, maior fonte de biomassa vegetal do mundo, é formada majoritariamente por celulose (35-50%) e por hemicelulose (20-35%). A maior parte da hemicelulose é formada por xilana, sendo este o segundo componente mais abundante após a celulose (PUTRI; SETIAWAN, 2019).

A xilanase é responsável por converter xilana em xilose, dessa forma, degradando a hemicelulose, componente essencial das paredes celulares vegetais e disponibilizando esses

nutrientes para microrganismos presentes em fontes vegetais (ÇIÇEKLER, 2022). A degradação de lignocelulose proveniente de resíduos vegetais é a principal aplicação industrial das xilanases, onde são utilizadas na produção de biocombustíveis, redução da viscosidade de sucos e rações e na indústria de papel, como branqueador da polpa da madeira para produção de papel de melhor qualidade (KAUSHAL *et al.*, 2021).

O gênero que mais se destaca na produção dessas exoenzimas de interesse industrial é o *Streptomyces* (RACHMANIA *et al.*, 2020; KUMAR *et al.*, 2020; MIHAJLOVSKI *et al.*, 2020). Esse gênero é o mais abundante dentre as actinobactérias, e também é dele que se extraem os antibióticos estreptomicina, gentamicina, rifamicina, cloranfenicol e eritromicina (AL-SHAIBANI *et al.*, 2021). O gênero *Streptomyces* possui 1134 espécies e 71 subespécies (PARTE *et al.*, 2020). Sua importância é tamanha que actinobactérias pertencentes a outros gêneros são chamadas de “actinobactérias raras” (YIN *et al.*, 2018). Esse termo, contudo, parece ser impróprio, alguns autores como por exemplo Jose *et al.* (2019) sugerem classificar esses microrganismos como “actinobactérias não-*Streptomyces*”, que melhor define actinobactérias menos abundantes, mas ainda destaca a importância do gênero dominante.

Streptomyces têm um ciclo de vida multicelular onde passam por diversas mudanças morfológicas e fisiológicas. Após a germinação do esporo, a bactéria cresce por extensão das extremidades e vai formando uma rede de hifas conhecidas como micélio reverso ou de substrato. A maturação da colônia leva à diferenciação de um micélio aéreo a partir de divisão celular e geração de esporos monoploides. É nessa etapa de diferenciação que os famosos metabólitos secundários são produzidos, com o objetivo de permitir a sobrevivência do indivíduo mesmo em ambientes desfavoráveis (LAW *et al.*, 2019).

Por conter vários grupos de genes biosintéticos (BGC, biosynthetic gene clusters), actinobactérias têm a flexibilidade metabólica necessária para se tornarem alvos promissores de engenharia metabólica para produção de metabólitos secundários de alto valor agregado (AL-SHAIBANI *et al.*, 2021). BGCs são regiões genômicas que contêm três ou mais genes não homólogos que codificam enzimas biosintéticas. Os genes presentes em BGCs geralmente formam uma rota biosintética específica e costumam ser expressos simultaneamente (POLTURAK *et al.*, 2022).

2.4 Rizóbios

Outro grupo de bactérias presentes no solo, mais especificamente nas raízes de leguminosas, são os rizóbios. O termo “rizóbio” é um termo guarda-chuva para definir bactérias

de oito famílias, sendo sete α -Proteobacterias (Rhizobiaceae, Phyllobacteriaceae, Nitrobacteriaceae, Methylobacteriaceae, Brucellaceae, Hyphomicrobiaceae e Xanthobacteriaceae), mais comuns, e uma β -Proteobacteria (Burkholderiaceae). Atualmente, são conhecidas 226 espécies de rizóbios distribuídas em 19 gêneros: *Agrobacterium*, *Allorhizobium*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*), *Neorhizobium*, *Pararhizobium*, *Rhizobium*, *Shinella*, *Aminobacter*, *Phyllobacterium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Microviga*, *Methylobacterium*, *Brucella* (*Ochrobactrum*), *Devosia*, *Azorhizobium*, *Cupriavidus*, *Paraburkholderia* e *Trinickia* (HELENE *et al.*, 2022).

Rizóbios são bactérias aeróbicas Gram-negativas móveis (têm de um a seis flagelos peritríquios) em forma de bastão, não formadoras de esporos, com colônias mucosas e convexas variando de branca a bege, e de brilhante a opaca (KUYKENDALL *et al.*, 2015). Em geral, rizóbios são classificados quanto ao seu tempo de crescimento (rápido ou lento) e efeito no pH do meio de cultura YMA (ágar-extrato de levedura-manitol). Espécies de crescimento rápido costumam acidificar o pH do meio, enquanto espécies de crescimento lento não costumam alterar o pH desse meio (SADOWSKI *et al.*, 1983).

A importância desses microrganismos se dá pela sua capacidade de estabelecer uma relação simbiótica com as raízes de leguminosas e induzir a formação de nódulos, onde irão realizar a fixação biológica de nitrogênio (BNF). Apesar do nitrogênio ser o gás mais abundante na atmosfera, ele não está biodisponível para as plantas. Em busca do nitrogênio, as leguminosas liberam flavonoides pelas suas raízes, atraindo os rizóbios para a rizosfera, onde irão secretar os fatores de nodulação (YANG *et al.*, 2021). Os rizóbios se prendem às raízes, formando um bolso de infecção, e secretam celulases para conseguir penetrar nas raízes. Assim, a planta irá dar origem a um meristema nodulífero, que irá se desenvolver e atrair as células bacterianas para seu interior. Por fim, as bactérias são aprisionadas em estruturas semelhantes a organelas denominadas simbiossomas, onde irão se diferenciar em bacterióides e terminar a maturação dos nódulos. Dentro do ambiente microaerófilo desses nódulos maduros, os rizóbios estão prontos para reduzir o nitrogênio atmosférico (N_2) em amônia por meio das enzimas nitrogenases (POOLE *et al.*, 2018).

O complexo enzimático nitrogenase é onde ocorre a fixação de nitrogênio em todos os organismos diazotróficos conhecidos. Rizóbios possuem em seu genoma os genes *nif*, responsáveis pela síntese do complexo nitrogenase e de várias enzimas regulatórias da fixação de nitrogênio, que também podem ser codificadas pelos genes *fix* (LINDSTRÖM; MOUSAVI, 2019). O complexo nitrogenase é composto por duas proteínas: uma delas, a dinitrogenase redutase (ferroproteína), possui um cluster Fe_4S_4 , e a outra, dinitrogenase (molibdênio-

ferroproteína), tem clusters Fe_8S_7 e cofatores FeMo ($MoFe_7S_9C$ -homocitrato). Por isso, a síntese da nitrogenase e conseqüentemente a fixação de nitrogênio são dependentes de enxofre, e sua presença no solo está diretamente ligada à relação simbiótica rizóbio-planta (SCHNEIDER *et al.*, 2018).

A forma final do nitrogênio fixado pelo rizóbio irá depender da leguminosa a qual está associado. Em plantas de ambientes temperados, a amônia é convertida em glutamina e asparagina, e em ambientes tropicais, em ureides como alantoina e ácido alantoico. O nitrogênio é biodisponibilizado às plantas via xilema, que em troca fornecem fontes de carbono e energia em uma das mais famosas relações simbióticas da natureza (BOSSE *et al.*, 2021). A diversidade de formas finais do nitrogênio acompanha a diversidade de leguminosas colonizadas por rizóbios, que consiste em 750 gêneros de plantas (RAJKUMARI *et al.*, 2022).

A nodulação é controlada principalmente pelo vegetal, que pode, até mesmo, impedir a permanência de nódulos colonizados por rizóbios com baixa eficiência de fixação de nitrogênio. Por isso, alguns rizóbios podem desenvolver mecanismos e estratégias para melhorar sua capacidade de nodulação e de fixação de nitrogênio em uma dada planta (BASILE; LEPEK, 2021). A BNF é o meio mais eficiente de fornecer nitrogênio para as plantas. Além de permitir a economia dos bilhões de dólares gastos anualmente em fertilizantes nitrogenados industrializados, que são poluentes e originários de fontes fósseis (não renováveis), o uso de rizóbios como disponibilizadores de nitrogênio para as plantas é uma alternativa bem mais acessível para fazendeiros de subsistência (DICENZO *et al.*, 2018).

2.5 Bioinoculantes

A Revolução Verde consistiu em um conjunto de iniciativas adotadas mundialmente para melhorar as produções agrícolas, principalmente em países em desenvolvimento. Isso foi alcançado pela melhoria na irrigação, uso de grandes quantidades de nutrientes químicos e plantio de cultivares de alta produtividade. Contudo, essas estratégias ocasionaram graves problemas ambientais, como a diminuição da saúde biológica e físico-química do solo, perda da biodiversidade, erosão genética, desbalanço ecológico, diminuição da tolerância a estresse das plantas, dentre outros (MAITRA *et al.*, 2021). Uma estratégia para diminuir o uso de agroquímicos sintéticos e combater essa deterioração do solo seria o aproveitamento do potencial genético e biológico das cultivares e dos microrganismos associados às plantas (BASU *et al.*, 2021).

Microrganismos endofíticos são aqueles que colonizam os tecidos vegetais sem

causar doenças e estabelecem uma relação benéfica com sua hospedeira, produzindo fitormônios, enzimas, antagonizando patógenos, estimulando a fitorremediação e biodisponibilizando nutrientes (ALKAHTANI *et al.*, 2020; CHAUDHARY *et al.*, 2020). Essas rizobactérias benéficas incluem rizóbios, algumas actinobactérias, fungos micorrízicos e bactérias de vida livre (DUTTA; PODILE, 2010).

As bactérias que vivem na rizosfera e estimulam o crescimento da planta através de um ou mais mecanismos, mesmo na presença de competidores, são chamadas de “rizobactérias promotoras do crescimento vegetal” (PGPR) e representam de 2 a 5% da microbiota rizosférica (OO *et al.*, 2020). PGPR podem ser extracelulares (ePGPR), vivendo na rizosfera, no rizoplano, ou nos espaços entre as células do córtex vegetal. Alguns exemplos de ePGPR são bactérias do gênero *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Erwinia*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* e *Serratia*. Já as PGPR intracelulares (iPGPR) colonizam geralmente estruturas especializadas (nódulos) nas raízes e costumam ser dos gêneros *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, dentre outros (PRASAD *et al.*, 2019).

Actinobactérias são capazes de agir como PGPR de forma direta e indireta. O método direto inclui produção de sideróforos e fitocromos, solubilização de fosfato e fixação de nitrogênio, enquanto o indireto inclui a síntese de exoenzimas líticas, antibióticos, compostos voláteis e competindo com patógenos por nutrientes (HAYAT *et al.*, 2020). Actinobactérias dos gêneros *Streptomyces*, *Thermobifida*, *Frankia*, *Nocardia*, *Kitasatospora*, *Micromonospora*, *Actinomadura*, *Streptosporangium*, *Actinoplanes* foram reportados como PGPR com as mais variadas aplicações (FRANCO-CORREA; CHAVARRO-ANZOLA, 2016).

Todos os microrganismos citados até agora neste trabalho podem ser considerados exemplos de bioinoculantes. Por definição, bioinoculantes são microrganismos que estimulam o crescimento vegetal ao colonizar seu sistema radicular. De forma geral, esses microrganismos agem na absorção de nutrientes e proteção contra doenças, mas podem ser aplicados até mesmo em biorremediação de poluentes. O efeito dos bioinoculantes na saúde da planta também está relacionado com o mecanismo de resistência sistêmica induzida (ISR), que é ativado pelas rotas JA/ET (ácido jasmônico/etileno) e ácido salicílico (CHAUDHARY; SHUKLA, 2019). É por todos esses benefícios que se torna evidente que formulações a base de PGPR são uma alternativa promissora para minimizar o uso de fertilizantes sintéticos e agroquímicos na agricultura, que a longo prazo podem causar acidificação do solo e redução da absorção de nutrientes pelas raízes (LAU *et al.*, 2020).

Um aspecto negativo do uso de bioinoculantes na agricultura vem do ponto de vista ecológico, uma vez que a inoculação de PGPR pode afetar a microbiota nativa. Essas interações

podem ser positivas ou negativas, e irão depender das características físicas e químicas do solo e demais condições abióticas. Mudanças na população de microrganismos daquela área pode afetar a qualidade e fertilidade do solo, por isso é de interesse da indústria um melhor entendimento das interações entre os bioinoculantes e os microrganismos nativos a fim de potencializar sua eficácia (MANFREDINI *et al.*, 2021).

A semântica dos termos bioinoculante, biofertilizante e biopesticida varia muito na literatura, muitas vezes sendo tidos como sinônimos (PHATAK; KUMAR, 2016). Contudo, bioinoculantes são um termo geral para tratar dos microrganismos benéficos para as plantas, e os mesmos podem ser classificados quanto à sua ação em biofertilizantes, se melhorarem a biodisponibilidade de nutrientes no solo, e em biopesticidas, se antagonizarem fitopatógenos. No Quadro 1 é possível observar alguns bioinoculantes conhecidos na agricultura.

QUADRO 1 – Relação de alguns bioinoculantes conhecidos e suas respectivas aplicações

| Biofertilizantes | | |
|-----------------------------------|-------------|---|
| Função | Tipo | Nome |
| Fixadores de nitrogênio | Bactérias | <i>Rhizobium, Azotobacter, Azospirillum, Frankia</i> |
| Solubilizadores de zinco | | <i>Bacillus sp., Pseudomonas sp., Enterobacter sp., Mycobacterium sp.</i> |
| Solubilizadores de fosfato | | <i>Bacillus megaterium, Pseudomonas sp., Rhodococcus, Serratia, Micrococcus</i> |
| Solubilizadores de fosfato | Fungos | Micorrizas arbusculares, <i>Penicillium, Piriformospora indica</i> |
| Mobilizadores de micronutrientes | | Micorrizas arbusculares |
| Biopesticidas | | |
| Nome | Tipo | Alvos |
| <i>Bacillus sp.</i> | Bactérias | <i>Fusarium, Verticillium, Ascochyta, Alternaria, Xanthomonas, Erwinia</i> |
| <i>Bacillus thuringiensis</i> | | Lagartas, carunchos, cigarrinhas, insetos |
| <i>Serratia sp.</i> | | <i>Sclerotium</i> |
| <i>Pseudomonas sp.</i> | | <i>Penicillium, Botrytis cinerea, Mucor, Pythium</i> |
| <i>Gliocladium sp.</i> | Fungos | <i>Penicillium, Aspergillus, Fusarium</i> |
| <i>Trichoderma sp.</i> | | <i>Fusarium, Macrophomina, Ascochyta, Cercospora</i> |
| <i>Verticillium lecanii</i> | | Tripes, moscas brancas, pulgões, cochonilhas |
| Vírus da poliedrose nuclear (NPV) | Vírus | Lagartas, minhocas, mariposas, broca-do-milho |

Fonte: KUMAR, 2018

O uso de rizóbios como biofertilizantes de leguminosas é uma tecnologia bem estabelecida, devido à capacidade dessas bactérias de reduzirem a necessidade de adubação nitrogenada fruto do aumento da absorção de nitrogênio pelas plantas promovido pela SNF (LADAN *et al.*, 2022). As relações simbióticas entre os rizóbios e as plantas já são bem estudadas, desde o *quorum-sensing* para a formação dos nódulos, até a evolução dirigida dos rizóbios em simbiose na direção do mutualismo com a planta. Hoje, se sabe que o crescimento vegetal estimulado por PGPR em geral não se dá pela fixação de nitrogênio diretamente, e sim pela produção de fitormônios (MIA; SHAMSUDDIN, 2010).

As leguminosas são conhecidas há séculos como tendo um efeito positivo na fertilidade do solo, e só mais tarde foi descoberto que esse efeito era na realidade fruto da ação biofertilizante dos rizóbios (PALAI *et al.*, 2021). O avanço dos estudos nessa área levou a, em 1896, o depósito da primeira patente de um biofertilizante a base de *Rhizobium*, que levou o nome de Nitragin (NOBBE; HILTNER, 1896). O uso de bioinoculantes mistos de rizóbios com outras PGPR são considerados os “inoculantes supremos”, devido a seu potencial para o desenvolvimento de novos produtos comerciais. Contudo, ainda há certa hesitação para o uso de bioinoculantes por parte dos agricultores. Isso ocorre porque muitas vezes as formulações comerciais são estabelecidas sem muito rigor científico, levando a produtos com pouco impacto na fertilidade do solo e no rendimento da colheita. Apesar disso, é consenso na comunidade científica que biofertilizantes são produtos baratos, sustentáveis e efetivos que remediaram os impactos negativos causados pela fertilização química (ATIENO *et al.*, 2020).

É possível encontrar na literatura diversos exemplos de sucesso de coinoculação de rizóbios e outras PGPR. *Bradyrhizobium*, por exemplo, apresentam resultados positivos no crescimento e desenvolvimento da planta quando coinoculados com *Pseudomonas oryzihabitans*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumillus*, micorrizas (*Glomus clarum*, *Glomus mosseae*, *Gigaspora margarita*) (KUMAWAT *et al.*, 2022; MILJAKOVIĆ *et al.*, 2022; JABBOROVA *et al.*, 2021; SHETEIWY *et al.*, 2021), dentre outros.

Actinobactérias têm efeito positivo na nodulação e crescimento de leguminosas, como a coinoculação de soja com *Bradyrhizobium japonicum* e *Streptomyces* sp. e *Nocardia* sp., e de alfafa com *Sinorhizobium meliloti* e *Micromonospora* spp. ou *Frankia*, que estimula a nodulação até mesmo em solos com altos níveis de nitrogênio, condição que costuma inibir a nodulação (SAIDI *et al.*, 2021). A prospecção de bioinoculantes a base de actinobactérias e rizóbios, mais especificamente entre os gêneros *Streptomyces* e *Bradyrhizobium*, é bem documentada na literatura (HTWE *et al.*, 2019; SOE; YAMAKAWA, 2013; HTWE *et al.*, 2018;

HTWE; YAMAKAWA, 2016). Diante disso, é evidente que esses dois gêneros se destacam quando se fala na prospecção de novas PGPR com potencial bioinoculante. A variedade de plantas e sua respectiva microbiota edáfica observada ao redor do mundo torna necessário o uso de bioinoculantes mais adequados para cada local e condições climáticas. Por exemplo, microrganismos isolados de zonas Semiáridas são mais adequados para aplicação biotecnológica em cultivares utilizadas nesse clima, por isso é preciso estudar a coinoculação de microrganismos a nível local.

3 OBJETIVOS

Os objetivos geral e específicos da pesquisa são apresentados a seguir.

3.1 Objetivo geral

Coinocular cepas de actinobactérias e rizóbios a fim de prospectar um novo bioinoculante para uso na agricultura, por meio da avaliação da capacidade de cooperação metabólica entre esses dois filos bacterianos diferentes isolados de solos de zonas Semiáridas brasileiras.

3.2 Objetivos específicos

- a) Escolher isolados de actinobactérias com elevada atividade celulolítica, amilolítica e xilanolítica significativamente distintas;
- b) Selecionar cepas de rizóbios sem atividade celulolítica, amilolítica e xilanolítica;
- c) Caracterizar a macromorfologia das actinobactérias quanto à cor dos micélios aéreo e reverso, forma da colônia e produção de pigmentos;
- d) Caracterizar a micromorfologia das actinobactérias quanto à forma das cadeias de esporos;
- e) Inferir o gênero das actinobactérias a partir da estrutura das hifas e dos esporos;
- f) Coinocular actinobactérias e rizóbios *in vitro*;
- g) Escolher as cepas de actinobactérias e rizóbios mais compatíveis, visando futuros testes *in vivo*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A fim de se atingir os objetivos estabelecidos, foram adotadas metodologias para obtenção das amostras, caracterização e coinoculação dos microrganismos e análise estatística. Essas estratégias são detalhadas nesta seção.

4.1 Escolha das cepas

Os microrganismos utilizados no presente trabalho foram obtidos da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMAB) da Universidade Federal do Ceará. Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa avaliaram a atividade amilolítica, celulolítica e xilanolítica das actinobactérias e dos rizóbios da coleção de culturas (resultados não publicados). Para escolha das cepas a serem utilizadas, os índices enzimáticos de 313 cepas dessa coleção de culturas foram submetidos a uma análise de normalidade e de variância ANOVA multivariada (MANOVA) com auxílio do software SPSS (IBM Corp. Released 2011). Para verificação das hipóteses dos testes estatísticos utilizados, os índices enzimáticos das actinobactérias foram submetidos ao teste de Qui-quadrado. A normalidade dos dados foi analisada pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. A homogeneidade das variâncias foi feita pelo teste de Levene. Para verificar se há diferença em relação aos modelos, os índices enzimáticos foram submetidos a um teste de T de Student para dados não pareados. A comparação das médias das enzimas de cada cepa foi feita por uma análise de variâncias por meio do teste de Tukey HSD. Todos os testes estatísticos foram realizados com significância de 0,05.

Para esse trabalho, foram escolhidas 10 cepas de actinobactérias com atividade enzimática estatisticamente distinta (A108, A109, A125, A136, A139, A143, A144, A145, A146, A148) a partir de um universo de 313 cepas, e 7 rizóbios sem atividade enzimática para as enzimas em questão (L1, L4, L9, L13, L15, L24, L27) a partir de um universo de 150 cepas. As referidas cepas de rizóbios foram previamente identificadas por sequenciamento da molécula 16s rRNA por Silva (2020) (Quadro 2).

QUADRO 2 – Cepas de rizóbios do Semiárido brasileiro pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMAB) e selecionadas para os testes de coinoculação.

| Cepa | Espécie |
|------|------------------------------------|
| L1 | <i>Bradyrhizobium elkanii</i> |
| L4 | <i>Bradyrhizobium elkanii</i> |
| L9 | <i>Rhizobium tropici</i> |
| L13 | <i>Bradyrhizobium kavangense</i> |
| L15 | <i>Bradyrhizobium japonicum</i> |
| L24 | <i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> |
| L27 | <i>Bradyrhizobium iriomotense</i> |

Fonte: Silva (2020).

As amostras de solo que originaram as actinobactérias utilizadas neste trabalho foram coletadas conforme projeto de pesquisa aceito pelo Edital CNPq/ICMBio/FAP's nº18/2017, processo 421350/2017.2¹. A108, A109 e A125 foram obtidas de solos de áreas preservadas da Estação Ecológica de Aiuaba - CE (A108 e A109 em 6° 07'S, 40° 2'W; A125 em 6° 75'S, 40° 2'W). A136 e A139 são provenientes de solos de áreas preservadas do Parque Nacional de Ubajara - CE (3° 5'S, 40° 5'W). A143, A144, A145 e A146 foram isoladas de solos de áreas preservadas do Parque Nacional de Sete Cidades - PI (8° 2'S, 42° 4'W). A148 foi obtida de solos de áreas secundárias também do Parque Nacional de Sete Cidades - PI (8° 2'S, 42° 4'W).

4.1.1 Repique das cepas escolhidas

As cepas escolhidas foram repicadas da coleção para uso. As cepas de actinobactérias foram inoculadas por esgotamento em meio CDA (caseína-dextrose-ágar) e em caldo CD (caseína-dextrose) e incubadas em estufa tipo B.O.D. a 28°C por 7 dias. As cepas de rizóbios foram inoculadas por esgotamento em meio YMA (extrato de levedura-manitol-ágar)

¹ Responsável pelo material biológico: MSc. Leonardo Lima Bandeira

e em caldo YM (extrato de levedura-manitol) e incubadas nas mesmas condições e tempo. A composição dos meios de cultura está descrita no Quadro 3.

QUADRO 3 – Detalhamento dos componentes e pH ideal dos meios de cultura utilizados na pesquisa

| Meio de cultura | Componentes | pH |
|-----------------|---|-----------|
| CDA | 0,5 g.L ⁻¹ de K ₂ HPO ₄ , 0,2 g.L ⁻¹ de MgSO ₄ , 2 g.L ⁻¹ de glucose, 0,01 g.L ⁻¹ de FeSO ₄ , 0,2 g.L ⁻¹ de caseína, 15 g.L ⁻¹ de ágar, 2 mL.L ⁻¹ de nistatina 100.000 UI.mL ⁻¹ | 6,6 |
| CD | 0,5 g.L ⁻¹ de K ₂ HPO ₄ , 0,2 g.L ⁻¹ de MgSO ₄ , 2 g.L ⁻¹ de glucose, 0,01 g.L ⁻¹ de FeSO ₄ , 0,2 g.L ⁻¹ de caseína | 6,6 |
| YMA | 10 g.L ⁻¹ de manitol, 0,5 g.L ⁻¹ de K ₂ HPO ₄ , 0,2 g.L ⁻¹ de MgSO ₄ , 0,1 g.L ⁻¹ de NaCl, 0,5 g.L ⁻¹ de extrato de levedura, 5 mL.L ⁻¹ de azul de bromotimol 0,5% em KOH 0,2N, 15g.L ⁻¹ de ágar, 2 mL.L ⁻¹ de nistatina 100.000 UI.mL ⁻¹ | 6,8 |
| YM | 10 g.L ⁻¹ de manitol, 0,5 g.L ⁻¹ de K ₂ HPO ₄ , 0,2 g.L ⁻¹ de MgSO ₄ , 0,1 g.L ⁻¹ de NaCl, 0,5 g.L ⁻¹ de extrato de levedura, 5 mL.L ⁻¹ de azul de bromotimol 0,5% em KOH 0,2N | 6,8 |
| CMC | 5 g.L ⁻¹ de carboximetilcelulose, 0,5 g.L ⁻¹ de MgSO ₄ , 0,5 g.L ⁻¹ de KCl, 3 g.L ⁻¹ de NaNO ₃ , 0,01 g.L ⁻¹ de FeSO ₄ , 1 g.L ⁻¹ de K ₂ HPO ₄ , 15 g.L ⁻¹ de ágar, 2 mL.L ⁻¹ de nistatina 100.000 UI.mL ⁻¹ | 6 |
| AM | 10 g.L ⁻¹ de peptona, 3 g.L ⁻¹ de extrato de carne, 5 g.L ⁻¹ de NaCl, 2 g.L ⁻¹ de amido, 15 g.L ⁻¹ de ágar. 2 mL.L ⁻¹ de nistatina 100.000 UI.mL ⁻¹ | 6,8 ± 0,3 |
| XY | 1 g.L ⁻¹ de xilano obtido de madeira, 0,5 g.L ⁻¹ de MgSO ₄ , 1 g.L ⁻¹ de extrato de levedura, 0,5 g.L ⁻¹ de NaNO ₃ , 0,01 g.L ⁻¹ de FeSO ₄ , 1 g.L ⁻¹ de K ₂ HPO ₄ , 15 g.L ⁻¹ de ágar, 2 mL.L ⁻¹ de nistatina 100.000 UI.mL ⁻¹ | 6,5 |
| ISP 2 | 4 g.L ⁻¹ de extrato de levedura, 10 g.L ⁻¹ de extrato de malte, 4 g.L ⁻¹ de dextrose, 20 g.L ⁻¹ de ágar, 2 mL.L ⁻¹ de nistatina 100.000 UI.mL ⁻¹ | 7,0 ± 0,2 |

Fonte: o autor

4.2 Caracterização das cepas

As cepas de actinobactérias foram caracterizadas quanto à natureza de sua parede celular pela Coloração de Gram. Foi feita também uma caracterização macro e micromorfológica, cujos protocolos estão detalhados a seguir.

4.2.1 Coloração de Gram

A fim de se observar a morfologia filamentosa, assim como avaliar a pureza dos inóculos e de se obter uma confirmação preliminar se, de fato, a bactéria é uma actinobactéria, foi realizada uma Coloração de Gram (Êxodo Científica[®], Sumaré-SP) seguindo as instruções do fabricante. Com o auxílio de uma alça de inoculação estéril, foi feito um esfregaço em solução salina de uma colônia isolada previamente cultivada em meio CDA. Esse esfregaço foi submetido a 1 minuto em violeta genciana, 1 minuto em lugol, lavado com álcool acetona e então 30 segundos em fucsina de Gram. Por fim, a lâmina foi observada por meio de um microscópio óptico Leica[®] DM750 com aumento de 1000x.

4.2.2 Caracterização cultural macromorfológica

As cepas passaram por uma caracterização cultural de sua macromorfologia. Foi realizada a inoculação por *spots* das cepas de actinobactérias em meio CDA (Quadro 3), a partir da qual foram observadas as cores do micélio aéreo e reverso das colônias (que foram então classificadas de acordo com a tabela de cores RAL) (SANTOS *et al.*, 2019a), o aspecto das colônias (SILVA *et al.*, 2019b), e a produção de pigmentos difusíveis (RAMOS *et al.*, 2015).

4.2.3 Caracterização micromorfológica

Para identificação da morfologia das cadeias de esporos das actinobactérias, foi realizada uma caracterização micromorfológica (microcultivo) segundo Santos *et al.* (2019b) com modificações. Um cubo de meio CDA com aproximadamente 1 cm de lado foi transferido para uma lâmina abrigada dentro de uma placa de Petri estéril. As cepas foram inoculadas nas laterais desse cubo, que foi então coberto por uma lamínula. A fim de se preservar a umidade no interior da placa, foram colocados dois pedaços de algodão umedecidos com água destilada estéril. As placas foram incubadas em estufa tipo B.O.D. a 28°C por 10 dias, então as lamínulas

contendo a impressão digital das hifas foram transferidas para uma nova lâmina estéril e corada com lactofenol de Amann (Êxodo Científica[®], Sumaré-SP). As cadeias de esporos foram observadas por meio de um microscópio óptico Leica[®] DM750 com aumento de 1000x e comparadas com as estruturas descritas por Dornelas *et al.* (2017) para identificação da microestrutura. O gênero das actinobactérias foi inferido de acordo com The Society For Actinomycetes Japan (1997).

4.3 Facilitação *in vitro*

Foi realizada uma coinoculação *in vitro* para investigar a capacidade de cooperação metabólica (facilitação) entre as cepas de actinobactérias e rizóbios de acordo com a metodologia de Silva *et al.* (2019a) modificada por Mesquita *et al.* (2022). Para isso foram utilizados três meios de cultura, cada um contendo uma única fonte de carbono: carboximetilcelulose (CMC), amido (AM) e xilana (XY) conforme Quadro 3. Primeiramente, as actinobactérias foram inoculadas por *spot* em duplicata nos meios de cultura mencionados, e incubadas por 7 dias em estufa do tipo B.O.D. a 28°C. Ao fim dos 7 dias, as placas foram avaliadas para observar a presença de contaminação e de crescimento adequado. As placas contaminadas ou sem crescimento foram descartadas e repetidas.

Os rizóbios foram então purificados para inoculação. Foi transferido 1 mL de cada rizóbio em caldo YM (Quadro 3) para um microtubo estéril e centrifugado em centrífuga Marconi MA 1800 a 9261 x g (10500 RPM) por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensado em 1 mL de água destilada e homogeneizado em agitador tipo vórtex modelo Phoenix AP56. Esse processo foi repetido duas vezes, em triplicata, até a obtenção dos rizóbios purificados suspensos em água destilada.

Imediatamente após a purificação dos rizóbios foi feita a coinoculação propriamente dita, onde 10 µL dos rizóbios purificados foram inoculados próximo aos *spots* das actinobactérias. O crescimento foi reavaliado após mais 7 dias de incubação em estufa tipo B.O.D. a 28°C. O crescimento das colônias de rizóbio caracterizou resultado positivo.

O índice de compatibilidade (IC) foi calculado a partir da razão entre o número de pares compatíveis e o número de pares possíveis. ICA seria o índice das actinobactérias, e ICR, dos rizóbios. O índice de antagonismo (IA) foi calculado a partir da razão entre o número de pares antagônicos e o número de pares possíveis. IAA seria o índice das actinobactérias, e IAR, dos rizóbios.

4.4 Seleção das cepas mais promissoras

A partir dos índices de compatibilidade e de antagonismo (IC e IA, respectivamente), foram feitos testes estatísticos com auxílio do software SPSS (IBM Corp. Released 2011) para determinação das cepas mais promissoras para futuros ensaios *in vivo*. Para verificação das hipóteses dos testes estatísticos utilizados, IC e IA foram analisados por um teste de Qui-quadrado utilizando uma matriz binária, e depois por um teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes. Foi feito um teste de k-médias de IC e IA a partir do qual os dados foram divididos em 3 *clusters*, sendo então plotado um dendrograma. As duas actinobactérias com maior semelhança entre si e o maior índice de IC foram escolhidas para os futuros ensaios *in vivo*. Todos os testes estatísticos foram realizados com significância de 0,05.

4.5 Microscopia eletrônica de varredura

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada a fim de se observar com mais detalhes a microestrutura das hifas e dos esporos. Apenas as cepas com maior potencial para testes *in vivo* foram observadas por MEV. As amostras foram preparadas segundo a metodologia de Balagurunathan *et al.* (2020). *Stubs* de alumínio estéreis foram inseridos em um ângulo de aproximadamente 45° em uma placa com meio sólido ISP 2 (Quadro 3) até aproximadamente metade do *stub* ficar dentro do meio. O mesmo procedimento foi feito com lamínulas de vidro. As placas foram então incubadas por 24h em estufa tipo B.O.D. a 37°C para checar a presença de contaminação. Após esse tempo, as actinobactérias foram inoculadas com uma alça estéril ao longo da linha onde o *stub* e as lamínulas encontram o meio. As placas foram então incubadas por cerca de 10 dias a 28°C em estufa tipo B.O.D.

As lamínulas foram preparadas para visualização via microscopia óptica seguindo a mesma metodologia do microcultivo. Esse passo serve para se observar a maturidade dos esporos, que devem estar completamente desenvolvidos para ser feita a MEV. Quando os esporos atingiram um nível satisfatório de maturidade, os *stubs* foram removidos cuidadosamente do meio e enviados para a Central Analítica da Universidade Federal do Ceará, pois fazem parte do projeto aprovado “Morfologia de cepas de actinobactérias oriundas do semiárido nordestino”. Na Central Analítica foi feita a fixação e metalização das amostras, assim como a microscopia eletrônica propriamente dita em equipamento modelo QUANTA™ 450 FEG nas ampliações de 5.000, 10.000 e 70.000 vezes.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos por meio desta pesquisa são apresentados e discutidos nesta seção, ressaltando o potencial da coinoculação de actinobactérias e rizóbios como bioinoculantes.

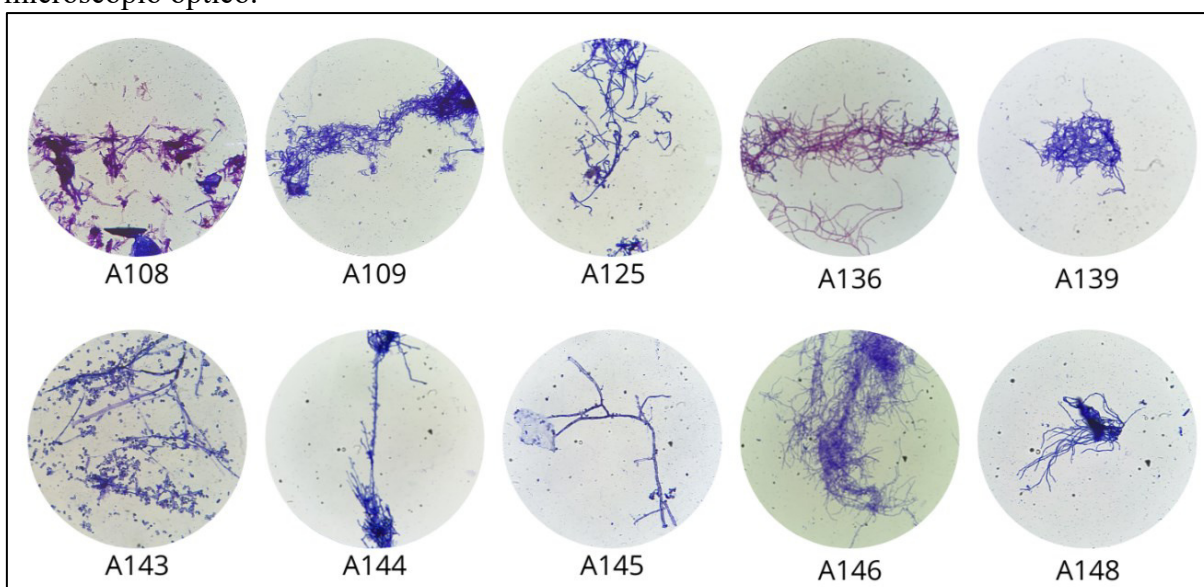
5.1 Caracterização das cepas

As cepas utilizadas neste trabalho foram caracterizadas quanto a sua macro e micromorfologia, assim como foi realizada uma coloração de Gram para análise da pureza dos inóculos. Os resultados obtidos são apresentados neste item.

5.1.1 Coloração de Gram

Actinobactérias apresentam uma relevante diferenciação morfológica entre as outras bactérias dessa classe, mas as mais comuns são as filamentosas (HAZARIKA; THAKUR, 2020). A maior parte das actinobactérias possui uma membrana celular com uma grossa camada de peptidoglicano, o que as caracteriza como Gram-positivas (RAHLWES *et al.*, 2019). Todas as cepas mantiveram a cor do cristal violeta (Figura 1), confirmando que os inóculos estão puros e que as bactérias são de fato Gram-positivas.

FIGURA 1 – Coloração de Gram das cepas de actinobactérias sob ampliação de 1000x em microscópio óptico.



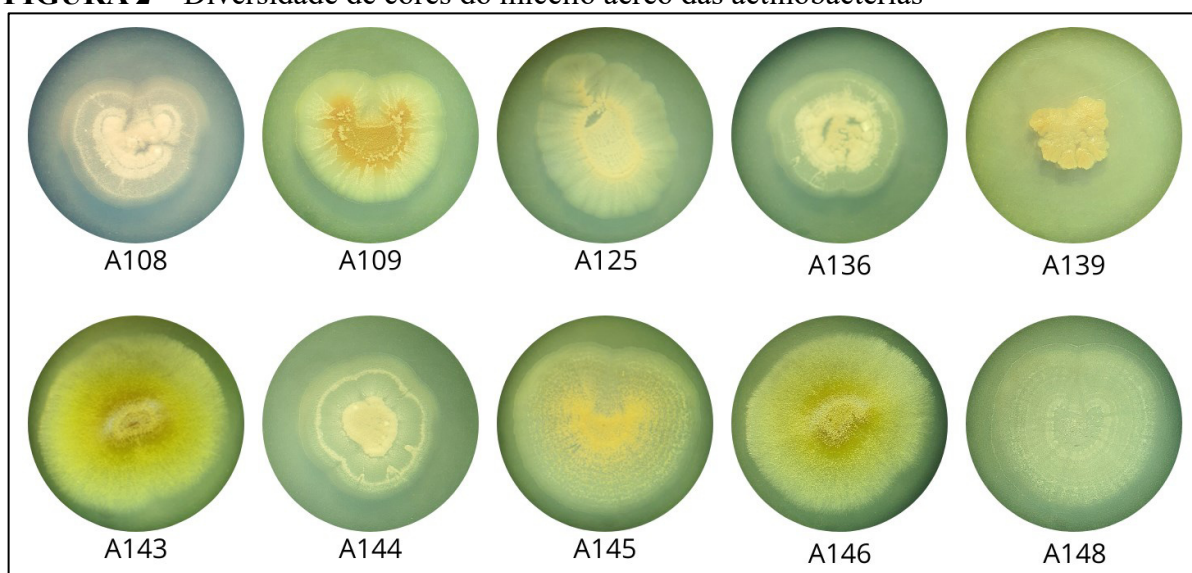
Fonte: o autor.

O método da Coloração de Gram foi desenvolvido em 1884 por Hans Christian Gram e inovou o ramo da microbiologia pela possibilidade de se observar bactérias coradas via microscopia óptica (GRAM, 1884). Nesse método, que diferencia as bactérias quanto à sua parede celular, as bactérias Gram-positivas apresentam-se roxas, enquanto as Gram-negativas costumam variar entre rosa e avermelhado (ROHDE, 2019). Até hoje, quase 140 anos depois do desenvolvimento da técnica, a coloração de Gram ainda é considerada o padrão de ouro para a classificação de bactérias quanto às propriedades físicas da parede celular (KWON *et al.*, 2019).

5.1.2 Caracterização cultural macromorfológica

Devido à diversidade entre as cores na mesma colônia (Figura 2), as cepas foram caracterizadas quanto às cores das bordas e das extremidades de cada colônia. Os resultados encontram-se sumarizados na Tabela 1. Quanto à produção de pigmentos difusíveis no meio, nenhuma das cepas apresentou essa capacidade quando cultivadas no meio CDA. O Gráfico 1 resume os resultados obtidos em relação ao aspecto das colônias.

FIGURA 2 – Diversidade de cores do micélio aéreo das actinobactérias

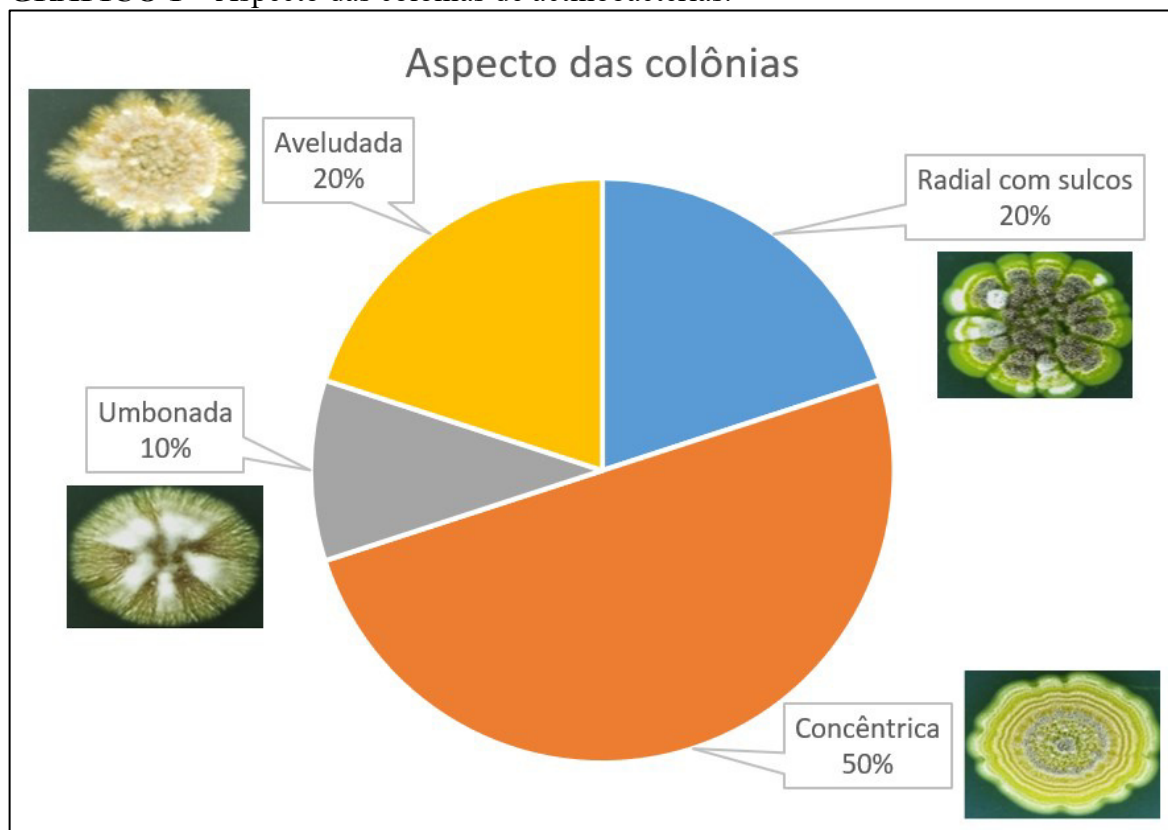


Fonte: o autor.

TABELA 1 – Características culturais macromorfológicas das cepas de actinobactérias

| Cepas | Micélio Aéreo | | Micélio reverso | | Aspecto da colônia |
|-------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------|
| | Centro | Borda | Centro | Borda | |
| A108 | RAL 9003 Signal white | RAL 7044 Silk grey | RAL 9010 Pure white | RAL 9018 Papyrus white | Concêntrica |
| A109 | RAL 8001 Ochre brown | RAL 9003 Signal white | RAL 8023 Orange brown | RAL 9003 Signal white | Radial com sulcos |
| A125 | RAL 9001 Cream | RAL 9003 Signal white | RAL 1002 Sand yellow | RAL 9003 Signal white | Radial com sulcos |
| A136 | RAL 1002 Sand yellow | RAL 1000 Green beige | RAL 9010 Pure white | RAL 9003 Signal white | Concêntrica |
| A139 | RAL 3012 Beige red | | RAL 3022 Salmon pink | | Umbonada |
| A143 | RAL 8001 Ochre brown | RAL 9010 Pure white | RAL 8029 Pearl copper | RAL 9003 Signal white | Aveludada |
| A144 | RAL 7044 Silk grey | RAL 9002 Grey white | RAL 1002 Sand yellow | RAL 7038 Agate grey | Concêntrica |
| A145 | RAL 1034 Pastel yellow | RAL 1013 Oyster white | RAL 7044 Silk grey | RAL 7035 Light grey | Concêntrica |
| A146 | RAL 8001 Ochre brown | RAL 9010 Pure white | RAL 8029 Pearl copper | RAL 9003 Signal white | Aveludada |
| A148 | RAL 9002 Grey white | | RAL 7047 Telegrey 4 | | Concêntrica |

Fonte: o autor.

GRÁFICO 1 – Aspecto das colônias de actinobactérias.

Fonte: SILVA *et al.*, 2019b; o autor.

Actinobactérias são capazes de produzir pigmentos extra e intracelulares (por exemplo, no micélio e esporos). Quando cultivados pelo tempo necessário, esses microrganismos formam colônias com micélios aéreo e reverso que podem apresentar cores variadas (AXENOV-GIBANOV *et al.*, 2016). Essas características, contudo, não dependem apenas do potencial genético de cada cepa, mas são diretamente influenciados pelas condições de incubação e composição nutricional do meio de cultura na qual estão crescendo. O meio de cultura ISP2 é o mais utilizado para caracterização cultural de actinobactérias (BEHIE *et al.*, 2017). Apesar disso, a caracterização foi realizada no meio CDA, que pelos resultados obtidos por nosso grupo de pesquisa é mais adequado para o crescimento de actinobactérias do Semiárido brasileiro.

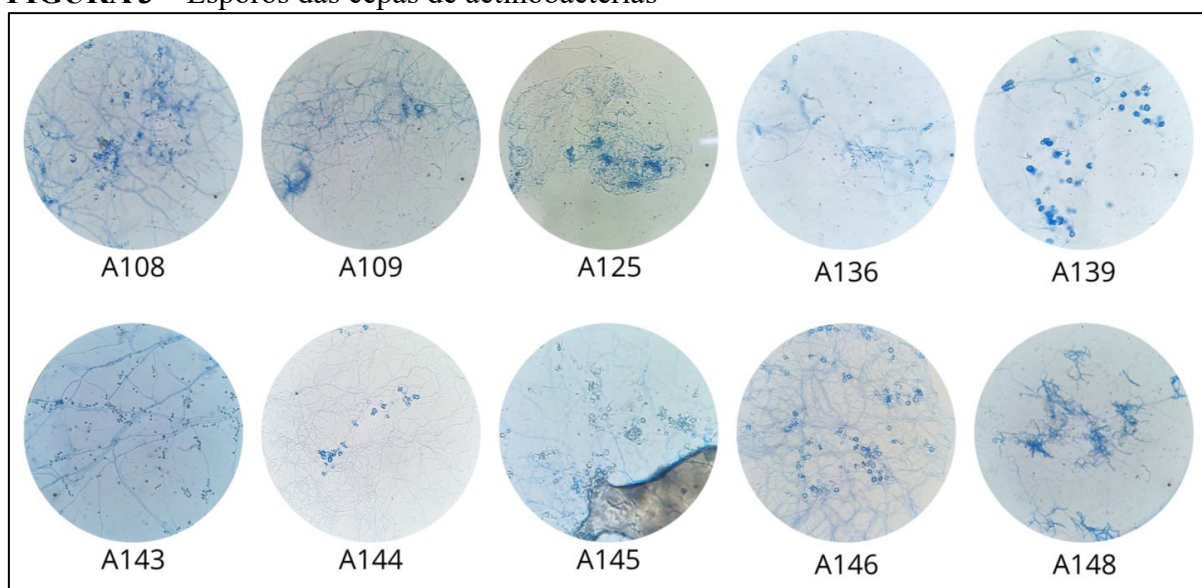
Os pigmentos produzidos por actinobactérias podem ser hidrossolúveis ou lipossolúveis. Os hidrossolúveis colorem o meio com sua respectiva cor, enquanto os lipossolúveis tingem a colônia em si com sua cor. Além disso, a cor desses pigmentos pode variar entre branco, marrom, preto, vermelho, amarelo e laranja (HAZARIKA; THAKUR, 2020). A partir disso, é possível afirmar que as cepas utilizadas são capazes de produzir uma diversidade de pigmentos lipossolúveis quando cultivadas em meio CDA, com suas cores

predominantemente brancas, marrons e amarelas condizendo com o descrito na literatura. A presença de pigmentos cinza podem ser características de actinobactérias isoladas do Semiárido, como as cepas caracterizadas por Medeiros *et al.* (2018), Lima *et al.* (2017) e Ramos *et al.* (2015).

5.1.3 Caracterização micromorfológica

Uma das principais características utilizadas para se estudar a taxonomia de actinobactérias a nível de gênero e espécie é sua micromorfologia. Em relação aos esporos, esses podem ser formados tanto no micélio aéreo quanto no reverso, em células únicas (*Micromonospora*) ou grandes cadeias que podem ter centenas de esporos (*Streptomyces*). Alguns gêneros podem formar vesículas especializadas (esporângios), que são basicamente bolsas de esporos (*Frankia*) (BARKA *et al.*, 2015). A Figura 3 sumariza as estruturas observadas no microcultivo, que são majoritariamente as cadeias de esporos.

FIGURA 3 – Esporos das cepas de actinobactérias



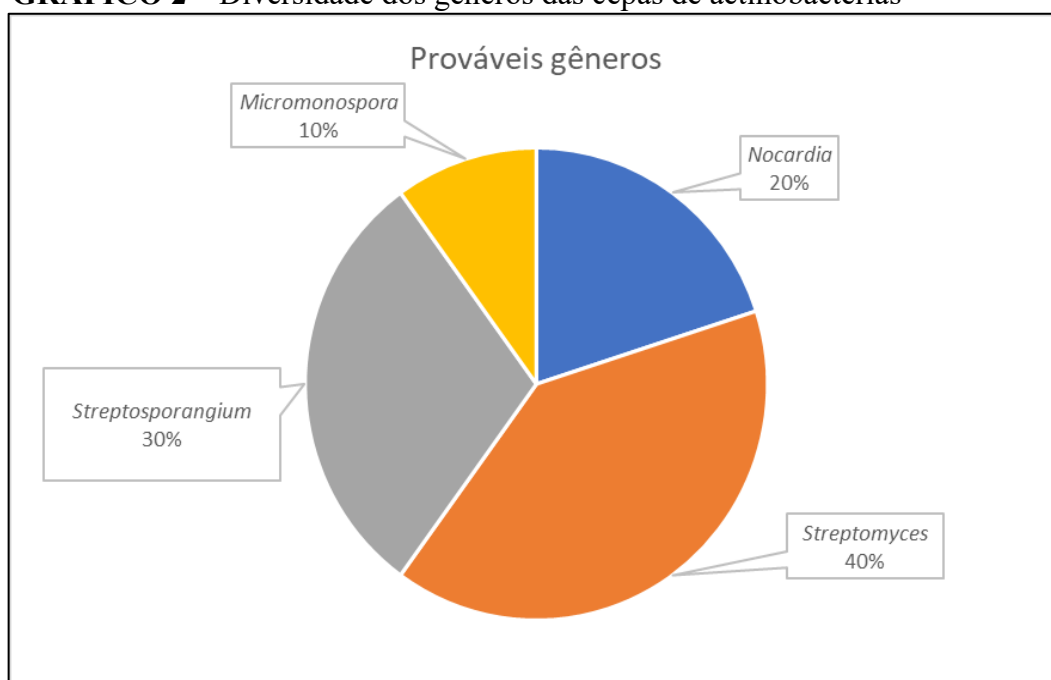
Fonte: o autor.

A partir dessas estruturas, foram determinados o tipo das cadeias de esporos e o gênero de cada cepa foi inferido (Tabela 2). A diversidade dos tipos de cadeias de esporos e dos gêneros está representada visualmente nos Gráficos 2 e 3, respectivamente.

TABELA 2 – Caracterização micromorfológica das cepas de actinobactérias

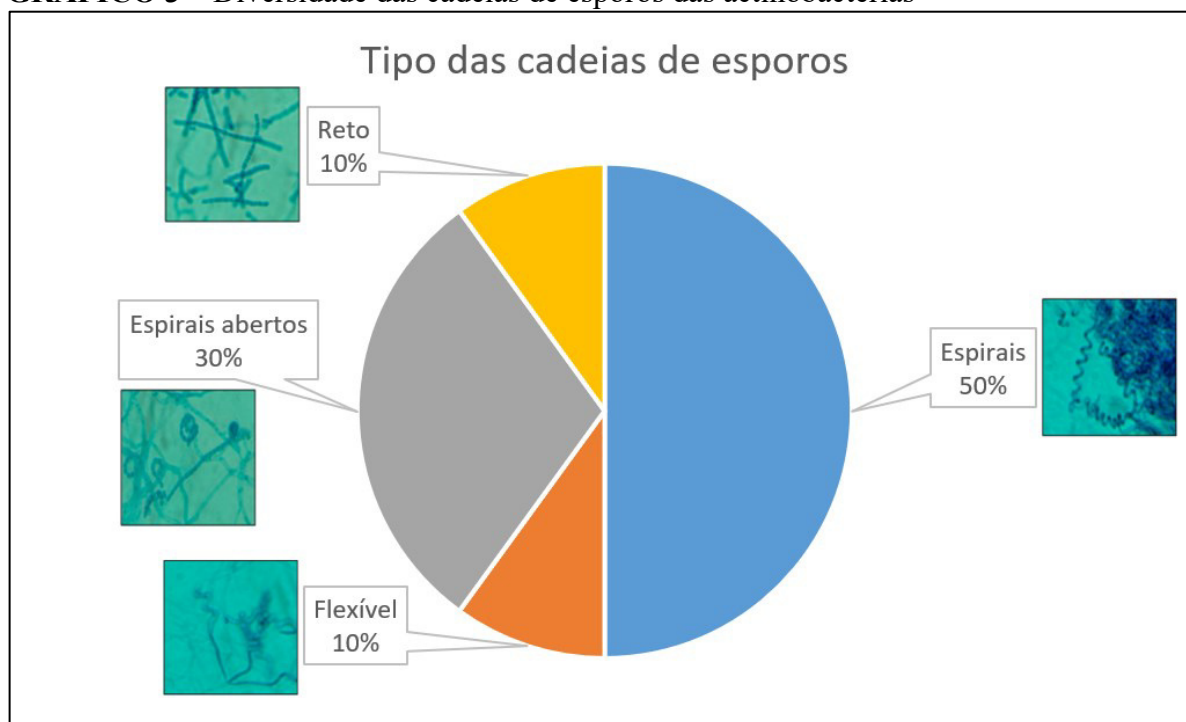
| Cepas | Tipo das cadeias de esporos | Provável gênero |
|-------|-----------------------------|--------------------------|
| A108 | Espirais | <i>Streptomyces</i> |
| A109 | Flexível | <i>Nocardia</i> |
| A125 | Espirais abertos | <i>Nocardia</i> |
| A136 | Espirais | <i>Streptomyces</i> |
| A139 | Espirais | <i>Streptosporangium</i> |
| A143 | Reto | <i>Micromonospora</i> |
| A144 | Espirais | <i>Streptosporangium</i> |
| A145 | Espirais abertos | <i>Streptomyces</i> |
| A146 | Espirais | <i>Streptosporangium</i> |
| A148 | Espirais abertos | <i>Streptomyces</i> |

Fonte: o autor.

GRÁFICO 2 – Diversidade dos gêneros das cepas de actinobactérias

Fonte: o autor.

GRÁFICO 3 – Diversidade das cadeias de esporos das actinobactérias



Fonte: DORNELAS *et al.* (2017); o autor.

As cadeias de esporos podem ser divididas morfológicamente quanto à quantidade de esporos: bisporos para dois esporos, oligósporos com poucos esporos e polísporos com vários esporos. Os grupos que produzem apenas um esporo por “cadeia” são chamados de monósporos e seus principais representantes são os gêneros *Micromonospora* (como na cepa A143), *Thermomonospora*, *Saccharomonospora* e *Thermoactinomyces* (LI *et al.*, 2016).

A presença de esporângios foi observada nas cepas A144 e A146, sendo classificadas como *Streptosporangium*. Essas estruturas são responsáveis por desenvolver e liberar os esporos e variam muito quanto a sua forma e tamanho, podendo ser formadas tanto no micélio aéreo quanto no reverso. Os esporângios de *Streptosporangium* costumam ser esféricos com uma cadeia de esporos espiralada e sem ramificações, e assim como na maioria das actinobactérias formadoras de esporângio, planósporos, apesar de existirem exceções (HAMEDI; POORINMOHAMMAD, 2017; KURTBÖKE *et al.*, 2020).

A morfologia típica do gênero *Nocardia* consiste em células filamentosas e ramificadas. Muitas vezes, apenas células semelhantes a “contas”, ou “miçangas”, são visíveis, com essas estruturas organizadas ao longo de filamentos ramificados (BROWN-ELLIOT *et al.*, 2015). Essas características foram observadas no microcultivo das cepas A109 e A125, permitindo classifica-las como pertencentes ao gênero *Nocardia*.

O gênero *Streptomyces* é conhecido por seu ciclo de vida complexo, desde a germinação dos esporos até a formação dos micélios vegetativo e aéreo, e as novas cadeias de esporos (esporulação) (PACIOS-MICHELENA *et al.*, 2021). Actinobactérias desse gênero apresentam polísporos (artrósporos) que formam longas cadeias que ultrapassam os 50 esporos. Esses esporos são formados pela septação e desarticulação de hifas pré-existentes. (LI *et al.*, 2016). Segundo Zhuang *et al.* (2020), uma característica clássica de bactérias do gênero *Streptomyces* são as cadeias de esporos em espiral, como foi observado no microcultivo das cepas A108, A136, A139, A145 e A148.

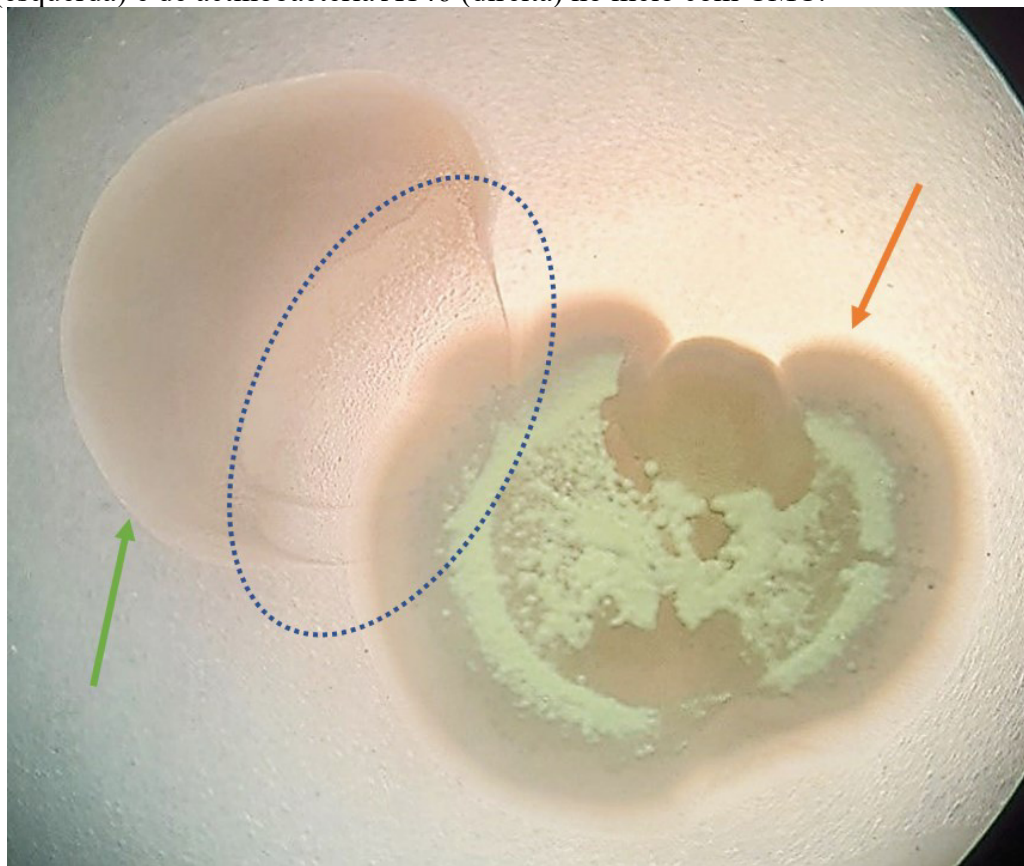
Das 53 actinobactérias que Parihar *et al.* (2022) isolaram do deserto de Thar, na Índia, 34 (64%) são *Streptomyces*. Outros estudos envolvendo caracterização micromorfológica de actinobactérias de solos do Semiárido nordestino observaram abundâncias diferentes das observadas no presente estudo. Santos *et al.* (2019b), por exemplo, encontraram 37% de abundância de *Streptomyces* e 13% de *Nocardia* em áreas abertas, e 75% de *Streptomyces* e 25% de *Nocardia* em áreas fechadas na microrregião do Médio Jaguaribe. Das 14 cepas de actinobactérias que Lima *et al.* (2017) isolaram da Estação Ecológica de Aiuaba, 13 pertenciam ao gênero *Streptomyces* e uma ao gênero *Saccharothryx*. Apesar de se observarem outros gêneros, é evidente que *Streptomyces* é o gênero de actinobactérias dominante em solos Semiáridos (HAMID *et al.*, 2020).

Este estudo obteve 50% de *Streptomyces*, 20% de *Streptosporangium*, 20% de *Nocardia* e 10% de *Micromonospora*. Isso se dá principalmente pelo tamanho extremamente reduzido do espaço amostral utilizado aqui. Não é possível se estudar diversidade microbiana com precisão com apenas 10 cepas, e esse não é o foco desse estudo. A caracterização micromorfológica foi realizada apenas para se observar mais características das cepas e inferir os seus gêneros de acordo com a estrutura de seus esporos.

5.2 Facilitação *in vitro*

Alguns pares, como a actinobactéria A146 e rizóbio L4 no meio com CMC (Figura 4) apresentaram resultado semelhante a uma relação antagônica, onde a actinobactéria produziu um halo de inibição do crescimento do rizóbio. Esses resultados foram tabulados como negativos.

FIGURA 4 – Exemplo de interação antagonica entre as cepas de rizóbio L4 (esquerda) e de actinobactéria A146 (direita) no meio com CMC.



A seta verde, à esquerda, indica o crescimento do rizóbio. A seta laranja, à direita, indica o crescimento da actinobactéria. O tracejado azul destaca o halo de inibição do crescimento do rizóbio produzido pela actinobactéria.

Fonte: o autor.

Na natureza, bactérias costumam competir por inúmeros fatores limitantes como habitats mais favoráveis, minerais e nutrientes diversos. Por isso, esses microrganismos desenvolveram inúmeras estratégias para permitir o crescimento e a reprodução sob essas condições, como secreção de toxinas e de antibióticos, que conferem uma vantagem para o crescimento da bactéria que as produziu (D'SOUZA *et al.*, 2018). De forma geral, essas relações antagonicas costumam se sobrepôr a relações neutras, que por sua vez se sobrepõem a relações positivas como o *cross-feeding* (LITTLE *et al.*, 2008).

Segundo Klein *et al.* (2020), um dos modos de ação do antagonismo interbacteriano trata da secreção de pequenas moléculas difusíveis (metabólitos secundários antibacterianos) e de toxinas proteicas antibacterianas (peptídeos antimicrobianos). As actinobactérias A136, A139, A145, A148 (*Streptomyces* sp.), A146 (*Streptosporangium* sp.), e A143 (*Micromonospora* sp.) apresentaram antagonismo com pelo menos um dos rizóbios testados.

Os compostos extraídos de actinobactérias são responsáveis pela produção de 90% dos antibióticos de uso comercial conhecidos. O gênero *Streptomyces*, além de ser o maior

gênero de actinobactérias, é também o mais famoso produtor de compostos com atividade antibiótica. (DAS *et al.*, 2018; NOFIANI; RIZKY; BRILLIANTORO, 2021). Entretanto, actinobactérias raras como aquelas dos gêneros *Micromonospora* (GEORGE *et al.*, 2012) e *Streptosporangium* (VERMA *et al.*, 2008) também apresentam atividade antibacteriana, o que condiz com os resultados obtidos neste trabalho.

A Figura 5 mostra a interação positiva entre a cepa de actinobactéria A143 com o rizóbio L27 no meio com xilana, enquanto a Figura 6 exibe um resultado negativo entre cepa de actinobactéria A145 com rizóbio L27 no meio com amido.

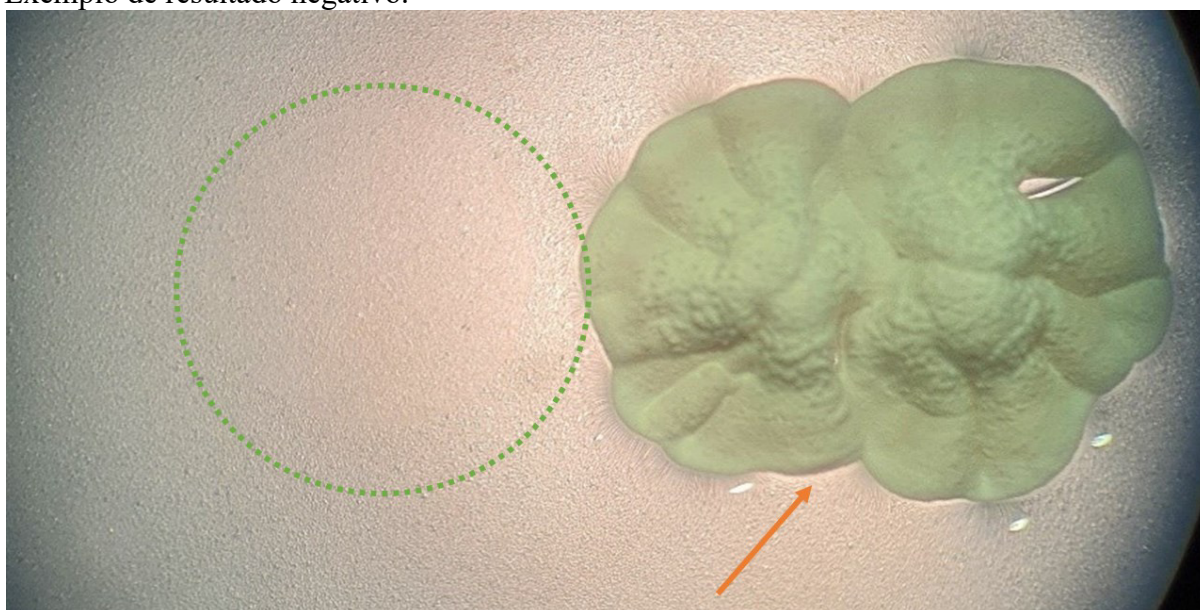
FIGURA 5 – Interação positiva entre as cepas de rizóbio L27 (esquerda) e de actinobactéria A143 (direita) no meio com xilana. Exemplo de resultado positivo.



A seta verde, à esquerda, indica o crescimento do rizóbio. A seta laranja, à direita, indica o crescimento da actinobactéria.

Fonte: o autor.

FIGURA 6 – Ausência de interação entre as cepas de rizóbio L27 (inoculado no lado esquerdo da imagem, onde não há crescimento) e de actinobactéria A145 (direita) no meio com amido. Exemplo de resultado negativo.



O tracejado verde, à esquerda, indica onde o rizóbio foi inoculado, destacando a ausência de crescimento. A seta laranja, à direita, indica o crescimento da actinobactéria. Fonte: o autor.

No meio com CMC, A144 e A148 apresentaram resultado positivo com todos os rizóbios testados (ICA = 1). A108, A139 e A145 apresentaram ICA de 0,857, apresentando resultado positivo com 6 das 7 cepas de rizóbios testados. A cepa L1 apresentou crescimento com 9 dentre as 10 actinobactérias testadas (ICR = 0,9) (Tabela 3).

TABELA 3 - Facilitação *in vitro* entre cepas de actinobactérias e rizóbios do Semiárido brasileiro no meio com CMC.

| Rizóbio | Actinobactéria | | | | | | | | | | ICR | IAR |
|---------|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|------|-----|-----|
| | A108 | A109 | A125 | A136 | A139 | A143 | A144 | A145 | A146 | A148 | | |
| L1 | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | 0,9 | 0 |
| L4 | + | - | + | A | + | + | + | + | A | + | 0,7 | 0,2 |
| L9 | - | - | - | - | A | - | + | A | - | + | 0,2 | 0,2 |
| L13 | + | - | - | - | + | - | + | + | - | + | 0,5 | 0 |
| L15 | + | + | + | A | + | - | + | + | A | + | 0,7 | 0,2 |
| L24 | + | - | - | + | + | - | + | + | + | + | 0,7 | 0 |
| L27 | + | - | - | + | + | + | + | + | + | + | 0,8 | 0 |
| ICA | 0,857 | 0,286 | 0,429 | 0,429 | 0,857 | 0,429 | 1 | 0,857 | 0,286 | 1 | | |
| IAA | 0 | 0 | 0 | 0,286 | 0,143 | 0 | 0 | 0,143 | 0,286 | 0 | | |

(+) presença de facilitação (resultado positivo). (-) ausência de facilitação (resultado negativo). (A) interação antagonista, considerada também resultado negativo.

Fonte: o autor.

No meio com xilana, A109, A139 e A145 apresentaram resultado positivo com todos os rizóbios testados (ICA = 1). As cepas A125 e A143 apresentaram ICA de 0,857, apresentando resultado positivo com 6 das 7 cepas de rizóbio. A cepa de rizóbio L4 apresentou crescimento com 9 dentre as 10 actinobactérias testadas (ICR = 0,9) (Tabela 4).

TABELA 4 - Facilitação *in vitro* entre cepas de actinobactérias e rizóbios do Semiárido brasileiro no meio com xilana.

| Rizóbio | Actinobactéria | | | | | | | | | | ICR | IAR |
|---------|----------------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|-----|-----|
| | A108 | A109 | A125 | A136 | A139 | A143 | A144 | A145 | A146 | A148 | | |
| L1 | + | + | + | A | + | + | + | + | A | + | 0,8 | 0,2 |
| L4 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | A | 0,9 | 0,1 |
| L9 | - | + | - | - | + | + | + | + | - | - | 0,5 | 0 |
| L13 | - | + | + | A | + | A | + | + | A | - | 0,5 | 0,3 |
| L15 | - | + | + | A | + | + | - | + | A | A | 0,5 | 0,3 |
| L24 | + | + | + | + | + | + | - | + | A | + | 0,8 | 0,1 |
| L27 | + | + | + | + | + | + | - | + | A | A | 0,7 | 0,2 |
| ICA | 0,571 | 1 | 0,857 | 0,429 | 1 | 0,857 | 0,571 | 1 | 0,143 | 0,286 | | |
| IAA | 0 | 0 | 0 | 0,429 | 0 | 0,149 | 0 | 0 | 0,714 | 0,429 | | |

(+) presença de facilitação (resultado positivo). (-) ausência de facilitação (resultado negativo). (A) interação antagonista, considerada também resultado negativo.

Fonte: o autor.

O meio com amido se mostrou um ambiente menos favorável para o crescimento dos rizóbios, uma vez que apenas nove resultados dentre os setenta possíveis foram positivos, com destaque para a actinobactéria A148, com 3 resultados positivos (ICA = 0,429) e o rizóbio L1, com 4 resultados positivos (ICR = 0,4) (Tabela 5).

TABELA 5 - Facilitação *in vitro* entre cepas de actinobactérias e rizóbios do Semiárido brasileiro no meio com amido.

| Rizóbio | Actinobactéria | | | | | | | | | | ICR | IAR |
|---------|----------------|------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-----|-----|
| | A108 | A109 | A125 | A136 | A139 | A143 | A144 | A145 | A146 | A148 | | |
| L1 | - | - | - | - | - | + | - | + | + | + | 0,4 | 0 |
| L4 | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | 0,2 | 0 |
| L9 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 | 0 |
| L13 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 | 0 |
| L15 | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | 0,1 | 0 |
| L24 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 | 0 |
| L27 | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + | 0,2 | 0 |
| ICA | 0 | 0 | 0,143 | 0 | 0,286 | 0,143 | 0 | 0,143 | 0,143 | 0,429 | | |
| IAA | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |

(+) presença de facilitação (resultado positivo). (-) ausência de facilitação (resultado negativo).

Fonte: o autor.

A SNF é um processo energeticamente oneroso, e depende de resíduos vegetais ricos em celulose para obter essa energia. Além disso, o rizóbio precisa romper a parede celular vegetal para conseguir colonizar a planta e nodular. Contudo, rizóbios, como os sete utilizados nesse estudo, não costumam apresentar uma elevada atividade celulolítica e não utilizam celulose como fonte de carbono (SILVA *et al.*, 2019a). Dada a composição mista da lignocelulose, maior constituinte das paredes celulares vegetais, que é rica em celulose e hemicelulose (WU *et al.*, 2019), e a incapacidade destas bactérias de degradar esses carboidratos, se torna evidente que rizóbios necessitam de auxílio para colonizar as raízes. Nós propomos o uso de actinobactérias isoladas do mesmo local dos rizóbios para realizar essa pesquisa sobre *cross-feeding*, uma vez que estudos utilizando bactérias isoladas do mesmo ambiente têm uma maior semelhança com a comunidade natural, como ressaltado pelo trabalho de Stadie *et al.* (2013). Assim, essa escolha representa mais fielmente as interações que aconteceriam *in situ*.

Interações de cooperação metabólica entre diferentes filos bacterianos são onipresentes na natureza e desempenham papéis críticos na determinação da estrutura e função das comunidades microbianas (PONOMAROVA; PATIL, 2015). No entanto, apesar dos diversos trabalhos sobre a temática, as regras que regem o estabelecimento dessas interações ainda não são totalmente compreendidas.

Em seu trabalho sobre cooperação metabólica em espécies bacterianas, Giri *et al.* (2021) identificaram que a dissimilaridade metabólica entre o genótipo do doador e do receptor é o principal determinante para a estabelecimento dessas interações cruzadas entre duas cepas de bactéria, e que o crescimento do receptor depende da produção de aminoácidos pelo doador. A família *Rhizobiaceae*, que abriga os rizóbios, é constituída por bactérias Gram-negativas com formato de bastão. Sua principal característica é a formação de nódulos simbióticos com leguminosas, onde realizam a fixação biológica de nitrogênio (KUYKENDALL, 2015; WHEATLEY *et al.*, 2020). Já actinobactérias são microrganismos filamentosos, Gram-positivos, capazes de formar micélio aéreo e de substrato e de esporular (JOSE *et al.*, 2021). A diferenciação desse filo dos outros filos bacterianos é tão antiga que não é possível, atualmente, especificar seus grupos mais proximamente relacionados (GOBALAKRISHNAN, 2022). A presença de facilitação entre actinobactérias e rizóbios evidenciada por este trabalho corrobora com os resultados de Giri *et al.* (2021), dada a disparidade fisiológica, morfológica e filogenética entre esses organismos.

Enquanto essas inferências podem ser corroboradas pelo nosso trabalho, onde principalmente nas coculturas em meios com carboximetilcelulose e xilana apresentaram

resultados positivos para cooperação metabólica, os resultados em meio amido abrem margem para alguns questionamentos. O principal deles é tentar entender como em um meio tendo como fonte de carbono um homopolissacarídeo, de cadeia relativamente mais simples que a celulose e a xilana (ABE *et al.* 2022), foram observados resultados preponderantemente negativos para cooperação metabólica.

Neste sentido, a pesquisa de Zheng *et al.* (2021), que relaciona a presença e intensificação de fluorosurfactantes e amilase em bactérias do solo, traz conclusões pertinentes aos resultados de coinoculação em meio amido. Segundo os autores, a presença de α -amilase influencia fortemente as estratégias de adaptação do metabolismo das bactérias, além da produção de fatores de sinal metabólicos (como ácido acético), resultando em mudanças em propriedades físico-químicas como hidrofobicidade e carga superficial da superfície bacteriana e conseqüentemente na interação microbiana. Como todas as cepas de actinobactéria nesse estudo são produtoras de amilase e os rizóbios não, a produção dessa enzima pelas actinobactérias pode ter influenciado a produção de outros metabólitos que impediram o crescimento dos rizóbios. As exceções podem ser explicadas pela produção de metabólitos secundários da própria actinobactéria (BOUBEKRI *et al.*, 2022) ou pelo aparato bioquímico do rizóbio (FANG *et al.*, 2020).

Uma baixa proximidade filogenética entre dois grupos em cocultura, como actinobactérias e rizóbios utilizados neste trabalho, pressupõe uma menor probabilidade desses microrganismos apresentarem requisitos de crescimento sobrepostos. Conseqüentemente, o baixo parentesco entre doador e receptor diminui, mas não elimina, a extensão da competição por recursos entre as bactérias coinoculadas. Dessa forma, ocorre a facilitação do crescimento do grupo pretendido (MITRI; FOSTER, 2013).

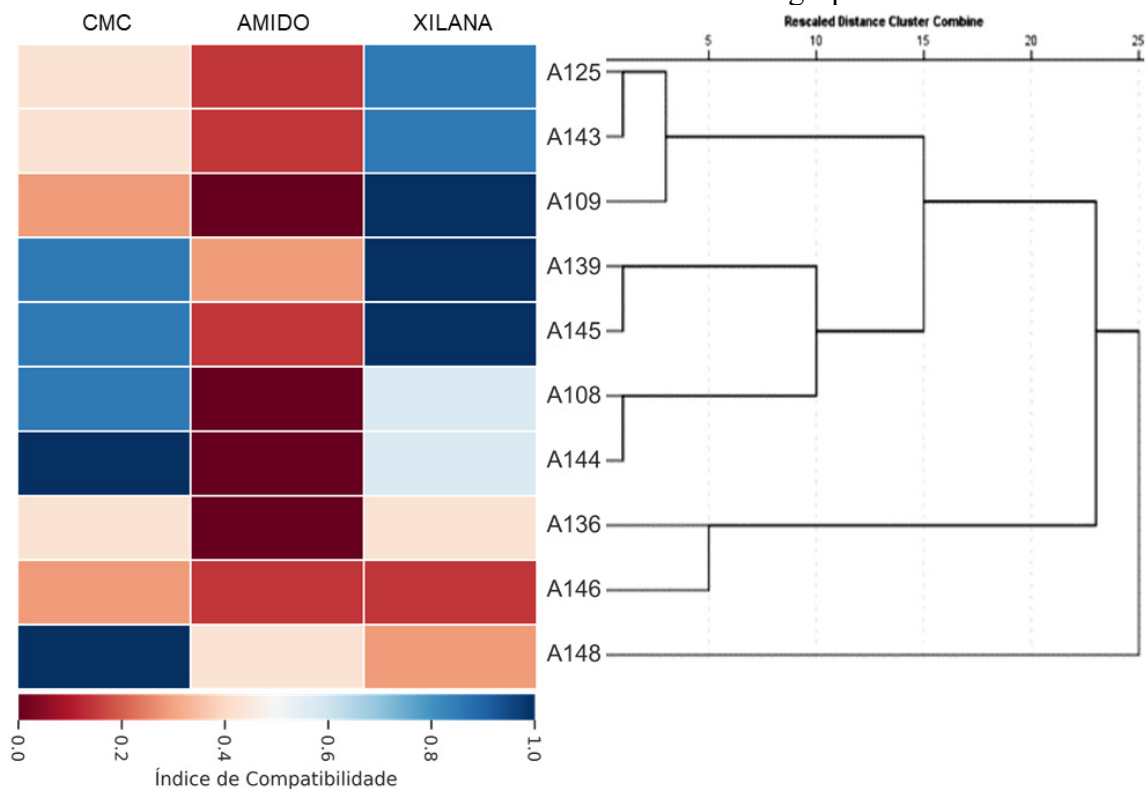
Uma forma de duas bactérias cooperarem é a síntese de *public goods*. Essas moléculas são metabólitos cuja síntese é muito dispendiosa para a célula, mas que são liberadas (ativa ou passivamente) no meio, a partir de onde outros microrganismos (“trapaceiros”) podem se aproveitar. Esses metabólitos variam desde sideróforos, biosurfactantes, toxinas, ou exoenzimas capazes de degradar polímeros em fragmentos menores absorvíveis por outras bactérias (SMITH; SCHUSTER, 2019; BRUCE; WEST; GRIFFIN, 2019). Ao recorrermos à classificação de Smith *et al.* (2019), esse último caso descreve perfeitamente um exemplo de *cross-feeding* de substrato, onde uma cepa se alimenta dos produtos metabólicos extracelulares de outra. O *cross-feeding* de substrato parece ser exatamente o que ocorreu em nosso trabalho. As exoenzimas, principalmente celulase e xilanase, que são *public goods* produzidas pelas actinobactérias, foram capazes de hidrolisar os respectivos substratos em açúcares mais simples

que serviram de fonte de carbono para o crescimento dos rizóbios. Contudo, segundo D'Souza *et al.* (2018), o compartilhamento de *public goods* ocorre principalmente entre indivíduos genealogicamente próximos, devido à possibilidade de o produtor desses metabólitos propagar seus genes indiretamente. Dadas as já destacadas dissimilaridades morfológicas, fisiológicas e taxonômicas entre actinobactérias e rizóbios, o compartilhamento de *public goods* entre esses microrganismos é um resultado no mínimo intrigante.

5.3 Seleção das cepas mais promissoras

A partir dos ICs, as actinobactérias foram distribuídas em 7 grupos quanto à sua similaridade. Desses grupos, aquele contendo as actinobactérias A139 e A145 apresentaram um IC maior do que as demais. Esse resultado é ilustrado pela Figura 7, onde o dendrograma resultante das análises estatísticas é apresentado junto a um *heatmap* plotado a partir de seus índices de compatibilidade. O *heatmap* permite uma melhor observação dos ICs de cada cepa em cada meio de cultura, ilustrado pela tonalidade das cores.

FIGURA 7 – *Heatmap* do índice de compatibilidade das actinobactérias (ICA) em relação aos rizóbios do Semiárido nordestino associado a análise de agrupamento

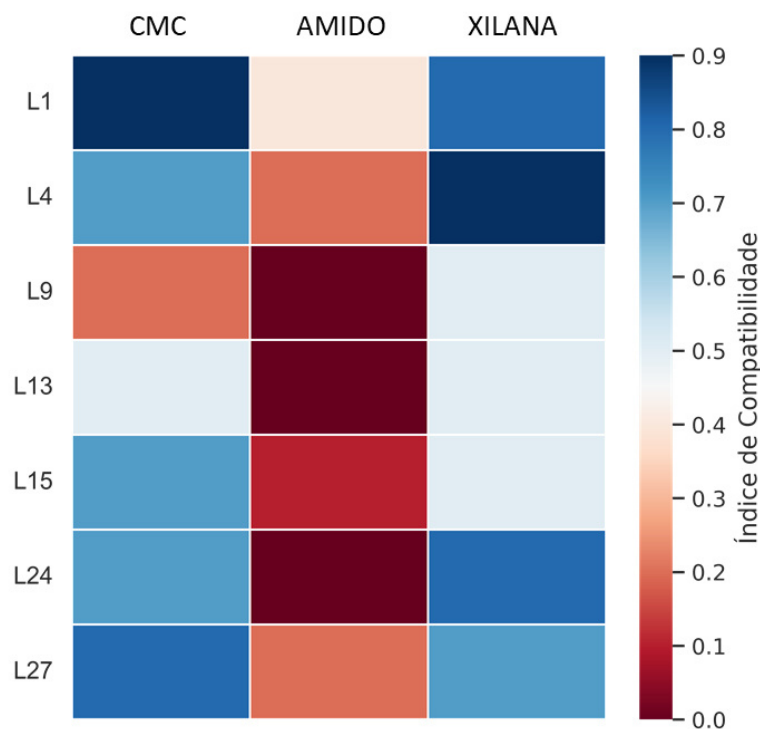


À esquerda da imagem, é possível observar o *heatmap* com os índices de compatibilidade das actinobactérias. No eixo x, encontram-se as cepas de actinobactérias utilizadas, e no eixo y os meios de cultura. Já à direita, observa-se o dendrograma obtido a partir da análise de agrupamento dos índices de compatibilidade e de antagonismo. As actinobactérias foram divididas em 7 grupos a partir de sua semelhança.

Fonte: o autor

Bioinoculantes na agricultura têm várias funções, dentre elas inibição do crescimento de fitopatógenos, produção de sideróforos, fixação de nitrogênio, produção de fitormônios e solubilização de fosfato. Além disso, esses inoculantes são capazes também de diminuir os danos de fertilizantes químicos (CHAUDHARY; SHUKLA, 2020). Vários microrganismos já são utilizados como biofertilizantes, como dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Phyllobacterium* e *Rhodococcus*, além de rizóbios como *Azorhizobium*, *Sinorhizobium* e *Bradyrhizobium*, e actinobactérias como *Mycobacterium*, *Frankia*, *Arthrobacter* e *Streptomyces* (MAHANTY *et al.*, 2016).

FIGURA 8 – *Heatmap* dos índices de compatibilidade dos rizóbios (ICR) em relação às actinobactérias do Semiárido nordestino.



No eixo x, encontram-se as cepas de rizóbios utilizadas, e no eixo y os meios de cultura.

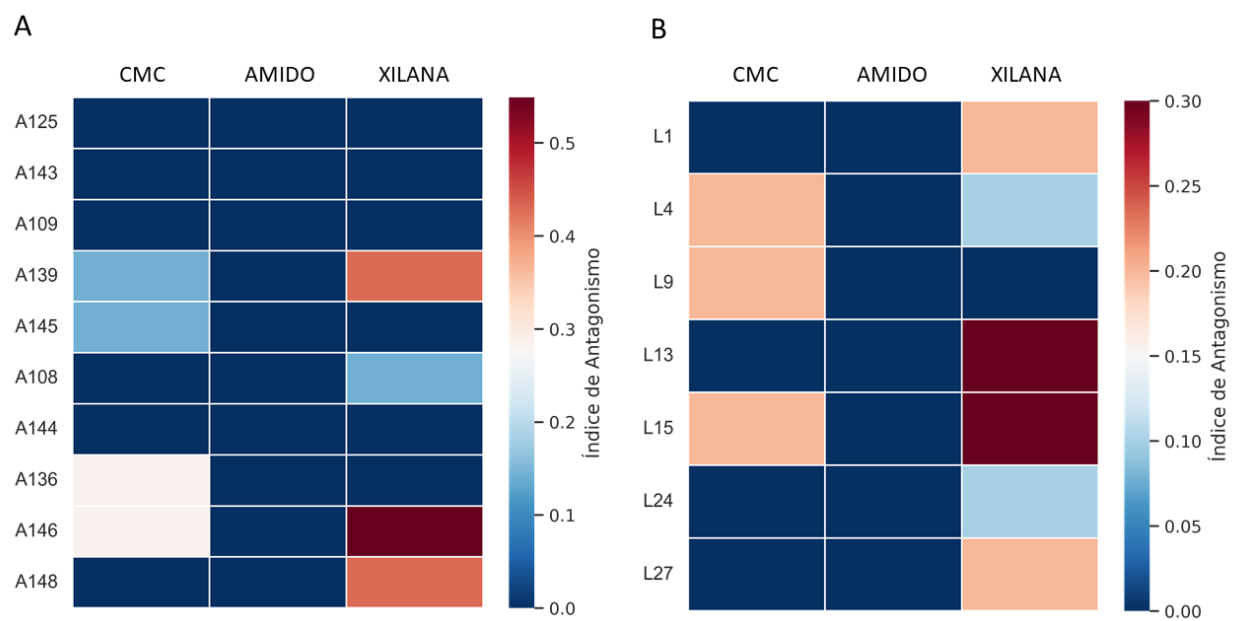
Fonte: o autor

A pesquisa conduzida por Htwe *et al.* (2019) mostrou que um biofertilizante a base de *Bradyrhizobium japonicum* SAY3-7, *Bradyrhizobium elkanii* BLY3-8 e *Streptomyces griseoflavus* P4 apresentou efeitos positivos no crescimento de feijão-mungo, feijão-caupi e soja. Principalmente quando inoculado junto ao feijão-mungo e à soja, esse bioinoculante melhorou o crescimento, nodulação, fixação de nitrogênio, absorção de NPK e rendimento de sementes em experimento executado em casa de vegetação. Considerando a compatibilidade metabólica apresentada *in vitro* entre as cepas A139 e A145 (*Streptomyces* sp.), e L1

(*Bradyrhizobium elkanii*), é evidente que uma coinoculação *in vivo* se faz necessária para avançar na prospecção desse bioinoculante. É possível dizer, contudo, que uma coinoculação *in vitro* é um passo importante para eliminar possíveis pares antagonísticos antes de se proceder para experimentos *in vivo*. Além disso, a pesquisa aqui conduzida entre Rizobactérias Promotoras de Crescimento isoladas do Semiárido proporcionou um panorama das interações entre esses microrganismos do ponto de vista ecológico.

A partir do índice de antagonismo (IA) entre as cepas, foram também plotados dois *heatmaps* para ilustração desses dados. Para os IC, as cores variavam do vermelho (menor IC) até o azul (maior IC), já que para nós um IC mais próximo de 1 era desejado. Contudo, para os IA isso se inverte. Como é desejado um IA mais próximo do 0, as cores nesses *heatmaps* variaram do azul (menor IA) para o vermelho (maior IA).

FIGURA 9 – *Heatmaps* dos índices de antagonismo das actinobactérias (A) e dos rizóbios (B)



No eixo x, encontram-se as cepas de actinobactérias (A) e de rizóbios (B) utilizadas, e no eixo y os meios de cultura.

Fonte: o autor.

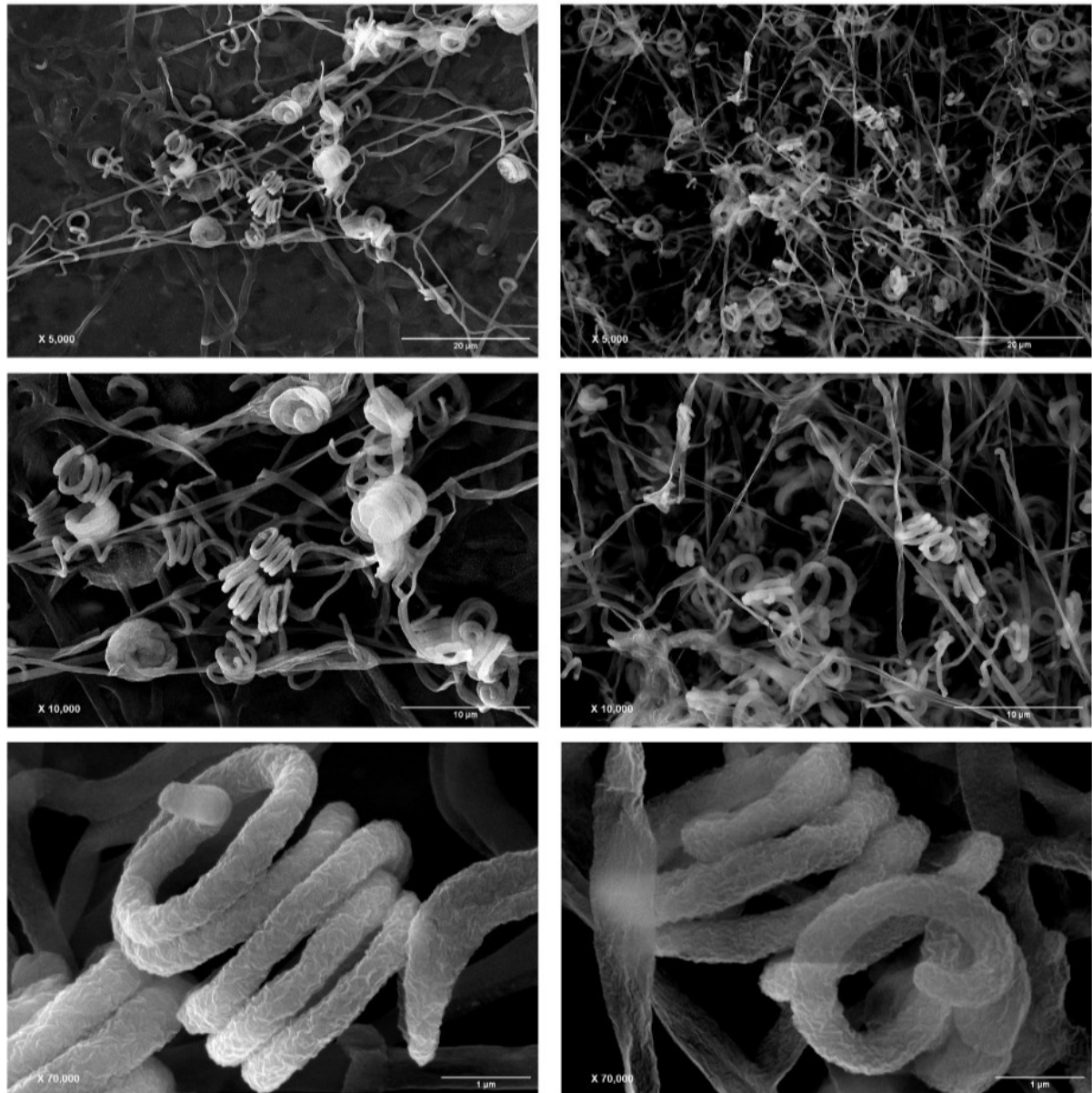
Apesar da compreensão limitada dos mecanismos de ação de diversas bactérias, estudos indicam que a aplicação de diferentes microrganismos em conjunto permite um melhor crescimento e uma proteção eficaz das plantas. A prospecção desses microrganismos deve ser multicomponente devido à considerável variabilidade do ambiente para produzir graus ótimos de cooperação do microrganismo e o efeito final desejado a planta. A combinação de cepas bacterianas em uma fórmula única melhora a eficácia e a confiabilidade, permitindo maior especificidade da cultura é altamente promissora (ZARDAK *et al.*, 2018; KOUR *et al.*, 2022).

Embora a produção de exoenzimas ser necessária para colonizar as raízes de leguminosas e realizar a SNF, não é comum que rizóbios apresentem esse aparato metabólico, evidenciando a importância de um microrganismo que facilite seu crescimento na presença de fontes de carbono as quais o rizóbio não consegue assimilar. A coinoculação com uma actinobactéria do gênero *Streptomyces* é altamente promissora para o crescimento bem sucedido de rizóbios nessas circunstâncias e consequentemente uma maior eficiência de fixação de nitrogênio, reduzindo a demanda por adubações nitrogenadas.

5.4 Microscopia eletrônica de varredura

Dentre as bactérias Gram-positivas, as actinobactérias apresentam a maior diferenciação morfológica. Esses microrganismos filamentosos formam hifas de 0,4 a 1,2 μm e esporos de 1 a 2 μm de espessura, tornando essas estruturas facilmente observáveis via MEV. As cepas que foram submetidas à MEV (A139 e A145) apresentaram características morfológicas semelhantes, com cadeias de esporos espiraladas (*Spira*) e esporos com superfície rugosa irregular. As imagens obtidas pela MEV (Figura 10) associadas à caracterização micromorfológica são evidência suficiente para inferir com certa segurança que essas cepas pertencem ao gênero *Streptomyces* (LI *et al.*, 2016).

FIGURA 10 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das cepas A139 e A145.



À esquerda, estão imagens da actinobactéria A139, e à direita, a A145. A primeira linha mostra as imagens na magnificação de 5.000 X, a segunda, 10.000 X e a terceira 70.000 X. São destacados os espirais característicos das actinobactérias do gênero *Streptomyces*.
Fonte: o autor

A microscopia eletrônica de varredura funciona, como o nome sugere, pela varredura de elétrons de alta energia sobre a superfície de uma determinada amostra. Por ter um comprimento de onda muito menor que a luz, os elétrons utilizados na MEV são capazes de “diferenciar” muito mais detalhes e características do que um microscópio óptico, podendo apresentar resoluções melhores que 1nm e magnificações de 200.000 até 1.000.000X para modelos mais modernos e poderosos (UL-HAMID, 2018). A MEV é realizada em uma câmara de vácuo, e consegue capturar diversos sinais que revelam informações como morfologia e composição da amostra analisada (AID *et al.*, 2020).

Actinobactérias isoladas de regiões áridas e semiáridas já foram bem estudadas e apresentaram grande potencial biotecnológico, como o controle de fitopatógenos, produção de biosurfactantes, e produção de enzimas (CASTAÑEDA-CISNEROS *et al.*, 2020). Segundo Parihar *et al.* (2022), a exploração de ambientes extremos pouco estudados é interessante pela possibilidade de se obter novas biomoléculas e novas espécies de actinobactérias. Contudo, quando se fala de gêneros, a natureza é mais restrita. Em seu estudo sobre diversidade de actinobactérias isoladas de bacias salinas no Deserto de Thar, na Índia, esses autores encontraram uma abundância de 64% de *Streptomyces*. Isso não é surpreendente, uma vez que esse gênero realmente é o dominante não apenas em abundância, mas também em importância biotecnológica (OLANREWAJU; BABALOLA, 2018). No Semiárido nordestino especificamente, a situação é a mesma: *Streptomyces* é o gênero de actinobactérias mais abundante (BRITO *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2019b).

6 CONCLUSÃO

As actinobactérias foram capazes de estimular o crescimento de rizóbios em meios de cultura não específicos para as bactérias diazotróficas. As cepas A139 e A145 (*Streptomyces sp.*) apresentaram a maior compatibilidade com os rizóbios nos meios testados. A cepa de rizóbio L1 (*Bradyrhizobium elkanii*) apresentou o melhor crescimento quando coinoculada com as actinobactérias utilizando carboximetilcelulose, amido e xilana como fontes de carbono, mesmo sem produzir o aparato enzimático necessário para degradar esses carboidratos.

Relações cooperativas entre bactérias são comuns na natureza, e o uso dessas interações para melhorar a qualidade de vida e a segurança alimentar da população por meio da biotecnologia é algo promissor. Já existem bioinoculantes sendo prospectados a partir de coinoculações de *Streptomyces* e *Bradyrhizobium*, mas devido à diversidade e complexidade das bactérias, das plantas, e dos fatores bióticos e abióticos aos quais estão submetidos, é necessária uma bioprospecção multifatorial de potencial genético a nível local. Os resultados obtidos nesse estudo são um passo importante em direção ao desenvolvimento de um biofertilizante adaptado para solos semiáridos, ao mesmo tempo que valoriza a diversidade microbiana local.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Estudos *in vivo* utilizando combinações das cepas de actinobactérias A139 e A145 com a cepa de rizóbio L1 seriam importantes para validar os resultados quando associados a plantas. Por ser um organismo de maior complexidade, há chances de que a planta medie as interações entre os microrganismos e que se obtenham resultados novos e inesperados. É evidente, porém, que uma coinoculação de *Streptomyces* e *Bradyrhizobium* apresenta grande potencial para o desenvolvimento de um biofertilizante.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABE, M. M. *et al.* Production and assessment of the biodegradation and ecotoxicity of xylan- and starch-based bioplastics. **Chemosphere**, [s. l.], v. 287, p. 132290, jan. 2022. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132290>
- AID, S. R. *et al.* A Study on biological samples preparation for high resolution imaging of scanning electron microscope. **Journal of Physics: Conference Series**, [s. l.], v. 1447, n. 1, p. 012034, jan. 2020. <http://dx.doi.org/10.1088/1742-6596/1447/1/012034>
- AL-AGAMY, M. H. *et al.* Production and partial characterization of α -amylase enzyme from marine actinomycetes. **Biomed Research International**, [s. l.], v. 2021, p. 1-15, dez. 2021. <http://dx.doi.org/10.1155/2021/5289848>
- ALKAHTANI, M. D. F. *et al.* Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacteria from desert plants and their application as bioinoculants for sustainable agriculture. **Agronomy**, [s. l.], v. 10, n. 9, p. 1325, set. 2020. <https://doi.org/10.3390/agronomy10091325>
- AL-SHAIBANI, M. M. *et al.* Biodiversity of secondary metabolites compounds isolated from phylum Actinobacteria and its therapeutic applications. **Molecules**, [s. l.], v. 26, n. 15, p. 4504, jul. 2021. <http://dx.doi.org/10.3390/agronomy10091325>
- ANANDAN, R. *et al.* An Introduction to Actinobacteria. In: DHARUMADURAI, Dhanasekaran; **YI, Jiang. (Edit.) Actinobacteria - Basics and biotechnological applications**. [S. l.], p. 3-38, 2016. <http://dx.doi.org/10.5772/62329>
- ARAUJO, R. *et al.* Biogeography and emerging significance of actinobacteria in Australia and Northern Antarctica soils. **Soil Biology and Biochemistry**, [s. l.], v. 146, p. 107805, jul. 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107805>
- ATIENO, M. *et al.* Assessment of biofertilizer use for sustainable agriculture in the Great Mekong Region. **Journal of Environmental Management**, [s. l.], v. 275, p. 111300, dez. 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111300>
- AXENOV-GIBANOV, D. V. *et al.* A. Actinobacteria isolated from an underground lake and moonmilk speleothem from the biggest conglomeratic karstic cave in Siberia as sources of novel biologically active compounds. **Plos One**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 1-21, fev. 2016. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0149216>
- BALAGURUNATHAN, R. *et al.* Characterization and Identification of Actinobacteria. In: BALAGURUNATHAN, R. *et al.* **Protocols in Actinobacterial Research**. Nova York: Springer, 2020. Cap. 3. p. 39-64. (Springer Protocols Handbooks). http://dx.doi.org/10.1007/978-1-0716-0728-2_3

- BAO, Y. *et al.* Important ecophysiological roles of non-dominant actinobacteria in plant residue decomposition, especially in less fertile soils. **Microbiome**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1-17, abr. 2021. <http://dx.doi.org/10.1186/s40168-021-01032-x>
- BARKA, E. A. *et al.* Taxonomy, Physiology, and natural products of actinobacteria. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, [s. l.], v. 80, n. 1, p. 1-43, nov. 2015. <http://dx.doi.org/10.1128/membr.00019-15>
- BASILE, L. A.; LEPEK, Viviana C. Legume–rhizobium dance: an agricultural tool that could be improved? **Microbial Biotechnology**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 1897-1917, jul. 2021. <http://dx.doi.org/10.1111/1751-7915.13906>
- BASU, A. *et al.* Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as green bioinoculants: recent developments, constraints, and prospects. **Sustainability**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 1140, jan. 2021. <http://dx.doi.org/10.3390/su13031140>
- BEHIE, S. W. *et al.* Molecules to ecosystems: actinomycete natural products *in situ*. **Frontiers In Microbiology**, [s. l.], v. 7, p. 1-11, jan. 2017. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.02149>
- BHATI, N. *et al.* Cost-effective cellulase production, improvement strategies, and future challenges. **Journal of Food Process Engineering**, [s. l.], v. 44, n. 2, p. 1-11, dez. 2020. <http://dx.doi.org/10.1111/jfpe.13623>
- BOSSE, M. A. *et al.* Physiological impact of flavonoids on nodulation and ureide metabolism in legume plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 166, p. 512-521, set. 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.06.007>
- BOUBEKRI, K. *et al.* Multifunctional role of Actinobacteria in agricultural production sustainability: a review. **Microbiological Research**, [S.L.], v. 261, p. 127059, ago. 2022. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2022.127059>
- BOUKAR, O. *et al.* Cowpea (*Vigna unguiculata*): genetics, genomics and breeding. **Plant Breeding**, [s. l.], v. 138, n. 4, p. 415-424, maio 2018. <http://dx.doi.org/10.1111/pbr.12589>
- BRITO, F. A. E. *et al.* Actinobactérias do solo rizosférico no bioma caatinga. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia - Go, v. 11, n. 21, p. 1992-2004, jun. 2015.
- BROWN-ELLIOTT, B. A. *et al.* Current Status of *Nocardia* taxonomy and recommended identification methods. **Clinical Microbiology Newsletter**, [s. l.], v. 37, n. 4, p. 25-32, fev. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2015.01.007>
- BRUCE, J. B. *et al.* Functional amyloids promote retention of public goods in bacteria. **Proceedings Of The Royal Society B: Biological Sciences**, [s. l.], v. 286, n. 1903, p. 20190709, 29 maio 2019. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2019.0709>
- CAI, P. *et al.* Soil biofilms: microbial interactions, challenges, and advanced techniques for *ex-situ* characterization. **Soil Ecology Letters**, [s. l.], v. 1, n. 3-4, p. 85-93, jul. 2019. <http://dx.doi.org/10.1007/s42832-019-0017-7>

CASTAÑEDA-CISNEROS, Y. E. *et al.* Isolation and selection of *Streptomyces* species from semi-arid agricultural soils and their potential as producers of xylanases and cellulases. **Current Microbiology**, [s. l.], v. 77, n. 11, p. 3460-3472, ago. 2020. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-020-02160-7>

CHAUDHARY, T. *et al.* Techniques for improving formulations of bioinoculants. **3 Biotech**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 1-9, abr. 2020. <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-020-02182-9>

CHAUDHARY, T.; SHUKLA, P. Bioinoculants for bioremediation applications and disease resistance: innovative perspectives. **Indian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 59, n. 2, p. 129-136, fev. 2019. <http://dx.doi.org/10.1007/s12088-019-00783-4>

ÇIÇEKLER, M. Biopulping and biobleaching in pulp and paper industry: a review of xylanase and its effects. *In*: BERAM, A.; ULUSAN, M. D. **Forest and agricultural studies from different perspectives**. Lithuania: Sra Academic Publishing, 2022. Cap. 2. p. 21-42

CLÚA, J.; *et al.* Compatibility between legumes and rhizobia for the establishment of a successful nitrogen-fixing symbiosis. **Genes**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 125, fev. 2018. <http://dx.doi.org/10.3390/genes9030125>

DAS, R. *et al.* Antimicrobial potentiality of actinobacteria isolated from two microbiologically unexplored forest ecosystems of Northeast India. **Bmc Microbiology**, [s.l.], v. 18, n. 1, p. 71, 11 jul. 2018. <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-018-1215-7>

DICENZO, G. C. *et al.* Multidisciplinary approaches for studying rhizobium–legume symbioses. **Canadian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 65, n. 1, p. 1-33, set. 2018. <http://dx.doi.org/10.1139/cjm-2018-0377>

DINESHKUMAR, R. *et al.* Microalgae as bio-fertilizers for rice growth and seed yield productivity. **Waste and Biomass Valorization**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 793-800, fev. 2017. <http://dx.doi.org/10.1007/s12649-017-9873-5>

DORNELAS, J. C. M. *et al.* Characterization and phylogenetic affiliation of actinobacteria from tropical soils with potential uses for agro-industrial processes. **Genetics And Molecular Research**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 1, 2017. <http://dx.doi.org/10.4238/gmr16039703>

D'SOUZA, G. *et al.* Ecology and evolution of metabolic cross-feeding interactions in bacteria. **Natural Product Reports**, [s. l.], v. 35, n. 5, p. 455-488, 2018. <http://dx.doi.org/10.1039/c8np00009c>

DUTTA, S.; PODILE, A. R. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): the bugs to debug the root zone. **Critical Reviews In Microbiology**, [s. l.], v. 36, n. 3, p. 232-244, jul. 2010. <http://dx.doi.org/10.3109/10408411003766806>

ENEBE, M. C.; BABALOLA, O. O. The influence of plant growth-promoting rhizobacteria in plant tolerance to abiotic stress: a survival strategy. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 102, n. 18, p. 7821-7835, jul. 2018. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-018-9214-z>

EVANS, C. R. *et al.* Metabolic heterogeneity and cross-feeding in bacterial multicellular systems. **Trends In Microbiology**, [s. l.], v. 28, n. 9, p. 732-743, set. 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2020.03.008>

FANG, L. *et al.* Exogenous application of signaling molecules to enhance the resistance of legume-rhizobium symbiosis in Pb/Cd-contaminated soils. **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 265, p. 114744, out. 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114744>

FATMAWATI, U. *et al.* Isolation of actinomycetes from maize rhizosphere from Kupang, east Nusa Tenggara province, and evaluation of their antibacterial, antifungal, and extracellular enzyme activity. **Indonesian Journal Of Biotechnology**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 40, jun. 2018. <http://dx.doi.org/10.22146/ijbiotech.33064>

FRANCO-CORREA, M.; CHAVARRO-ANZOLA, V. Actinobacteria as plant growth-promoting rhizobacteria. **Actinobacteria - basics and biotechnological Applications**, [s. l.], p. 249-270, fev. 2016. <http://dx.doi.org/10.5772/61291>

GEORGE, M. *et al.* Distribution and bioactive potential of soil actinomycetes from different ecological habitats. **African Journal of Microbiology Research**, [s. l.], v. 6, n. 10, p. 2265-2271, mar. 2012. <http://dx.doi.org/10.5897/ajmr11.856>

GIRI, Samir *et al.* Metabolic dissimilarity determines the establishment of cross-feeding interactions in bacteria. **Current Biology**, [s.l.], v. 31, n. 24, p. 5547-5557, dez. 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2021.10.019>

GIRIJA, D. *et al.* Isolation and characterization of native cowpea rhizobia from Wayanad India. **Legume Research**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 126-133, nov. 2018.

GOBALAKRISHNAN, R. Phylogenetic diversity of culturable marine actinobacteria isolated from the Havelock island, the Andamans, India. **Ecological Genetics And Genomics**, [s. l.], v. 23, p. 100123, jun. 2022. <http://dx.doi.org/10.1016/j.egg.2022.100123>

GOODFELLOW, M. *et al.* Rare taxa and dark microbial matter: novel bioactive actinobacteria abound in Atacama desert soils. **Antonie van Leeuwenhoek**, [s. l.], v. 111, n. 8, p. 1315-1332, maio 2018. <http://dx.doi.org/10.1007/s10482-018-1088-7>

GRAM, C. Ueber die isolirte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpreparaten. **Fortschritte der Medicin**, v. 2, p. 185-189, 1884.

HAMEDI, J.; POORINMOHAMMAD, N. The Cellular structure of actinobacteria. *In*: WINK, J. *et al.* **Biology and biotechnology of actinobacteria**, [s. l.]: Springer International Publishing. 2017, p. 5-28. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-60339-1_2

HAMID, M. E. *et al.* Diversity and geographic distribution of soil streptomycetes with antagonistic potential against actinomycetoma-causing *Streptomyces sudanensis* in Sudan and South Sudan. **Bmc Microbiology**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 1-13, fev. 2020. <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-020-1717-y>

HAYAT, S.; *et al.* Actinobacteria: potential candidate as plant growth promoters. **Plant Stress Physiology**, [s. l.], p. 1-17, set. 2020. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.93272>

HAZARIKA, S. N.; THAKUR, D. Actinobacteria. In: AMARESAN, N. *et al.* **Beneficial Microbes in Agro-Ecology**, [s. l.]: Elsevier. 2020, p. 443-476. Chapter 21. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-823414-3.00021-6>

HELENE, L. C. F. *et al.* New insights into the taxonomy of bacteria in the genomic era and a case study with rhizobia. **International Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 2022, p. 1-19, maio, 2022. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2022/4623713>

HTWE, A. Z. *et al.* Effects of co-inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* SAY3-7 and *Streptomyces griseoflavus* P4 on plant growth, nodulation, nitrogen fixation, nutrient uptake, and yield of soybean in a field condition. **Soil Science And Plant Nutrition**, [s. l.], v. 64, n. 2, p. 222-229, jan. 2018. <http://dx.doi.org/10.1080/00380768.2017.1421436>

HTWE, A. Z. *et al.* Effects of biofertilizer produced from *Bradyrhizobium* and *Streptomyces griseoflavus* on plant growth, nodulation, nitrogen fixation, nutrient uptake, and seed yield of mung bean, cowpea, and soybean. **Agronomy**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 77, fev. 2019. <http://dx.doi.org/10.3390/agronomy9020077>

HTWE, A. Z.; YAMAKAWA, T. Low-Density Co-Inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* SAY3-7 and *Streptomyces griseoflavus* P4 promotes plant growth and nitrogen fixation in soybean cultivars. **American Journal of Plant Sciences**, [s. l.], v. 7, n. 12, p. 1652-1661, 2016. <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2016.712156>

ISLAM, F.; ROY, N. Isolation and characterization of cellulase-producing bacteria from sugar industry waste. **American Journal of Bioscience**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 16, 2019. <http://dx.doi.org/10.11648/j.ajbio.20190701.13>

JABBOROVA, D.; *et al.* Co-inoculation of rhizobacteria promotes growth, yield, and nutrient contents in soybean and improves soil enzymes and nutrients under drought conditions. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1, nov. 2021. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-01337-9>

Jl, J. *et al.* Genome editing in Cowpea *Vigna unguiculata* Using CRISPR-Cas9. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 20, n. 10, p. 2471, maio 2019. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20102471>

JOSE, P. A. *et al.* Actinobacteria in natural products research: progress and prospects. **Microbiological Research**, [s. l.], v. 246, p. 126708, jan 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2021.126708>

JOSE, P. A. *et al.* Non-*Streptomyces* actinomycetes and natural products: recent updates. **Studies in Natural Products Chemistry**, [s. l.], p. 395-409, 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-444-64183-0.00011-7>

KAUSHAL, J. *et al.* A multifaceted enzyme conspicuous in fruit juice clarification: an elaborate review on xylanase. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 193, p. 1350-1361, dez. 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.10.194>

KLEIN, T. A. *et al.* Contact-Dependent interbacterial antagonism mediated by protein secretion machines. **Trends In Microbiology**, [s. l.], v. 28, n. 5, p. 387-400, maio. 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2020.01.003>

KOUR, D. *et al.* Drought adaptive microbes as bioinoculants for the horticultural crops. **Heliyon**, [s.l.], v. 8, n. 5, p. 9493, maio 2022. <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09493>

KUMAR, M. *et al.* Potential applications of extracellular enzymes from *Streptomyces* spp. in various industries. **Archives of Microbiology**, [s. l.], v. 202, n. 7, p. 1597-1615, maio 2020. <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-020-01898-9>

KUMAR, V. V. Biofertilizers and biopesticides in sustainable agriculture. **Role of Rhizospheric Microbes In Soil**, [s. l.], p. 377-398, 2018. http://dx.doi.org/10.1007/978-981-10-8402-7_14

KUMAWAT, K. C. *et al.* Co-inoculation of indigenous *Pseudomonas oryzihabitans* and *Bradyrhizobium* sp. modulates the growth, symbiotic efficacy, nutrient acquisition, and grain yield of soybean. **Pedosphere**, [s. l.], v. 32, n. 3, p. 438-451, jun. 2022. [http://dx.doi.org/10.1016/s1002-0160\(21\)60085-1](http://dx.doi.org/10.1016/s1002-0160(21)60085-1)

KURTBÖKE, D. I. *et al.* Actinobacteria in Marine Environments. *In*: KIM, S. K. **Encyclopedia of Marine Biotechnology**: five volume set. [S.L.]: John Wiley & Sons. 2020. Section VIII, Microbiology, cap. 86. p. 1951-1978. <https://doi.org/10.1002/9781119143802.ch86>

KUYKENDALL, L. D. *et al.* *Rhizobium*. **Bergey'S Manual of Systematics of Archaea and bacteria**, [s.l.]: Wiley. 2015. p. 1-6 <http://dx.doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00847>

KWON, H. Y. *et al.* Development of a universal fluorescent probe for Gram-Positive Bacteria. **Angewandte Chemie**, [s. l.], p. 8514-8519, maio. 2019. <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201902537>

LACOMBE-HARVEY, M. È. *Et al.* Chitinolytic functions in actinobacteria: ecology, enzymes, and evolution. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 102, n. 17, p. 7219-7230, jun. 2018. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-018-9149-4>

LADAN, W. H. *et al.* ROLE OF PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBIA STRAINS IN AGRICULTURE FOR SUSTAINABLE CROP YIELD (A REVIEW). **Bayero Journal Of Pure And Applied Sciences**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 326-335, abr. 2022.

LARSBRINK, J.; MCKEE, L. S. Bacteroidetes bacteria in the soil: glycan acquisition, enzyme secretion, and gliding motility. **Advances In Applied Microbiology**, [s. l.], p. 63-98, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.aams.2019.11.001>

LAU, E. T. *et al.* Plant growth-promoting bacteria as potential bio-inoculants and biocontrol agents to promote black pepper plant cultivation. **Microbiological Research**, [s. l.], v. 240, p. 126549, nov. 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2020.126549>

LAW, J. W. F. *et al.* A Review on mangrove actinobacterial diversity: the roles of *Streptomyces* and novel species discovery. **Progress in Microbes and Molecular Biology**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 1-10, maio. 2019. DOI:10.36877/pmmb.a0000024

LAW, J. W. F. *et al.* The Rising of modern Actinobacteria era. **Progress in Microbes and Molecular Biology**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 1- 6, 2020. <https://doi.org/10.36877/pmmb.a0000064>

LEWIN, G. R. *et al.* Evolution and ecology of actinobacteria and their bioenergy applications. **Annual Review of Microbiology**, [s. l.], v. 70, n. 1, p. 235-254, set. 2016. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-micro-102215-095748>

LI, Q. *et al.* Morphological identification of actinobacteria. **Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications**, [s. l.], p. 59-86, fev. 2016. <http://dx.doi.org/10.5772/61461>

LIMA, J. V. L. *et al.* Characterization of actinobacteria from the semiarid region, and their antagonistic effect on strains of rhizobia. **African Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 16, n. 11, p. 499-507, mar. 2017. <http://dx.doi.org/10.5897/ajb2016.15724>

LINDSTRÖM, K.; MOUSAVI, S. A. Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. **Microbial Biotechnology**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 1314-1335, dez. 2019. <http://dx.doi.org/10.1111/1751-7915.13517>

LITTLE, A. E. F. *et al.* Rules of Engagement: interspecies interactions that regulate microbial communities. **Annual Review of Microbiology**, [s. l.], v. 62, n. 1, p. 375-401, out. 2008. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.030608.101423>

MAHANTY, T. *et al.* Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development. **Environmental Science and Pollution Research**, [s.l.], v. 24, n. 4, p. 3315-3335, nov. 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-016-8104-0>

MAITRA, S. *et al.* Bioinoculants—Natural biological resources for sustainable plant production. **Microorganisms**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 51, dez. 2021. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms10010051>

MAJIDZADEH, M. *et al.* Antimicrobial activity of Actinobacteria isolated from dry land soil in Yazd, Iran. **Molecular Biology Reports**, [s. l.], v. 48, n. 2, p. 1717-1723, fev. 2021. <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-021-06218-y>

MANDAL, A. *et al.* Impact of genetically modified crops on rhizosphere microorganisms and processes: a review focusing on Bt cotton. **Applied Soil Ecology**, [s. l.], v. 148, p. 103492, abr. 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103492>

MANFREDINI, A. *et al.* Current methods, common practices, and perspectives in tracking and monitoring bioinoculants in soil. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 12, p. 1-22, ago. 2021. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2021.698491>

MEDEIROS, E. *et al.* Diversidade cultural de cepas de actinobactérias do semiárido. **Enciclopédia Biosfera**, [s. l.], v. 15, n. 27, p. 205-218, jun. 2018. http://dx.doi.org/10.18677/encibio_2018a87

MESQUITA, A. F. N. *et al.* Amylase-Producing Actinobacteria Facilitate Rhizobia Growth in a Culture Medium with Starch. **World Wide Journal Of Multidisciplinary Research And Development**, [S.L.], v. 8, n. 11, p. 91-94, nov. 2022.
<http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.7406324>

MIA, M. A. B.; SHAMSUDDIN, Z. H. *Rhizobium* as a crop enhancer and biofertilizer for increased cereal production. **African Journal of Biotechnology**, [s. l.], p. 6001-6009, 13 set. 2010

MIHAJLOVSKI, K. *et al.* From Agricultural Waste to Biofuel: enzymatic potential of a bacterial isolate *Streptomyces fulvissimus* CKS7 for bioethanol production. **Waste And Biomass Valorization**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 165-174, 10 fev. 2020.
<http://dx.doi.org/10.1007/s12649-020-00960-3>

MILJAKOVIĆ, D. *et al.* Bio-priming of soybean with *Bradyrhizobium japonicum* and *Bacillus megaterium*: strategy to improve seed germination and the initial seedling growth. **Plants**, [s. l.], v. 11, n. 15, p. 1927, jul. 2022.
<http://dx.doi.org/10.3390/plants11151927>

MITRI, S.; FOSTER, K. R. The Genotypic View of Social Interactions in Microbial Communities. **Annual Review Of Genetics**, [S.L.], v. 47, n. 1, p. 247-273, 23 nov. 2013.
<http://dx.doi.org/10.1146/annurev-genet-111212-133307>

NAYAK, S. K. *et al.* Rhizobacteria and its biofilm for sustainable agriculture: a concise review. *In*: YADAV, M. K.; SINGH, B. P. **New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering: Microbial Biofilms**, [s.l.]: Elsevier. 2020, p. 165-175.
<http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-444-64279-0.00013-x>

NOBBE, F.; HILTNER, L. **INOCULATION OF THE SOIL FOR CULTIVATING LEGUMINOUS PLANTS**. Titular: United States Patent Office. USA n. 570813. Depósito: 9 ago. 1895. Concessão: 3 nov. 1896.

NOFIANI, R. *et al.* Antibacterial Activities and Toxicity of *Streptosporangium* sp. SM1P. **Molekul**, [S.L.], v. 16, n. 3, p. 210, 15 nov. 2021.
<http://dx.doi.org/10.20884/1.jm.2021.16.3.780>

OLANREWAJU, O. S.; BABALOLA, O. O.. *Streptomyces*: implications and interactions in plant growth promotion. **Applied microbiology and biotechnology**, [s. l.], v. 103, n. 3, p. 1179-1188, dez. 2018. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-018-09577-y>

OO, K. T. *et al.* Isolation, Screening and Molecular Characterization of Multifunctional Plant Growth Promoting Rhizobacteria for a Sustainable Agriculture. **American Journal Of Plant Sciences**, [S.L.], v. 11, n. 06, p. 773-792, jun. 2020.
<http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2020.116055>

OROZCO-MOSQUEDA, M. C. *et al.* Plant growth-promoting bacteria as bioinoculants: attributes and challenges for sustainable crop improvement. **Agronomy**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 1167, jun. 2021. <http://dx.doi.org/10.3390/agronomy11061167>

- OSIPITAN, O. A. *et al.* Production systems and prospects of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) in the United States. **Agronomy**, [s. l.], v. 11, n. 11, p. 2312, nov. 2021. <http://dx.doi.org/10.3390/agronomy11112312>
- PACIOS-MICHELENA, S. *et al.* Application of *Streptomyces* Antimicrobial Compounds for the Control of Phytopathogens. **Frontiers In Sustainable Food Systems**, [S.L.], v. 5, p. 696518, 9 set. 2021. <http://dx.doi.org/10.3389/fsufs.2021.696518>
- PALAI, J. B. Role of *Rhizobium* on growth and development of groundnut: a review. **International Journal of Agriculture Environment and Biotechnology**, [s.l.], v. 14, n. 1, p. 63-75, mar. 2021. <http://dx.doi.org/10.30954/0974-1712.01.2021.7>
- PANDE, S. *et al.* Metabolic cross-feeding via intercellular nanotubes among bacteria. **Nature Communications**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 1-13, fev. 2015. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms7238>
- PARIHAR, K. *et al.* Species composition and diversity dynamics of actinomycetes in arid and semi-arid salt basins of Rajasthan. **Current Microbiology**, [s.l.], v. 79, n. 6, p. 168, abr. 2022. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-022-02851-3>
- PARTE, A. C. *et al.* List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 70, n. 11, p. 5607-5612, nov. 2020. <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.004332>
- PATHAK, D. V.; KUMAR, M. Microbial Inoculants as Biofertilizers and Biopesticides. **Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity**, [s.n.t.], p. 197-209, 2016. http://dx.doi.org/10.1007/978-81-322-2647-5_11
- PHELAN, V. V. *et al.* Microbial metabolic exchange—the chemotype-to-phenotype link. **Nature Chemical Biology**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 26-35, dez. 2011. <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.739>
- POLTURAK, G. *et al.* New and emerging concepts in the evolution and function of plant biosynthetic gene clusters. **Current Opinion in Green And Sustainable Chemistry**, [s. l.], v. 33, p. 100568, fev. 2022. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cogsc.2021.100568>
- PONOMAROVA, O.; PATIL, K. R. Metabolic interactions in microbial communities: untangling the gordian knot. **Current Opinion In Microbiology**, [S.L.], v. 27, p. 37-44, out. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2015.06.014>
- POOLE, P. *et al.* Rhizobia: from saprophytes to endosymbionts. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 16, n. 5, p. 291-303, jan. 2018. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2017.171>
- PRASAD, M. *et al.* Plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR) for sustainable agriculture. **Pgpr Amelioration in Sustainable Agriculture**, [s. l.], p. 129-157, 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-815879-1.00007-0>
- PUTRI, A L; SETIAWAN, R. Isolation and screening of actinomycetes producing cellulase and xylanase from Mamasa soil, West Sulawesi. **Iop Conference Series: Earth and**

Environmental Science, [s. l.], v. 308, n. 1, p. 012035, ago. 2019.
<http://dx.doi.org/10.1088/1755-1315/308/1/012035>

RACHMANIA, M. K. *et al.* Xylan-degrading ability of thermophilic actinobacteria from soil in a geothermal area. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 144-154, jan. 2020. <http://dx.doi.org/10.13057/biodiv/d210119>

RAHLWES, K. C.; *et al.* Cell walls and membranes of actinobacteria. **Subcellular Biochemistry**, [s. l.], p. 417-469, 2019. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-18768-2_13

RAJKUMARI, J. *et al.* The changing paradigm of rhizobial taxonomy and its systematic growth upto postgenomic technologies. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 38, n. 11, p. 206, ago. 2022. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-022-03370-w>

RAMOS, K. A. *et al.* Caracterização e diversidade cromogênica de actinobactérias de um nicho microbiano preservado no bioma Caatinga. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia - GO, v. 11, n. 21, p. 2115-2125, jun. 2015.

RODRIGUES, T. F. *et al.* Impact of pesticides in properties of *Bradyrhizobium* spp. and in the symbiotic performance with soybean. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 36, n. 11, p. 172, out. 2020. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-020-02949-5>

ROHDE, M. The Gram-Positive Bacterial Cell Wall. **Microbiology Spectrum**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 1-21, maio 2019. <http://dx.doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0044-2018>

SADOWSKY, M. J. *et al.* Biochemical Characterization of fast- and slow-growing rhizobia that nodulate soybeans. **International Journal of Systematic Bacteriology**, [s. l.], v. 33, n. 4, p. 716-722, out. 1983.

SAIDI, S. *et al.* Improvement of *Medicago sativa* crops productivity by the co-inoculation of *Sinorhizobium meliloti*-Actinobacteria Under Salt Stress. **Current Microbiology**, [s. l.], v. 78, n. 4, p. 1344-1357, mar. 2021. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-021-02394-z>

SALWAN, R.; SHARMA, V. Molecular and biotechnological aspects of secondary metabolites in actinobacteria. **Microbiological Research**, [s. l.], v. 231, p. 126374, jan. 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2019.126374>

SANTOS, F. *et al.* Diversidade cultural de cepas de actinobactérias oriundas de áreas suscetíveis à desertificação. **Enciclopédia Biosfera**, [s. l.], v. 16, n. 29, p. 1844-1856, jun. 2019a. http://dx.doi.org/10.18677/encibio_2019a142

SANTOS, F. *et al.* Morfologia de cepas de actinobactérias em áreas suscetíveis à desertificação. **Enciclopédia Biosfera**, [s. l.], v. 16, n. 29, p. 1911-1924, jun. 2019b. http://dx.doi.org/10.18677/encibio_2019a148

SATRIA, H. *et al.* Extracellular hydrolytic enzyme activities of indigenous actinomycetes on pretreated bagasse using choline acetate ionic liquid. **Biocatalysis and Agricultural**

Biotechnology, [s. l], v. 24, p. 101503, mar. 2020.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101503>

SCHNEIDER, S. *et al.* Sulfate is transported at significant rates through the symbiosome membrane and is crucial for nitrogenase biosynthesis. **Plant, Cell & Environment**, [s. l], v. 42, n. 4, p. 1180-1189, nov. 2018. <http://dx.doi.org/10.1111/pce.13481>

SCHULTE, C. C. M. *et al.* Metabolic control of nitrogen fixation in rhizobium-legume symbioses. **Science Advances**, [s. l], v. 7, n. 31, p. 2433, jul. 2021.
<http://dx.doi.org/10.1126/sciadv.abh2433>

SHARMA, K. *et al.* Transparent soil microcosms for live-cell imaging and non-destructive stable isotope probing of soil microorganisms. **Elife**, [s. l], v. 9, p. 1-28, nov. 2020.
<http://dx.doi.org/10.7554/elife.56275>

SHETEIWY, M. S. *et al.* Physiological and biochemical responses of soybean plants inoculated with Arbuscular mycorrhizal fungi and *Bradyrhizobium* under drought stress. **Bmc Plant Biology**, [s. l], v. 21, n. 1, p. 1-21, abr. 2021. <http://dx.doi.org/10.1186/s12870-021-02949-z>

SILVA, M. *et al.* DIVERSIDADE DE CEPAS DE ACTINOBACTÉRIAS DA RPPN “FAZENDA NÃO ME DEIXES”-QUIXADÁ (CE). **Enciclopédia Biosfera**, [S.L.], v. 16, n. 29, p. 1857-1869, 30 jun. 2019b. http://dx.doi.org/10.18677/encibio_2019a143

SILVA, V. B. **Micro-organismos colonizadores de nódulos de *Vigna* spp. cultivadas em solos de Caatinga**. Tese. 2020. Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias – CCA. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo – PPGCS. Areia, PB, 2020

SILVA, V. M. A. Cross-feeding among soil bacterial populations: selection and characterization of potential bio-inoculants. **Journal of Agricultural Science**, [s. l], v. 11, n. 5, p. 23, abr. 2019a. <http://dx.doi.org/10.5539/jas.v11n5p23>

SINGH, R; DUBEY, A. K.. Diversity and applications of endophytic actinobacteria of plants in special and other ecological niches. **Frontiers in Microbiology**, [s. l], v. 9, p. 1767, ago. 2018. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.01767>

SMITH, N. W. *et al.* The Classification and Evolution of Bacterial Cross-Feeding. **Frontiers in Ecology and Evolution**, [s. l], v. 7, p. 1-15, maio. 2019.
<http://dx.doi.org/10.3389/fevo.2019.00153>

SOE, K. M. *et al.* Evaluation of effective Myanmar *Bradyrhizobium* strains isolated from Myanmar soybean and effects of coinoculation with *Streptomyces griseoflavus* P4 for nitrogen fixation. **Soil Science and Plant Nutrition**, [s. l], v. 59, n. 3, p. 361-370, jun. 2013.
<http://dx.doi.org/10.1080/00380768.2013.794437>

SOLANS, M. *et al.* Inoculation with native actinobacteria may improve desert plant growth and survival with potential use for restoration practices. **Microbial Ecology**, [s. l], v. 83, n. 2, p. 380-392, abr. 2021. <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-021-01753-4>

STADIE, J. *et al.* Metabolic activity and symbiotic interactions of lactic acid bacteria and

yeasts isolated from water kefir. **Food Microbiology**, [S.L.], v. 35, n. 2, p. 92-98, set. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2013.03.009>

TAKAHASHI, Y.; NAKASHIMA, T.. Actinomycetes, an Inexhaustible Source of Naturally Occurring Antibiotics. **Antibiotics**, [s. l], v. 7, n. 2, p. 45, maio. 2018. <http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics7020045>

TANVIR, R. *et al.* Endophytic Actinomycetes in the Biosynthesis of Bioactive Metabolites: Chemical Diversity and the Role of Medicinal Plants. In: ATTA-UR-RAHMAN (ed.). **Studies in Natural Products Chemistry**. 60. ed. Amsterdã: Elsevier, 2019. Cap. 11. p. 399-424. [Https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64181-6.00011-5](https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64181-6.00011-5)

THE SOCIETY FOR ACTINOMYCETES JAPAN. **Atlas of Actinomycetes**. Tokyo: Asakura Publishing, 1997.

UL-HAMID, A. Introduction. **A Beginners' guide to scanning electron microscopy**. [S.L.], p. 1-14, 2018. Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-98482-7_1

VAN BERGEIJK, D. A. *et al.* Ecology and genomics of actinobacteria: new concepts for natural product discovery. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l], v. 18, n. 10, p. 546-558, jun. 2020. <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-020-0379-y>

VAN TATENHOVE-PEL, R. J. *et al.* Population dynamics of microbial cross-feeding are determined by co-localization probabilities and cooperation-independent cheater growth. **The ISME Journal**, [S.L.], v. 15, n. 10, p. 3050-3061, maio 2021. <http://dx.doi.org/10.1038/s41396-021-00986-y>

VENTURA, M. *et al.* Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, [s. l], v. 71, n. 3, p. 495-548, set. 2007. <http://dx.doi.org/10.1128/membr.00005-07>

VERMA, V. C. *et al.* Endophytic actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Juss.: isolation, diversity, and anti-microbial activity. **Microbial Ecology**, [S.L.], v. 57, n. 4, p. 749-756, out. 2008. <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-008-9450-3>

WHEATLEY, R. M. *et al.* Lifestyle adaptations of *Rhizobium* from rhizosphere to symbiosis. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 117, n. 38, p. 23823-23834, 8 set. 2020. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.2009094117>

WU, Y. *et al.* Soil biofilm formation enhances microbial community diversity and metabolic activity. **Environment International**, [s.l], v. 132, p. 105116, nov. 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2019.105116>

YANG, J. *et al.* Mechanisms underlying legume–rhizobium symbioses. **Journal of Integrative Plant Biology**, [s. l], p. 244-267, dez. 2021. <http://dx.doi.org/10.1111/jipb.13207>

YIN, Q. *et al.* *Euzebya rosea* sp. nov., a rare actinobacterium isolated from the East China sea and analysis of two genome sequences in the genus *Euzebya*. **International Journal of**

Systematic and Evolutionary Microbiology, [s. l], v. 68, n. 9, p. 2900-2905, set. 2018.
<http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.002917>

ZARDAK, S. G. *et al.* Effects of using arbuscular mycorrhizal fungi to alleviate drought stress on the physiological traits and essential oil yield of fennel. **Rhizosphere**, [S.L.], v. 6, p. 31-38, jun. 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rhisph.2018.02.001>

ZHENG, T. *et al.* Improvement of α -amylase to the metabolism adaptations of soil bacteria against PFOS exposure. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [S.L.], v. 208, p. 111770, jan. 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111770>

ZHUANG, X. *et al.* Characterization of *Streptomyces piniterrae* sp. nov. and identification of the putative gene cluster encoding the biosynthesis of heliquinomycins. **Microorganisms**, [s. l], v. 8, n. 4, p. 495, mar. 2020. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms8040495>

ANEXO 1**ARTIGO PUBLICADO**

| | | |
|-----------|--|----|
| 2454-6615 | WORLD WIDE JOURNAL OF MULTIDISCIPLINARY RESEARCH AND DEVELOPMENT (ONLINE) | B1 |
|-----------|--|----|

O presente trabalho gerou o artigo intitulado “Amylase-Producing Actinobacteria Facilitate Rhizobia Growth in a Culture Medium with Starch” (DOI: 10.5281/zenodo.7406324), na revista de qualis B1 “World Wide Journal of Multidisciplinary Research and Development”, e está disponibilizado nas páginas a seguir. O artigo foi publicado na modalidade “open access”.



WWJMRD 2022; 8(11): 91-94
www.wwjmr.com
International Journal
Peer Reviewed Journal
Refereed Journal
Indexed Journal
Impact Factor SJIF 2017:
5.182 2018: 5.51, (ISI) 2020-
2021: 1.361
E-ISSN: 2454-6615

Ariel de Figueiredo Nogueira Mesquita, João Moreira de Matos Neto

Biotechnology Student (undergraduate) – Department of Biochemistry and Molecular Biology - Federal University of Ceará – Fortaleza - Brazil.

Leonardo Lima Bandeira

Graduate Student in Ecology and Natural Resources – Federal University of Ceará – Fortaleza - Brazil

Fernando Gouveia Cavalcante

PhD in Ecology and Natural Resources – Federal University of Ceará – Fortaleza - Brazil

Suzana Claudia Silveira Martins, Claudia Miranda Martins

Microbiology Professor at Biology Department – Laboratory of Environmental Microbiology – Federal University of Ceará – Fortaleza – Brazil.

Correspondence:

Ariel de Figueiredo Nogueira Mesquita

Biotechnology Student (undergraduate) – Department of Biochemistry and Molecular Biology - Federal University of Ceará – Fortaleza - Brazil.
arielmesquita26@alu.ufc.br

Amylase-Producing Actinobacteria Facilitate Rhizobia Growth in a Culture Medium with Starch

Ariel de Figueiredo Nogueira Mesquita, Leonardo Lima Bandeira, Fernando Gouveia Cavalcante, João Moreira de Matos Neto, Suzana Claudia Silveira Martins, Claudia Miranda Martins

Abstract

Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) are microorganisms that act in the production of metabolites that confer advantages for the growth and development of the plant, receiving in exchange sources of carbon and energy. Two classic examples of PGPR are rhizobia, which act in the bioavailability of nitrogen, and actinobacteria, which perform numerous functions such as production of phytohormones, antibiotics, and solubilization of phosphate and potassium. To establish this microbiota, the plant releases carbohydrate-rich exudates that not only serve as a carbon source for microorganisms, but also determine which microorganisms can colonize its rhizosphere. This study evaluated how amylase-producing actinobacteria are able to allow rhizobia growth without this enzymatic activity when co-inoculated in a culture medium that has starch as the sole carbon source. Since starch is a carbohydrate like those released in exudates, it is inferred that this ability to facilitate growth *in vitro* would be important in stimulating rhizobia growth in the rhizosphere and, consequently, nitrogen fixation. Ten actinobacteria and seven rhizobia were used, of which we obtained 12.86% of positive results. This cooperation exemplifies another case of substrate cross-feeding, paving the way to further *in vitro* and *in vivo* studies of interbacterial interactions, as well as to the prospect of biofertilizers.

Keywords: Bacterial ecological interactions; Bioinoculant; Cross-Feeding; PGPR; *Streptomyces*.

1. Introduction

Microorganisms play numerous ecological roles in soil, such as changing the spatial distribution and bioavailability of nutrients [1]. Bacteria beneficial to plants are traditionally known as plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and act in the mobilization of nutrients in the soil, production of growth regulators, phytohormones, solubilization of phosphate and potassium, and protection against phytopathogens [2].

Plant growth, productivity, and health rely on the microbial community associated with it, so the plant shapes the composition of the rhizospheric microbiota via rhizosphere feedback. Exudates are rich in carbohydrates, amino acids, organic acids, flavonoids, growth factors, enzymes, among others, which vary from plant to plant due to genetic and environmental factors, and are capable of selecting and stimulating microbial growth [3, 4, 5]. In association with factors such as soil type and pH, exudates determine the nature of the local microbiota [6].

The release of flavonoids from roots attracts bacteria known as rhizobia. These bacteria are the most classic example of PGPR due to its capacity of forming symbiotic nodules in the roots of legumes. There, they perform biological nitrogen fixation, which is a process responsible for making this nutrient bioavailable to the plant [7].

Exudates also attract other PGPRs such as actinobacteria. These bacteria stimulate plant growth, antagonize phytopathogens, improve nutrient availability, and produce phytohormones such as auxins and gibberellins [8]. Outside the rhizospheric environment, actinobacteria also show great biotechnological value for the production of antibiotics, insecticides, herbicides, immunomodulators, and enzymes such as cellulases, xylanases, pectinases, proteases, chitinases and amylases [9].

In this study, we evaluated the ability of actinobacteria with amylolytic activity to facilitate the growth of rhizobia without this enzymatic activity when grown in solid media with starch as sole carbon source. Microorganisms in the rhizosphere are fed by plant exudates and among the carbon sources present in this compound are carbohydrates, such as starch. Therefore, the ability of rhizobacteria such as actinobacteria to allow the growth of PGPR as rhizobia in the presence of this sugar constitutes an important ecological relationship and is the focus of this research.

2. Materials and methods

The microorganisms studied in this work were selected based on their extracellular amylolytic activity from the culture collection of the Laboratory of Environmental Microbiology of the Federal University of Ceará. We used ten strains of actinobacteria with extracellular amylolytic activity statistically different from the others, and 7 strains of rhizobia without this enzymatic activity. The actinobacteria genus was identified by Ribeiro et al. [10], and the species of rhizobia by Silva [11]. This information is shown in Table 1.

Table 1: Strains of actinobacteria and Rhizobia from the Semi-arid used in this work.

| Actinobacteria | | Rhizobia | |
|----------------|--------------------------|----------|------------------------------------|
| Strain | Genus | Strain | Species |
| A108 | <i>Streptomyces</i> | L1 | <i>Bradyrhizobium elkanii</i> |
| A109 | <i>Nocardia</i> | L4 | <i>Bradyrhizobium elkanii</i> |
| A125 | <i>Streptomyces</i> | L9 | <i>Rhizobium tropici</i> |
| A136 | <i>Streptomyces</i> | L13 | <i>Bradyrhizobium kavangense</i> |
| A139 | <i>Streptomyces</i> | L15 | <i>Bradyrhizobium japonicum</i> |
| A143 | <i>Streptomyces</i> | L24 | <i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> |
| A144 | <i>Streptosporangium</i> | L27 | <i>Bradyrhizobium iriomotense</i> |
| A145 | <i>Streptomyces</i> | - | - |
| A146 | <i>Streptosporangium</i> | - | - |
| A148 | <i>Streptomyces</i> | - | - |

Source: Ribeiro *et al.* (2022); Silva (2020).

Co-inoculation was performed according to Silva *et al.* [12] with modifications. The actinobacteria were inoculated by spots in duplicate in a culture medium containing starch as the sole carbon source. The plates were then incubated in a B.O.D. incubator for 7 days at 28°C.

At the end of the actinobacterial incubation period, 1 ml of rhizobia cultured in YM broth (yeast extract-mannitol) was transferred to sterile microtubes in triplicate. The microtubes were centrifuged at 9261 x g for 10 minutes. The supernatant was discarded and the pellet resuspended 3 times in sterile distilled water. 10 µL of purified rhizobia were then transferred to the plates containing the actinobacteria grown in starch medium, approximately 1 cm from the actinobacteria colony. The plates were then incubated in a B.O.D. incubator at 28°C for another 7 days. Rhizobium growth characterized a positive result, while the

absence of growth characterized a negative result. The compatibility index (CI) of actinobacteria and rhizobia was calculated by the ratio between the number of positive pairs and the number of possible pairs for each strain.

3. Results & Discussion

Among the 70 possible pairs, 9 presented a positive result, which represents 12.86% of positive pairs. Actinobacteria A148 stood out from the others, presenting a compatibility index of 0.429. Rhizobia L1 showed a compatibility index of 0.4, the highest among all rhizobia studied, and was compatible even with actinobacteria A148. Therefore, it is concluded that the pair A148+L1 is the most promising. The results are summarized in Table 2. Some examples of positive pairs are illustrated in Figure 1.

Table 2: *In vitro* co-inoculation between Semiarid actinobacteria and rhizobia in medium with starch.

| Rhizobia | Actinobacteria | | | | | | | | | | RCI |
|----------|----------------|------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-----|
| | A108 | A109 | A125 | A136 | A139 | A143 | A144 | A145 | A146 | A148 | |
| L1 | - | - | - | - | - | + | - | + | + | + | 0,4 |
| L4 | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | 0,2 |
| L9 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 |
| L13 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 |
| L15 | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | 0,1 |
| L24 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 |
| L27 | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + | 0,2 |
| ACI | 0 | 0 | 0,143 | 0 | 0,286 | 0,143 | 0 | 0,143 | 0,143 | 0,429 | |

(+) presence of facilitation (positive result). (-) absence of facilitation (negative result). (ACI) actinobacterial compatibility index. (RCI) rhizobia compatibility index. Source: the author.



Fig. 1: Examples of positive pairs from *in vitro* coinoculation. The blue arrows indicate rhizobia colonies. Red arrows indicate actinobacterial colonies. The images of A148 actinobacterium present a yellow background, as the intense production of pigments by the strain colored the entire medium. Source: the author.

Even though bacteria commonly compete for nutrients with each other, more complex relationships can be established. One of them is substrate cross-feeding, an interaction in which a strain feeds on molecules produced by the metabolic apparatus of another strain. These molecules can usually be exploited by both strains. An example would be the partial degradation of oligofructose or inulin by *Bacteroides thetaiotaomicron* in coculture with bifidobacteria. Single-chain sugars resulting from this extracellular degradation serve as a carbon source for both strains [13].

There is also evidence that the production of LdhA lactate dehydrogenase by *Pseudomonas aeruginosa*, which reduces pyruvate to D-lactate under anaerobic conditions, enables cross-feeding in biofilms in cystic fibrosis patients. This enzyme would be responsible for producing D-lactate in the anaerobic zone of the biofilm, which would be used as a substrate in the aerobic zone. This cooperation is one of the reasons why it is so complicated to treat patients with this type of lung infection [14]. We co-inoculated amylolytic actinobacteria and non-amylolytic rhizobia in culture medium containing starch as the sole carbon source. Extracellular degradation of starch by actinobacteria, mainly by the A148 strain, allowed the growth of rhizobia in this culture medium in a new example of substrate cross-feeding.

According to Zheng et al. [15], the presence of α -amylase strongly influences the adaptation strategies of bacterial metabolism and stimulates the production of metabolic signals such as acetic acid. This acid induces numerous changes in the physicochemical properties of the bacterial surface, such as hydrophobicity and surface charge, which directly affects the interactions that these bacteria are able to establish. This may explain why only 12.86% of our pairs were positive. As all strains of actinobacteria in this study are amylase producers and the rhizobia are not, the production of this enzyme by the actinobacteria may have influenced the production of other metabolites that inhibited the rhizobia growth. This makes the presence of positive results even more surprising, which can be explained by the production of secondary metabolites by the actinobacteria itself [16] or by the biochemical apparatus of rhizobia [17].

4. Conclusions

The actinobacteria allowing the growth of non-amylase-producing rhizobia in the medium containing starch is an

interaction that exhibits great biotechnological potential for the creation of new biofertilizers, as well as for a better understanding of the ecological relationships that occur in the soil of the Brazilian semiarid region.

5. Acknowledgments

We thank Dr. Francisca Soares de Araújo and the Chico Mendes Institute for the opportunity to carry out the collection of soil samples and consequent isolation of bacterial groups. We would like to also thank CAPES for their assistance during the graduate program.

References

1. Yang, Xiaodong et al. Influence of soil microorganisms and physicochemical properties on plant diversity in an arid desert of Western China. *Journal of Forestry Research*, 2021; 32(6): 2645-2659.
2. Prasad, Mahendra et al. Chapter Seven - Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for sustainable agriculture: Perspectives and Challenges. *PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture*, Woodhead Publishing, 2019, 129-157.
3. Hakim, Sughra et al. Rhizosphere engineering with plant growth-promoting microorganisms for agriculture and ecological sustainability. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 2021; 5: 617157.
4. Tian, Tao et al. The role of rhizodeposits in shaping rhizomicrobiome. *Environmental Microbiology Reports*, 2019; 12(2): 160-172.
5. Vives-Peris, Vicente et al. Root exudates: from plant to rhizosphere and beyond. *Plant Cell Reports*, 2019; 39(1): 3-17.
6. Kopecky, Jan et al. Micronutrients and soil microorganisms in the suppression of potato common scab. *Agronomy*, 2021; 11(2): 383.
7. Routray, Soumya et al. A review on Rhizobia and PGPRs interactions in legumes. *The Pharma Innovation Journal*, 2021; 7(10): 1448-1457.
8. Fatmawati, Umi et al. Screening and characterization of actinomycetes isolated from soybean rhizosphere for promoting plant growth. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 2019; 20(10): 2970-2977.
9. Gohain, Anwesha et al. Chapter 9 - Actinobacteria: diversity and biotechnological applications. *Recent Advancements in Microbial Diversity*, Academic Press, 2020, 217-231.

10. Ribeiro, Gabrielly et al. In vitro antagonism of actinobacteria against rhizobia from the soil. *Enciclopédia Biosfera*, 2022; 19(41): 41-50.
11. Silva, Valéria Borges da. Polyphasic characterization of nodule endophytic microorganisms of *Vigna* spp. grown in soils of Caatinga biome. Areia, PB. Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias – CCA. Thesis. September, 2020. Graduate program of Soil Science.
12. Silva, Valéria Maria Araujo et al. Cross-Feeding Among Soil Bacterial Populations: selection and characterization of potential bio-inoculants. *Journal of Agricultural Science*, 2019; 11(5): 23.
13. Smith, Nick W. et al. The Classification and Evolution of Bacterial Cross-Feeding. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 2019; 7: 1-15.
14. Lin, Yu-Cheng et al. The *Pseudomonas aeruginosa* Complement of Lactate Dehydrogenases Enables Use of d - and l -Lactate and Metabolic Cross-Feeding. *Mbio*, 2018; 9(5): 1-12.
15. Zheng, Tongtong et al. Improvement of α -amylase to the metabolism adaptations of soil bacteria against PFOS exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021; 208: 111770.
16. Boubekri, Kenza et al. Multifunctional role of Actinobacteria in agricultural production sustainability: a review. *Microbiological Research*, 2022; 261: 127059.
17. Fang, Linchuan et al. Exogenous application of signaling molecules to enhance the resistance of legume-rhizobium symbiosis in Pb/Cd-contaminated soils. *Environmental Pollution*, 2020; 265: 114744.