



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS**

**JULIANI BARBOSA DE SOUSA**

**INTERAÇÕES POSITIVAS ENTRE ACTINOBACTÉRIAS E RIZÓBIOS ORIUNDOS**  
**DE ÁREAS ANTROPIZADAS DO SEMIÁRIDO**

**FORTALEZA**

**2020**

JULIANI BARBOSA DE SOUSA

INTERAÇÕES POSITIVAS ENTRE ACTINOBACTÉRIAS E RIZÓBIOS ORIUNDOS DE  
ÁREAS ANTROPIZADAS DO SEMIÁRIDO

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ecologia e Recursos Naturais.  
Área de concentração: Ecologia e Recursos Naturais

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Claudia Miranda Martins

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup> Suzana Cláudia Silveira Martins

FORTALEZA

2020

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)

---

- S697i Sousa, Juliani Barbosa de.  
Interações positivas entre actinobactérias e rizóbios oriundos de áreas antropizadas do semiárido /  
Juliani Barbosa de Sousa. – 2023.  
93 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em  
Ecologia e Recursos Naturais , Fortaleza, 2023.  
Orientação: Profa. Dra. Claudia Miranda Martins.  
Coorientação: Profa. Dra. Suzana Cláudia Silveira Martins.
1. Diversidade biológica. 2. Microrganismos. 3. Atividade enzimática. 4. Facilitação. 5. Caatinga. I.  
Título.

CDD 577

---

JULIANI BARBOSA DE SOUSA

INTERAÇÕES POSITIVAS ENTRE ACTINOBACTÉRIAS E RIZÓBIOS ORIUNDOS  
DE ÁREAS ANTROPIZADAS DO SEMIÁRIDO

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais. Área de concentração: Ecologia e Recursos Naturais

Aprovada em: 27/11/2020.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Claudia Miranda Martins (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

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

---

Prof. Dr. Paulo Ivan Fernandes Júnior  
EMBRAPA Semiárido

---

Prof. Dr. Waldir Mantovani  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Rosilene Oliveira Mesquita  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

## AGRADECIMENTOS

À Deus, sempre.

À CAPES, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES)-Código de Financiamento 001.

À UFC e ao PPGERN, pela oportunidade.

Ao LAMAP e a EMBRAPA SEMIÁRIDO pelo auxílio *sine qua non*.

Às professoras Claudia e Suzanna, pela orientação, paciência, auxílio, carinho, conhecimento, intervenção e apoio nesses dez anos, os exemplos que eu espero seguir como professora, pesquisadora e pessoa. Muito Obrigada.

Aos professores Oscarina, Rosilene e Paulo Ivan pela assistência, disponibilidade e parceria.

Aos meus pais, que sempre colocaram a minha educação acima de tudo, que me permitiram estudar e continuar na pós graduação, que me apoiaram e me amam, a quem eu devo tudo, incluindo minha vida, especialmente a minha mãe, meu maior exemplo e quem eu mais admiro. Sempre.

Aos meus avós, que me criaram, me ajudaram, me alimentam, me abrigam e me amam. obrigada.

Ao meu irmão e sua esposa, Junior e Renata, por me apoiarem, ajudarem e serem as pessoas que eu sei com quem posso contar.

A minha família, pelo carinho, reuniões, brigas e por estarem ao meu lado. Especialmente minhas tias, Rita, Rosa, Telma e Zeneide e as minhas primas Amana e Mabel.

Ao grupo LAMAB, em especial Andro e Valéria, que estão na luta comigo, fizemos experimentos juntos, sofremos juntos na escrita nos apoiamos e seremos doutores juntos, obrigada. Mas também a Alana, Fernando (primeira pessoa que conheci na UFC e me aguenta até hoje), Karol, Larissa, Leonardo, Marcelo, Mayara, Vinícios os risos, as conversas, as dificuldades, os alagamentos, as festas, as cotas, compartilhamentos. Fizemos um local mágico nos nosso 35 m<sup>2</sup>. Aos amigos, Alexia, Bruno, Carla, Danilo (não teria defendido sem você), Kalyl, Larissa, Mailson, Winnie, e outros que não estou mencionando. Por me manterem sã e a todos que me apoiaram nesse desafio.

## RESUMO

O solo é um ambiente heterogêneo composto por uma enorme diversidade de microrganismos que possuem papel fundamental nos ecossistemas, principalmente terrestres. Actinobactérias e bactérias fixadoras de nitrogênio são membros importantes da biota edáfica e, pela relevância desses grupos microbianos, a compreensão das interações entre os mesmos vem sendo estudada. No semiárido nordestino do qual fazem parte, os recursos naturais são escassos, havendo a preocupação da comunidade acadêmica com a perda da sua biodiversidade, sendo essencial conhecer sua diversidade biológica e sua dinâmica. Essa pesquisa tem como objetivo o estudo das interações positivas entre actinobactérias e rizóbios oriundos do semiárido, como forma de contribuir com estudos ecológicos e de conservação. Esta tese é composta por 3 capítulos cujos objetivos foram avaliar as publicações sobre interações positivas e negativas entre actinobactérias e rizóbios, identificando lacunas de conhecimentos e prioridades para estudos futuros; analisar o perfil enzimático de actinobactérias e rizóbios oriundos do semiárido nordestino, verificando a ocorrência de facilitação *in vitro*; e aferir o efeito da co-inoculação, em experimento *in vivo*, de cepas de actinobactérias e rizóbios, sobre características fisiológicas e biométricas de plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.)Walp.) - Fabaceae).

**Palavras-chaves:** diversidade biológica; microrganismos; atividade enzimática; facilitação; Caatinga.

## ABSTRACT

Soil is a heterogeneous environment composed of a huge diversity of microorganisms that play a key role in ecosystems. Actinobacteria and nitrogen-fixing bacteria are important members of the edaphic community, due to the relevance of these microbial groups, so the understanding of the interactions between them has been studied due to their importance. In the semi-arid northeast of which they are part, where resources are scarce and there is concern of the academic community regarding the loss of biodiversity, it is essential to know the biological diversity and its behavior in this context. This research is based on the study of the positive interactions between actinobacteria and rhizobium from the semi-arid region, as a way to contribute to ecological studies and conservation of the Caatinga biome. This thesis includes 3 chapters whose objectives were to evaluate the changes in publications on positive and negative interactions between actinobacteria and rhizobium, identifying gaps in knowledge and priorities for future studies; to evaluate the enzymatic profile of actinobacteria and rhizobium from the semi-arid northeast and verify the occurrence of in vitro facilitation; and to assess the effect of co-inoculation, in an in vivo experiment, of actinobacteria and rhizobium strains on the physiological and biometric characteristics of cowpea (*Vigna unguiculata*).

**Keywords:** biological diversity; microorganisms; enzymatic activity; facilitation; Caatinga.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>REVISÃO SISTEMÁTICA SOBRE A INTERAÇÃO ENTRE ACTINOBACTÉRIAS E RIZÓBIOS.....</b>	<b>9</b>
	Resumo.....	9
	Abstract .....	9
<b>1.1</b>	<b>Introdução .....</b>	<b>10</b>
<b>1.2</b>	<b>Material e Métodos .....</b>	<b>12</b>
<b>1.3</b>	<b>Resultados e Discussão .....</b>	<b>13</b>
<b>1.4</b>	<b>Conclusão.....</b>	<b>23</b>
<b>2</b>	<b>CO-INOCULAÇÃO ENTRE ACTINOBACTÉRIAS E BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS NODULÍFERAS DO SEMIÁRIDO <i>IN VITRO</i> PONTOS CHAVE:.....</b>	<b>30</b>
	Resumo.....	30
	Abstract .....	31
<b>2.1</b>	<b>Introdução .....</b>	<b>31</b>
<b>2.2</b>	<b>Material e Métodos .....</b>	<b>34</b>
<b>2.2.1</b>	<b><i>Local</i>.....</b>	<b>34</b>
<b>2.2.2</b>	<b><i>Microrganismos</i> .....</b>	<b>34</b>
<b>2.2.3</b>	<b><i>Análise Química do Solo</i> .....</b>	<b>35</b>
<b>2.2.4</b>	<b><i>Caracterização Cultural</i> .....</b>	<b>35</b>
<b>2.2.5</b>	<b><i>Perfil Enzimático</i> .....</b>	<b>36</b>
<b>2.2.6</b>	<b><i>Facilitação in vitro</i>.....</b>	<b>36</b>
<b>2.2.7</b>	<b><i>Análise Estatística</i> .....</b>	<b>37</b>
<b>2.3</b>	<b>Resultados e Discussão .....</b>	<b>37</b>
<b>2.3.1</b>	<b><i>Propriedades do Solo</i> .....</b>	<b>37</b>
<b>2.3.2</b>	<b><i>Caracterização</i> .....</b>	<b>38</b>
<b>2.3.3</b>	<b><i>Perfil Enzimático</i> .....</b>	<b>46</b>
<b>2.3.4</b>	<b><i>Facilitação in vitro</i>.....</b>	<b>49</b>
<b>2.4</b>	<b>Conclusão.....</b>	<b>51</b>
<b>3</b>	<b>CO-INOCULAÇÃO ENTRE ACTINOBACTÉRIAS E BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS NODULÍFERAS DO SEMIÁRIDO <i>IN VIVO</i>.....</b>	<b>58</b>
	RESUMO.....	58
	ABSTRACT.....	59
<b>3.1</b>	<b>Introdução .....</b>	<b>60</b>
<b>3.2</b>	<b>Material e Métodos .....</b>	<b>61</b>
<b>3.2.1</b>	<b><i>Local</i>.....</b>	<b>61</b>
<b>3.2.2</b>	<b><i>Microrganismos</i> .....</b>	<b>62</b>
<b>3.2.3</b>	<b><i>Perfil Enzimático</i> .....</b>	<b>62</b>
<b>3.2.4</b>	<b><i>Facilitação in vitro</i>.....</b>	<b>62</b>
<b>3.2.5</b>	<b><i>Facilitação in vivo</i>.....</b>	<b>63</b>
<b>3.2.6</b>	<b><i>Trocas Gasosas Foliar</i> .....</b>	<b>64</b>
<b>3.2.7</b>	<b><i>Avaliação Do Desenvolvimento Vegetativo</i> .....</b>	<b>64</b>
<b>3.2.8</b>	<b><i>Análise Estatística</i> .....</b>	<b>64</b>

<b>3.3</b>	<b>Resultados e Discussão .....</b>	<b>65</b>
<b>3.3.1</b>	<b><i>Perfil Enzimático .....</i></b>	<b>65</b>
<b>3.3.2</b>	<b><i>Facilitação in vitro.....</i></b>	<b>66</b>
<b>3.3.3</b>	<b><i>Trocas Gasosas Foliar.....</i></b>	<b>68</b>
<b>3.3.4</b>	<b><i>Avaliação Do Desenvolvimento Vegetativo .....</i></b>	<b>69</b>
<b>3.4</b>	<b>Conclusão.....</b>	<b>71</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>75</b>
	<b>APÊNDICE A – FLUXOGRAMA REPRESENTANDO AS ETAPAS DA PESQUISA .....</b>	<b>87</b>
	<b>APÊNDICE B – REGISTRO FOTOGRÁFICO .....</b>	<b>88</b>
	<b>ANEXO A - HISTÓRICO DE CRIAÇÃO E ASPECTOS LEGAIS DA RPPN NÃO ME DEIXES, RAQUEL DE QUEIROZ. ....</b>	<b>93</b>

# 1 REVISÃO SISTEMÁTICA SOBRE A INTERAÇÃO ENTRE ACTINOBACTÉRIAS E RIZÓBIOS

## PONTOS CHAVE:

- Interesse crescente em pesquisas mundiais na composição de comunidades microbianas.
- Interações entre actinobactérias e rizóbios inicialmente foram pensadas como antagônicas. Seleção de cepas de rizóbios resistentes a antibióticos e cepas de actinobactérias que não
- obstaculizem a simbiose.
- A facilitação ocasiona para as plantas defesa contra fitopatógenos e aumento na biomassa e
- nodulação das plantas.

## RESUMO

Numerosos estudos foram publicados abordando aspectos específicos sobre actinobactérias e rizóbios, visando entender esses organismos, como interagem e sua abundância nos ambientes, além da importância para a indústria, porém, até o presente momento, não foi encontrada revisão sistemática sobre as interações, positivas e negativas, entre actinobactérias do solo e rizóbios. Objetivou-se fazer um levantamento de pesquisas de interações sobre actinobactérias e rizóbios, para elaboração de uma visão geral da evolução de pesquisas sobre o tema, assim como tendências e prioridades atuais e futuras. O número de publicações aumentou, estudos anteriores focaram nas relações antagônicas desses microrganismos, enquanto recentemente o foco está em benefícios para o plantio. Ao longo dos anos, os estudos evoluíram, evidenciados pela participação de autores de uma lista crescente de países e por um leque mais amplo de tópicos de pesquisa.

**Palavras-chaves:** Bibliometria. Facilitação. Antagonismo

## ABSTRACT

Numerous studies have been published addressing specific aspects about actinobacteria and *Rhizobium*, aiming to understand these organisms, how they interact and their abundance in the environments, in addition to the importance for industry, but to date, no systematic review of the positive and negative interactions between soil actinobacteria and rhizobium has been found. The objective was to survey the research of interactions between actinobacteria and

rhizobium, providing an overview of the evolution of the research, as well as current and future trends and priorities. The number of publications has increased, previous studies have focused on the antagonistic relationships of these microorganisms, while recently the focus is on benefits for planting. Over the years, studies have evolved, evidenced by the participation of authors from a growing list of countries and by a wider range of research topics.

**Keywords:** Bibliometry. Facilitation. Antagonism.

## 1.1 Introdução

As actinobactérias são um grupo de bactérias filamentosas, Gram-positivas, com alto teor de guanina-citosina (G + C) em seus genomas, que desenvolvem hifas morfológicamente semelhantes às dos fungos, de onde provém o nome, que deriva das palavras gregas para raio (aktis ou aktin) e fungos (mukēs). O diâmetro das hifas pode variar de 0,5 a 1,0 µm, enquanto as células possuem um cromossomo organizado em um nucleóide procariótico e uma parede celular de peptidoglicano, sendo suscetíveis a agentes antibacterianos. Em sua maioria são microrganismos aeróbicos, podendo também ser heterotróficos ou quimioautotróficos (SULTAN *et al.*, 2002; BARKA *et al.*, 2016).

Organismos de vida livre, são amplamente distribuídas em ecossistemas terrestres e aquáticos, capazes de usar uma ampla variedade de fontes nutricionais, incluindo vários polissacarídeos complexos, sendo importantes degradadoras de pesticidas além do papel no controle biológico por meio da produção de metabolitos secundários (FUENTES *et al.*, 2016; KAMIL *et al.*, 2018; SOUSA *et al.*, 2018). A diversidade de nichos das actinobactérias espelha sua capacidade fisiológica de crescer em uma variedade de condições. Característica que é a razão pela qual esse grupo oferece uma gama de serviços ecossistêmicos (LEWIN *et al.*, 2016), como a contribuição para o ciclo do carbono (SCOTT *et al.*, 2010), e interações, positivas ou negativas, com invertebrados, vertebrados, plantas e outros microrganismos (FERNANDEZ-REAL *et al.*, 2015; RUIU, 2015; QIN *et al.*, 2015; FYANS *et al.*, 2016; LIMA *et al.*, 2017; VINOETHINI *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2019; TESEO *et al.*, 2019).

As bactérias diazotróficas convertem nitrogênio atmosférico em formas utilizáveis

pelas plantas (VIEIRA, 2007, PARMAR; DUFRESNE, 2011, SHANKAR; SUNUTHA, 2013). Se apresentam na forma de bacilos, aeróbias, móveis, Gram-negativas e podem ser encontradas tanto na forma livre como associadas, principalmente com leguminosas (MOREIRA *et al.*, 2010). As bactérias noduladoras de leguminosas (nodulíferas) fixadoras de nitrogênio estão classificadas nas subclasses alfa e beta das Proteobacterias e contêm os gêneros *Agrobacterium*, *Aminobacter*, *Azorhizobium*, *Bosea*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Devosia*, *Mezorhizobium*, *Methylobacterium*, *Microvirga*, *Ochobactrum*, *Phyllobacterium*, *Rhizobium*, *Shinella*, *Sinorhizobium* e *Allorhizobium* (LINDSTRÖM; ASERSE; MOUSAVI, 2015).

Em meios de cultura os rizóbios podem apresentar características de crescimento rápido ou lento, alcalino, ácido ou neutro, crescendo numa variação de temperatura entre 25-42° C, pH entre 4-9, além de diferentes morfologias da colônia, características estas que podem ser utilizadas para classificar o gênero (DATTA *et al.*, 2014). Podem apresentar adaptações a condições adversas como salinidade, temperatura e pH e possuem importância econômica pela simbiose com plantas de interesse agrônômico, substituindo em algumas culturas a adubação nitrogenada (GLYAN'KO, 2014; MEHTA *et al.*, 2015).

Numerosos estudos foram publicados abordando aspectos específicos sobre actinobactérias ou rizóbios, visando entender esses organismos e a importância para a indústria (LEWIN *et al.*, 2016; MANIVASAGAN *et al.*, 2016; QIN *et al.*, 2016; GOMES *et al.*, 2017), porém, até o presente momento, não foi encontrada nenhuma revisão sistemática sobre as interações ecológicas entre as actinobactérias e as bactérias diazotróficas, deixando uma hiato científico.

A bibliometria é um conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas para analisar quantitativamente, explorar e organizar um vasto volume de literatura científica e tecnológica, incluindo artigos de periódicos e patentes. Procura facilitar o exame das propriedades da literatura, incluindo países de origem, afiliações, locais e citações (ZANJIRCHI *et al.*, 2019). Esse método de estudo tem sido utilizado em diferentes áreas de pesquisas (BORNMANN; MUTZ, 2015) para avaliar tendências, investigando as características das publicações, observando padrões de publicações científicas dentro do campo escolhido.

Com essa revisão sistemática de literatura objetivou-se fazer um levantamento sobre pesquisas que estudam as interações, positivas e negativas, entre actinobactérias e bactérias diazotróficas, fornecendo uma visão geral da evolução das pesquisas, tendências e prioridades atuais e futuras assim como tentar responder se as interações que ocorrem entre esses dois grupos são harmônicas ou desarmônicas.

## **1.2 Material e Métodos**

Foram coletados dados de publicações relacionadas a interação entre actinobactérias e rizóbios do banco de dados Scopus e Web of Science, usando a estratégia de busca: “((actinobacteria\* OR actinomycetes\*) AND (rhizobia\* OR rhizobium\*))”, esses termos foram escolhidos com o intuito de contemplar todas as nomenclaturas utilizadas. Um total de 669 artigos foram encontrados a partir da pesquisa, restrita a artigos publicados entre 1964 e 2020 (novembro). O ano de 1964 foi escolhido como base por ser o ano do primeiro artigo, encontrado, a descrever uma interação entre actinobactérias e rizóbios.

A seleção das fontes primárias baseou-se inicialmente na revisão do título, palavras-chave e resumos, embora tenha sido ampliado para incluir a seção de conclusões nos casos em que o título, as palavras-chave e o resumo forneceram informações insuficientes. Todos os estudos selecionados foram revisados em relação a um conjunto detalhado de critérios de inclusão elaborados para identificar se um estudo pode ou não ajudar a responder às perguntas de pesquisa especificadas. Em particular, nosso objetivo foi identificar se ocorre interação positiva entre actinobactérias e rizóbios no solo.

Todos os artigos selecionados foram incluídos na revisão (ou seja, nenhum outro critério de qualidade foi aplicado, visto que se tratava de artigos de periódicos que já teriam sido completamente revisados). Após as buscas e seleção, os artigos foram lidos na íntegra para análise do conteúdo a compor os resultados do presente estudo.

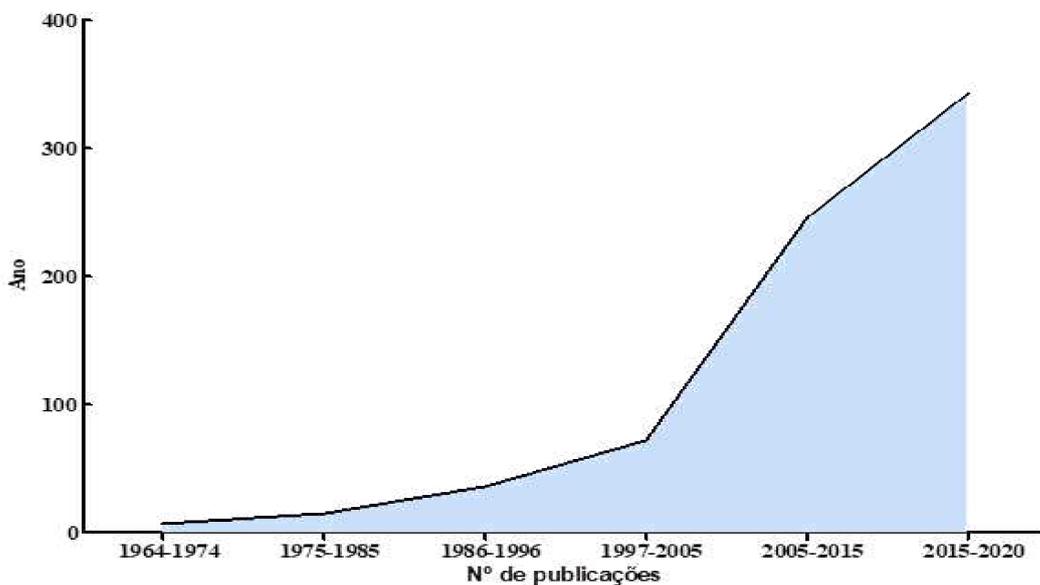
Para a análise bibliométrica os parâmetros analisados incluem: o número de publicações por ano, o número de citações para cada publicação, título, palavras-chave, revistas mais publicadas, países com mais colaborações e o país da afiliação do autor. Todos os resultados

foram obtidos usando rotinas de mineração em R (R Core Team, 2020) usando o pacote de dados bibliometrix (ARIA; CUCCURULLO, 2017).

### 1.3 Resultados e Discussão

Entre os anos de 1964 a 2020, foram registradas 669 publicações sobre actinobactérias e rizóbios, sendo, 604 artigos, 32 revisões e 13 capítulos de livros. Todos os tipos de publicação demonstraram um aumento significativo ao longo do tempo (FIGURA 1). Nos primeiros anos foram publicados 7 artigos, enquanto na última década avaliada foram publicados 343 artigos.

Figura 1: Número de publicações sobre interações entre actinobactérias e rizóbios no período de 1964 a 2020.



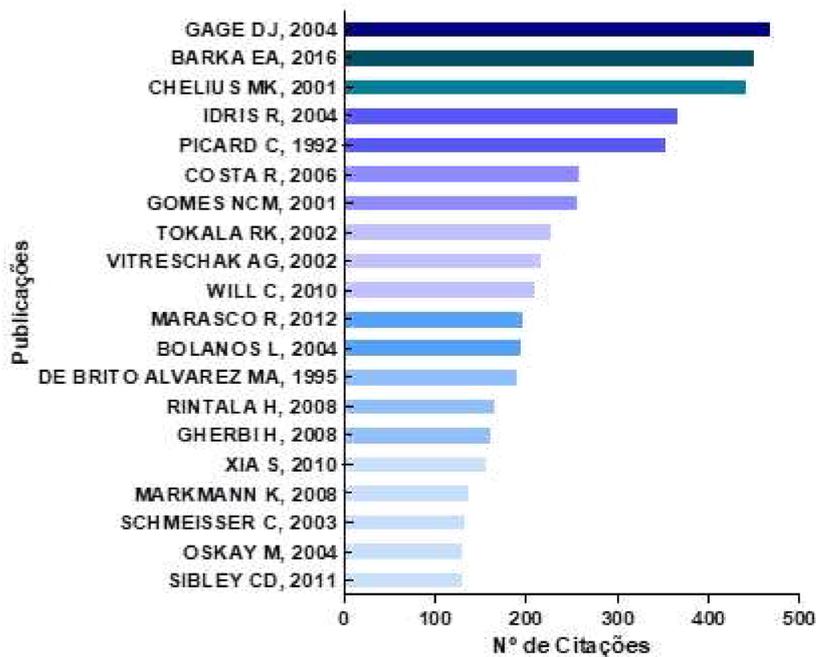
Fonte: elaborada pela autora.

O número de publicações aumentou significativamente ao longo do tempo avaliado, uma das razões para esse acréscimo está relacionado com o critério para medir produtividade dos autores, número de artigos publicados, gerando maior interesse em publicações e aumento no número de publicações científicas em todas as áreas (ABRAMO; D'ANGELO, 2014).

As três publicações com maior número de citações foram 469, 453 e 443 citações, respectivamente (FIGURA 2). Sendo os dois primeiros artigos de revisão, um sobre infecção simbiótica e a invasão durante a formação de nódulos (GAGE, 2004) e o outro sobre taxonomia,

fisiologia e metabólitos secundários de actinobactérias (BARKA *et al.*, 2016), o terceiro estudo mais citado é sobre a comunidade microbiana encontrada em raízes de milho (*Zea mays* L.) (CHELIUS; TRIPLETT, 2001).

Figura 2: As vinte publicações mais citadas sobre interações entre actinobactérias e rizóbios no período de 1964 a 2020.

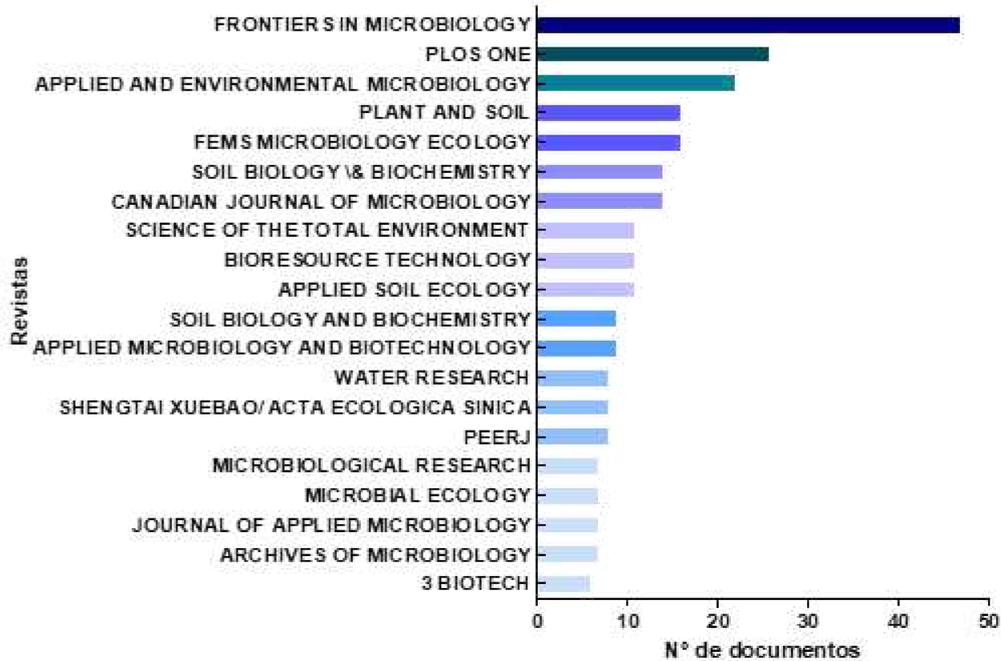


Fonte: elaborada pela autora.

Ao longo dos anos o número de citações aumentou, no entanto, artigos mais antigos tiveram mais tempo para acumular citações. Os biólogos tendem a citar um ao outro com mais frequência do que os físicos. E nem todos os campos produzem o mesmo número de publicações (VAN NOORDEN *et al.*, 2014).

O periódico *Frontiers in Microbiology* foi o que apresentou o maior número de publicações, com 47 documentos, seguida por *Plos One*, *Applied and Environmental Microbiology*, *Plant and Soil* e *FEMS Microbiology Ecology* com 26, 22, 16 e 16 documentos respectivamente (FIGURA 3).

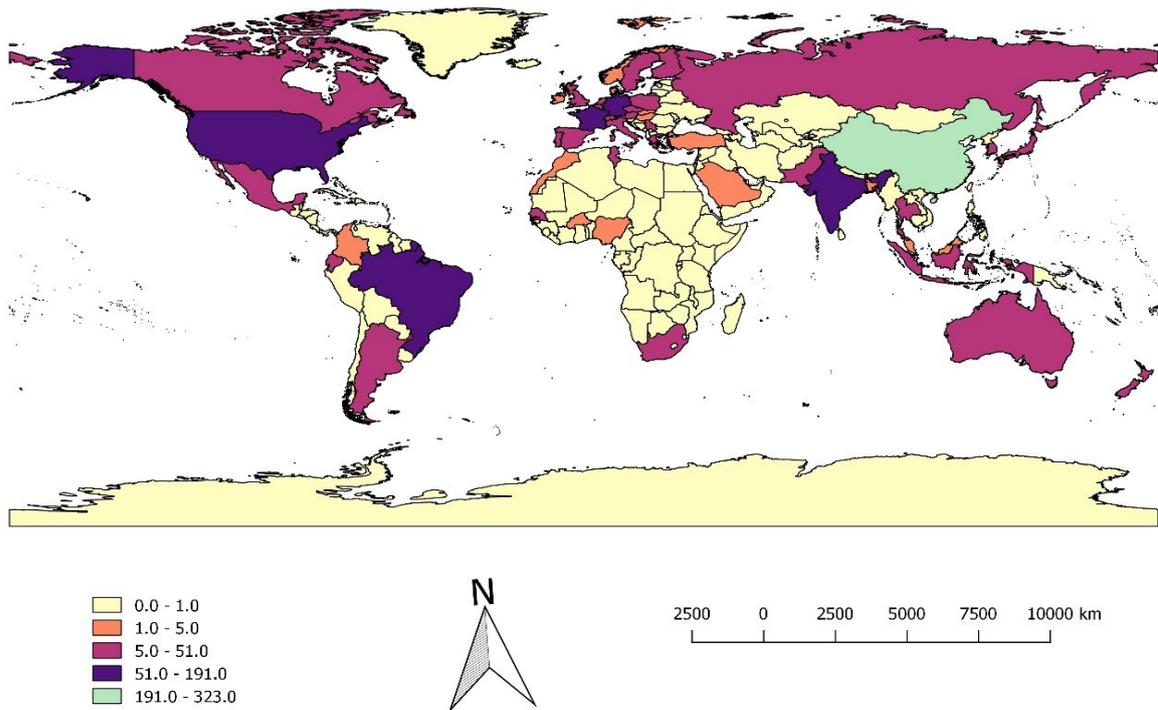
Figura 3: Revistas com o maior número de publicações sobre interações entre actinobactérias e rizóbios no período de 1964 a 2020.



Fonte: elaborada pela autora.

Em relação à afiliação dos autores, os resultados mostraram contribuições de 66 países diferentes (FIGURA 4), com predomínio dos estudos realizados por cientistas chineses, com 21% do total de publicações, seguidos por Estados Unidos (12%), Índia (7%) e França (6%). O Brasil se encontra na oitava posição com 5% do total de publicações.

Figura 4: Número de publicações, sobre interações entre actinobactérias e rizóbios nos



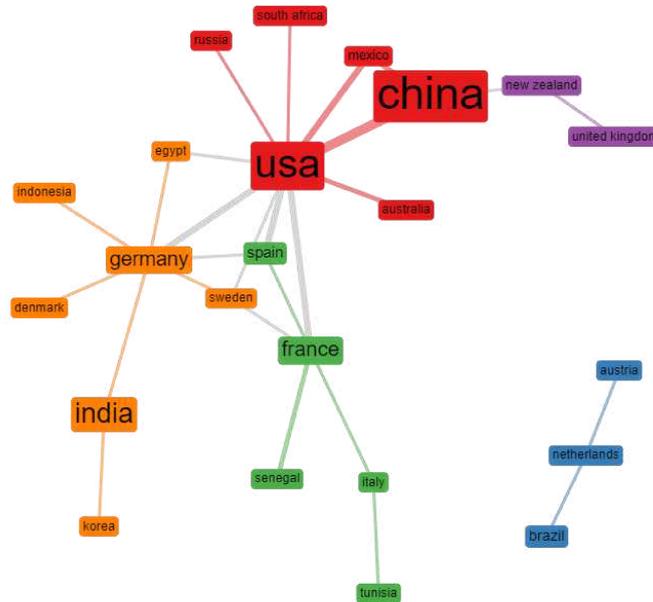
últimos 56 anos, em cada país ao redor do mundo.

Fonte: elaborada pela autora.

Países como China e Índia, que estão tendo um rápido desenvolvimento econômico, acompanhado de grandes populações, estão dedicando atenção às disciplinas focadas em ciência e tecnologia (WANG *et al.*, 2015). Embora o número de artigos publicados pela China seja maior que o dos Estados Unidos, os artigos publicados por autores americanos são mais citados, isso se deve à longa história acadêmica desse país (RAGHUNATHA *et al.*, 2019).

Os países que mais possuem colaboração entre si são China e Rússia, além de Alemanha e Índia (FIGURA 5). O Brasil parece manter relações de colaboração de pesquisa nessa área principalmente com Áustria e Países Baixos. Nas últimas décadas a China tem investido em pesquisas, aumentando o número de publicações em todas as áreas, especialmente matemática e agricultura (TANG *et al.*, 2015), como actinobactérias e rizóbio são importantes para a agricultura, existe um forte incentivo a essas pesquisas.

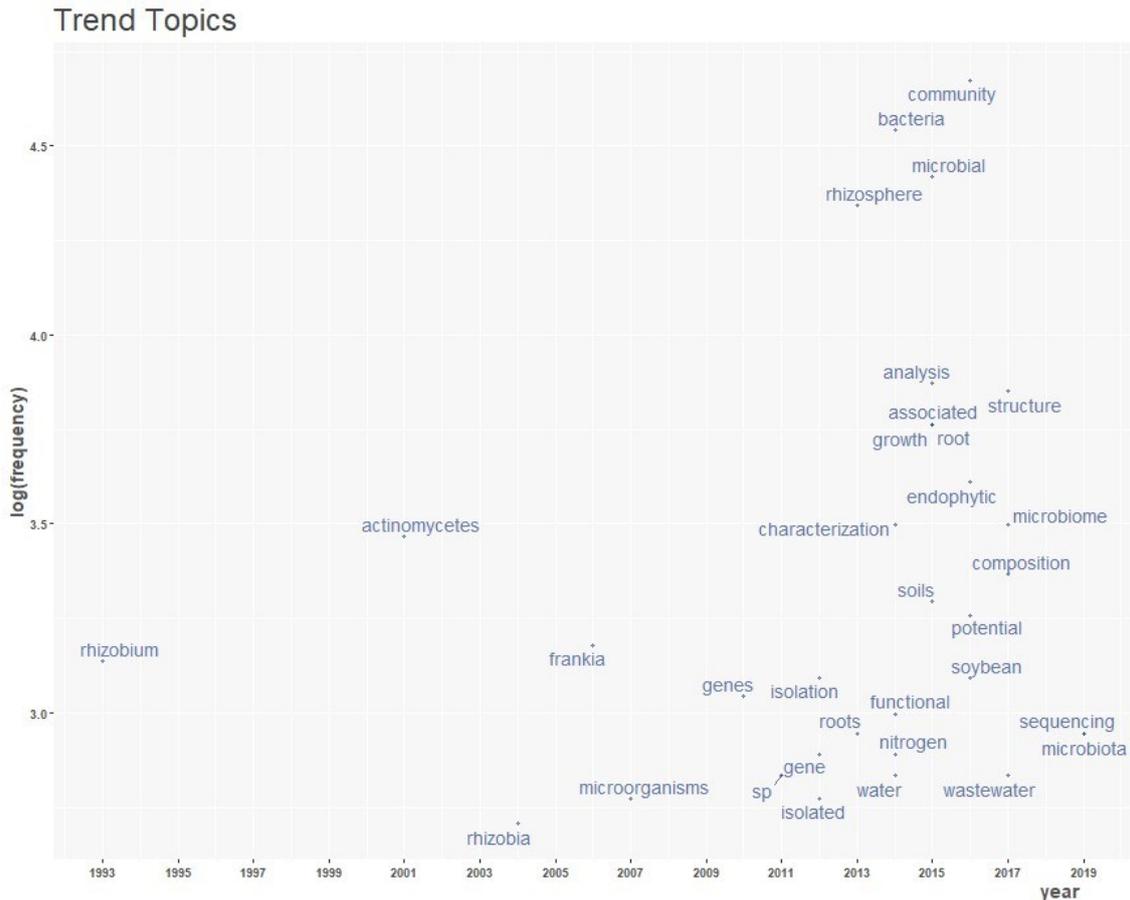
Figura 5: Mapa de rede com os países com mais colaborações em publicações sobre interações entre actinobactérias e rizóbios no período de 1964 a 2020.



Fonte: elaborada pela autora.

Os resultados para a análise dos títulos, aplicados aos documentos durante todo o período estudado, mostraram que a palavra mais comum foi comunidade (107), seguida por bactéria (94), microbiana (83), rizosfera (77) e análises (48) (FIGURA 6). Os gêneros que mais aparecem nos títulos são *Frankia* (24) e *Rhizobium* (23).

Figura 6: Palavras mais usadas nos títulos, para cada período, sobre interações entre actinobactérias e rizóbios.

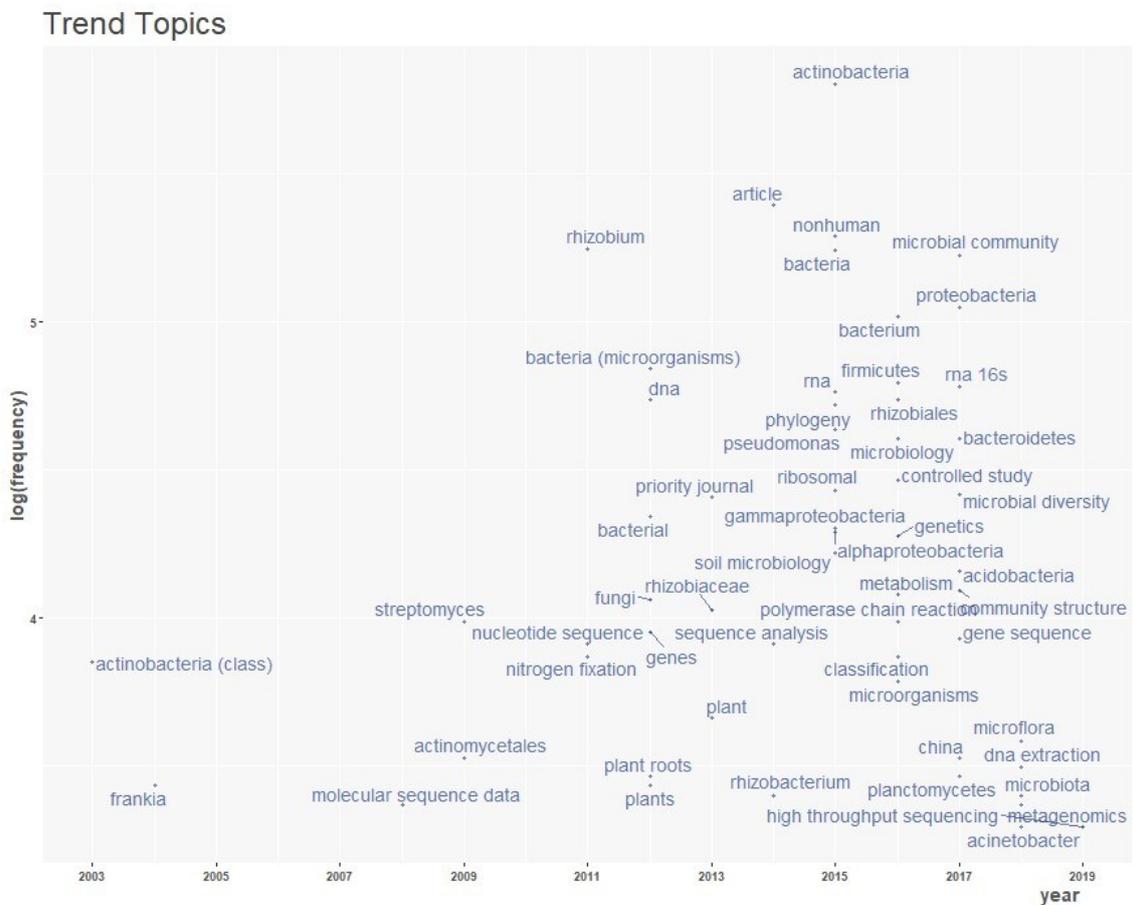


Fonte: elaborada pela autora

A análise do título, é uma ferramenta útil para investigar todo o conteúdo de artigos publicados sobre um tópico científico, enquanto a análise de palavras-chave oferece informações sobre uma tendência de pesquisa (ZHANG *et al.*, 2010). Os resultados da análise do título indicaram uma predominância de estudos relacionados a análise de comunidades microbianas em rizosfera, o que era esperado já que se trata de dois grupos microbianos distintos que são principalmente encontrados em solos. A presença na análise de título do gênero *Frankia*, principalmente no ano de 2006, deve-se ao fato de ser um gênero que forma nódulos com plantas hospedeiras, e a elucidação desse processo de infecção foi necessário e constantemente comparado com os rizóbios (MARKMANN; GICZEY; PARNISKE, 2008).

As palavras-chave mais utilizadas foram actinobactéria (331) e artigos (220) (FIGURA 7). Para as palavras-chave, os termos mais frequentemente usados são não humanos (198), *Rhizobium* (190), bactéria (189), comunidade microbiana (186), proteobacteria (156), firmicutes (121) e RNA (119).

Figura 7: Palavras mais usadas nas palavras-chaves, para cada período, sobre interações entre actinobactérias e rizóbios.



Fonte: elaborada pela autora

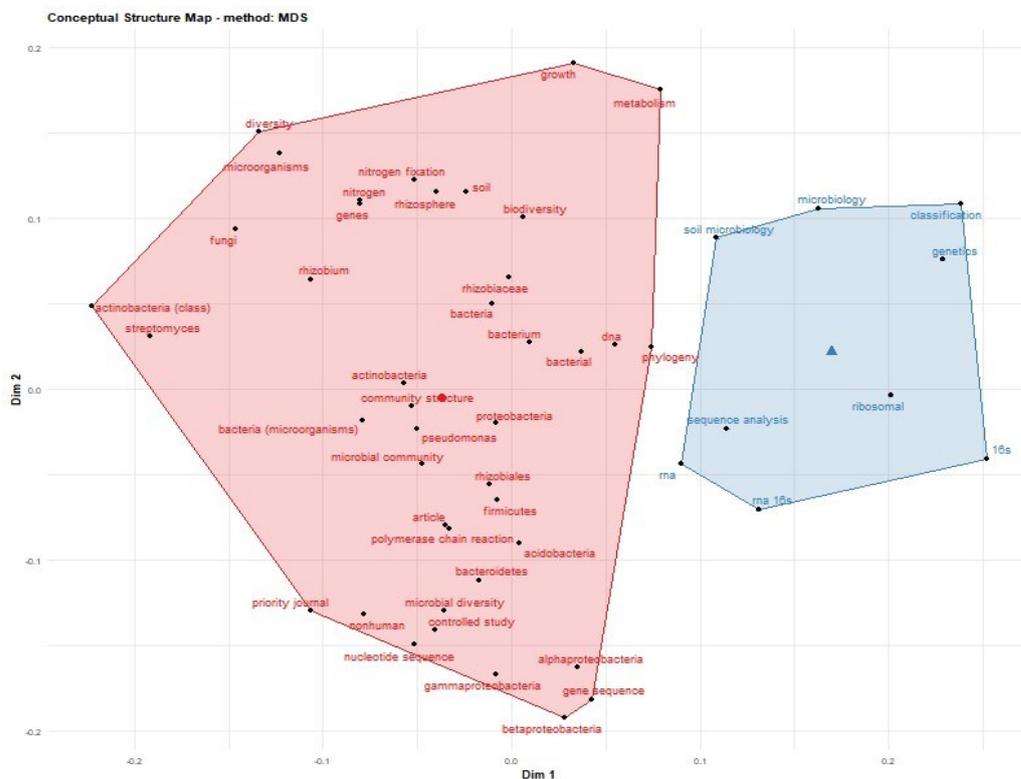
No ano de 2009 observou-se uma tendência de estudo do gênero *Streptomyces*, sendo o mais abundante e responsável pela produção de mais de 6000 compostos comerciais (BILYK, LUZHETSKYY, 2016; BARKA *et al.*, 2016). As associações, positivas e negativas, são um campo de pesquisa que cujo interesse vem crescendo em microbiologia (KELLENBERGER, 2001), observa-se um aumento das palavras relacionadas a associação de actinobactérias com bactérias, fungos e plantas. Também está presente um aumento, através dos anos, do uso de técnicas moleculares para a identificação das comunidades microbianas.

Um aspecto interessante dos resultados gerais é que eles podem ser usados para identificar tendências atuais e futuras prioridades de pesquisa. Examinar os tópicos que estão ausentes dos títulos/palavras-chave, bem como monitorar aqueles que subiram ou desceram na

lista de classificação, o que poderá dar alguma previsão de áreas que precisam de atenção científica.

Foi realizada uma análise fatorial das palavras chaves através do método de análise de correspondência múltipla, permitindo analisar graficamente as relações existentes entre as palavras através da redução de dimensionalidade do conjunto de dados (GREENACRE, 2007) (FIGURA 8). Essa técnica permitiu classificar os trabalhos encontrados em dois grupos. Grupo 1 englobando a estrutura e identificação das comunidades bacterianas, classificando os organismos em bactérias, fungos ou actinobactérias, e o grupo 2, que correspondeu às análises moleculares utilizadas.

Figura 8: Palavras mais usadas nas palavras-chaves sobre interações entre actinobactérias e rizóbios nos últimos 56 anos, divididas em dois grupos, um sobre comunidades e outro sobre técnicas moleculares.



Fonte: elaborada pela autora.

As técnicas moleculares tornaram possível não apenas explorar melhor, compreender e até mesmo prever ecossistemas microbianos em termos de abundância, diversidade e atividade,

mas também desenvolver bioindicadores novos, sensíveis e robustos para avaliar o impacto de perturbações naturais ou daqueles resultantes das atividades humanas, sendo cada vez mais usadas para estudo de ecossistemas (BOUCHEZ *et al.*, 2016).

Dos 669 artigos encontrados foram selecionados 29, para uma leitura completa, que relatam interações entre os dois grupos de microrganismos, sendo onze artigos sobre relações harmônicas, doze sobre relações desarmônicas e quatro sobre o efeito da inoculação de um dos grupos na comunidade do solo.

O mais antigo artigo encontrado data de 1964 e estudou o efeito antagônico de vinte e duas actinobactérias em rizóbios e *Agrobacterium radiobater*, nos resultados relatados as cepas de rizóbios apresentaram diferentes perfis de sensibilidade às cepas de actinobactérias, porem apresentaram resistência se submetidas a mesma cepa sequencialmente (VAN SCHREVEN, 1964). Enquanto no artigo de 2020, a inoculação conjunta de rizóbios e rizobactérias promotoras de crescimento em solos contaminados com cobre, houve aumento da abundância relativa de *Actinobacteria* e *Bacillus* e a presença do taxa *Firmicutes* como biomarcadores potenciais demonstraram que a co-inoculação aumentou o conteúdo de nutrientes do solo e melhorou o crescimento das plantas (JU *et al.*, 2020).

Actinobactérias produzem aproximadamente dois terços dos antibióticos existentes, a maioria oriunda do gênero *Streptomyces* (BARKA *et al.*, 2016), conseqüentemente, existe uma preocupação pelos efeitos negativos causados pelos antibióticos em bactérias de interesse econômico, como as nodulíferas. Foi quantificada as populações de actinobactérias, bactérias e fungos, em solos difíceis de estabelecerem relações simbióticas ou não, mostrando que actinobactérias apresentam atividade inibitória, porém isso pode variar de acordo com as cepas de rizóbios utilizadas, além dos fatores químicos e físicos do solo (PATEL, 1974; PUGASHETT; ANGLE; WAGNER, 1982; TRINICK; PARKER; PALMER, 1983).

Esse efeito antagônico foi estudado *in vitro* entre cepas de *Streptomyces* spp. e cepas de *Rhizobium* spp. e *Bradrhizobium* spp. que apresentaram (LIMA *et al.*, 2017) ou não (BARRION; HABTE, 1988; MINGMA *et al.*, 2014; NITHYA; PONMURUGAN, 2012) halo de inibição, da mesma forma, quando estudado *in vivo*, em soja (*Glycine max*) e soja-perene (*Neonotonia wightii*), a inoculação conjunta desses microrganismos interferiu (DAMIRGI;

JOHNSON, 1966; PEREIRA; NEVES; DROZDOWICZ, 1999) ou não na nodulação e crescimento da planta (FERNANDEZ; CORDEIRO, 1997).

Como os microrganismos do solo atuam em vários processos ecossistêmicos que sustentam a produção e a sustentabilidade, o estudo das respostas das comunidades microbianas à inoculação de um dos grupos vem sendo aferido, assunto que esteve em voga nos últimos dez anos como mostrado anteriormente.

A inoculação com cepas de rizóbios em feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) potencializa as comunidades, fora da rizosfera, de *Alpha* e *Gammaproteobacteria*, junto com *Firmicutes* e *Actinobacteria* (TRABELSI et al., 2011, 2012), enquanto que a correção do solo com *Rhizobium* sp e compostos inorgânicos aumenta significativamente as populações de fungos, bactérias e actinobactérias (ANSARI; MAHMOOD, 2017).

Foi elaborada uma tabela informativa contendo as culturas e os benefícios encontrados pelo uso desses dois grupos (TABELA 1). Dos onze trabalhos encontrados sobre a interação positiva entre os grupos cinco (45%) são relacionados a cultura da soja (*Glycine max* L. (Merr)), uma das culturas mais plantadas, com uma produção mundial anual de 334,81 milhões de toneladas (CONAB, 2018).

O primeiro artigo encontrado, buscando a facilitação entre os grupos, relata a previsão de que microrganismos produtores de antibiótico, que não afetassem as cepas *Rhizobium meliloti* e *Bradyrhizobium japonicum*, melhoram a competição através da inibição de bactérias presentes no solo. (LI; ALEXANDER, 1988). O artigo mais atual expõe um aumento no número de sementes por planta, peso da semente por parcela e peso da semente por hectare em soja (ZAINUDDIN; SYAM'UN; DACHLAN, 2019).

Tabela 1: Artigos publicados que estudaram os benefícios da inoculação conjunta de actinobactérias e bactérias diazotróficas nodulíferas.

Cultura	Microrganismos	Benefícios	Autores
<i>Lotus tenuis</i>	<i>Mesorhizobium loti</i> + <i>Streptomyces</i> MM40, <i>Actinoplanes</i> ME3, <i>Micromonospora</i> MM18	Aumento na biomassa vegetal e nodulação	Solans et al., 2015
<i>Medicago sativa</i>	<i>Streptomyces</i> MM40 (S), <i>Actinoplanes</i> ME3 (A), <i>Micromonospora</i> MM18 (M) + <i>Sinorhizobium meliloti</i> 2011; <i>Streptomyces</i> sp. EN23, LuP30 e LuP47B + <i>Sinorhizobium meliloti</i> RRI 128; <i>Streptomyces griseus</i> + <i>Rhizobium meliloti</i> 102F85	Estimula a nodulação, o crescimento da planta e a fixação de N <sub>2</sub>	Solans et al., 2009; Le et al., 2015; Li e Alexander, 1988
<i>Glycine max</i> (L.) Merrill	<i>Rhizobium</i> spp + <i>Actinomycetes</i> spp; <i>Streptomyces griseus</i> + <i>Bradyrhizobium japonicum</i> 138-SE10; <i>Nocardia alba</i> , <i>N. rubra</i> , <i>Actinomadura glauciflava</i> + <i>Bradyrhizobium japonicum</i> ; <i>Streptomyces kanamyceticus</i> + <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Estimula a nodulação, o crescimento da planta e a fixação de N <sub>2</sub> , Aumento do número de nódulos por planta, a eficácia dos nódulos, aumento da atividade de redução do acetileno, aumento dos níveis de nutrientes, aumento do peso da semente por parcela e peso da semente/ha e o número de vagens por planta	Zaimuddin et al 2019; Sahur et al., 2018, Li e Alexander, 1988; Nimnoi et al., 2014; Gregor et al., 2013
<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium</i> leg. bv. phaseoli + <i>Azotobacter chroococcum</i> + <i>Streptomyces</i> sp	Aumento na comunidade de fungos e na atividade de desidrogenase	Jarak et al., 2012
<i>Cicer arietinum</i> L	<i>Streptomyces</i> sp + <i>Mesorhizobium ciceri</i> Kaiuroo 3 e WSM 1666	Atividade antimicrobiana contra <i>Phytophthora medicaginis</i>	Misk e Franco, 2011

Fonte: elaborada pela autora

Existe um amplo interesse econômico em bactérias diazotróficas devido a sua capacidade de substituir a adubação nitrogenada em alimentos essenciais para as necessidades nutricionais de humanos e animais, mobilizando esforços com o objetivo de aumentar a produtividade agrícola com o uso de uma tecnologia ecologicamente correta e de baixo custo. Uma das formas de aumentar a eficácia da fixação biológica de nitrogênio é através do consórcio microbiano com actinobactérias, amplamente distribuídas em ecossistemas terrestres, que contribuem para a ciclagem de nutrientes do solo. A bibliometria permitiu a revisão envolvendo esses dois grupos, através de uma rigorosa e extensa seleção até o momento inédita, mostrando que existe um efeito sinérgico da inoculação conjunta de actinobactérias em simbiose com bactérias diazotróficas, proporcionando um estímulo à nodulação, aumento no peso das plantas e da produtividade além da supressão de fitopatógenos.

## 1.4 Conclusão

A bibliometria é uma ferramenta importante para o conhecimento do “Estado da Arte” e nesse trabalho foi notório o aumento no número de publicações envolvendo actinobactérias e rizóbios e um interesse crescente em pesquisas mundiais na composição das comunidades microbianas presentes nos ambientes, além de um avanço rápido entre as técnicas relacionadas

a biotecnologia. Constatou-se que a interação entre cepas de actinobactérias e rizóbios, inicialmente relatadas somente como competição, não refletiam outras interações como a facilitação.

O benefício da inoculação conjunta é relevante, porém um cuidadoso critério de seleção para que não ocorra uma inibição das cepas de rizóbios é imperativo, ou seja, o estudo *in vitro* de cepas de rizóbios resistentes a antibióticos e cepas de actinobactérias que não obstaculize a simbiose. Entre as os serviços ecossistêmicos dessa facilitação para as plantas estão a defesa contra fitopatógenos, aumento na biomassa vegetal e nodulação das plantas.

### REFERÊNCIAS

- ABRAMO, Giovanni; D'ANGELO, Ciriaco Andrea. How do you define and measure research productivity?. **Scientometrics**, v. 101, p. 1129-1144, 2014.
- ANSARI, Rizwan Ali; MAHMOOD, Irshad. Optimization of organic and bio-organic fertilizers on soil properties and growth of pigeon pea. **Scientia Horticulturae**, v. 226, p. 1-9, 2017.
- ARIA, Massimo; CUCCURULLO, Corrado. bibliometrix: An R-tool for comprehensive science mapping analysis. **Journal of informetrics**, v. 11, n. 4, p. 959-975, 2017.
- BARKA, Essaid Ait et al. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 80, n. 1, p. 1-43, 2016.
- BARRION, M.; HABTE, M. Interaction of Bradyrhizobium sp. with an antagonistic actinomycete in culture medium and in soil. **Biology and fertility of soils**, v. 6, p. 306-310, 1988.
- BILYK, Oksana; LUZHETSKYY, Andriy. Metabolic engineering of natural product biosynthesis in actinobacteria. **Current opinion in biotechnology**, v. 42, p. 98-107, 2016.
- BORNMANN, Lutz; MUTZ, Rüdiger. Growth rates of modern science: A bibliometric analysis based on the number of publications and cited references. **Journal of the association for information science and technology**, v. 66, n. 11, p. 2215-2222, 2015.
- BOUCHEZ, Théodore et al. Molecular microbiology methods for environmental diagnosis. **Environmental Chemistry Letters**, v. 14, p. 423-441, 2016.
- CHELIUS, M. K.; TRIPLETT, E. W. The Diversity of Archaea and Bacteria in Association with the Roots of *Zea mays* L. **Microbial ecology**, p. 252-263, 2001.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO CONAB. Acompanhamento da safra brasileira: grãos, v. 5 - safra 2017/18- n. 6 - sexto levantamento, março 2018. Disponível em: [www.conab.gov.br](http://www.conab.gov.br) Acesso em: 15 de mar. 2020.

DAMIRGI, Salih M.; JOHNSON, Herbert W. Effect of Soil Actinomycetes on Strains of *Rhizobium japonicum* 1. **Agronomy Journal**, v. 58, n. 2, p. 223-224, 1966.

DATTA, Abhinav et al. An effective and beneficial plant growth promoting soil bacterium “*Rhizobium*”: a review. **Ann Plant Sci**, v. 4, n. 1, p. 933-942, 2015.

DE SOUSA, Juliani Barbosa et al. In Vitro Coinoculation Between Actinobacteria and Diazotrophic Nodulating Bacteria from the Semiarid. **Revista de Gestão Social e Ambiental**, v. 17, n. 9, p. e04127-e04127, 2023.

FERNANDES, Maria Josefa; CORDEIRO, Lázara. Efeito da inoculação conjunta de rizóbio e microrganismos antagonísticos a rizóbio na nodulação e desenvolvimento de *neonotonia wightii* lackley. **Boletim de Indústria Animal**, v. 54, n. 2, p. 39-44, 1997.

FERNANDEZ-REAL, José-Manuel et al. Gut microbiota interacts with brain microstructure and function. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 100, n. 12, p. 4505-4513, 2015.

FUENTES, María S. et al. Selection of an actinobacteria mixed culture for chlordane remediation. Pesticide effects on microbial morphology and bioemulsifier production. **Journal of Basic microbiology**, v. 56, n. 2, p. 127-137, 2016.

FYANS, Joanna K.; BOWN, Luke; BIGNELL, Dawn RD. Isolation and characterization of plant-pathogenic *Streptomyces* species associated with common scab-infected potato tubers in Newfoundland. **Phytopathology**, v. 106, n. 2, p. 123-131, 2016.

GAGE, Daniel J. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 68, n. 2, p. 280-300, 2004.

GLYAN’KO, A. K. Signaling systems of rhizobia (*Rhizobiaceae*) and leguminous plants (*Fabaceae*) upon the formation of a legume-rhizobium symbiosis. **Applied biochemistry and microbiology**, v. 51, p. 494-504, 2015.

GOMES, Karen Machado; DUARTE, Rafael Silva; DE FREIRE BASTOS, Maria do Carmo. Lantibiotics produced by Actinobacteria and their potential applications (a review). **Microbiology**, v. 163, n. 2, p. 109-121, 2017.

GREENACRE, Michael. **Correspondence analysis in practice**. CRC press, 2017.

GREGOR, A. K.; KLUBEK, Brian; VARSA, E. C. Identification and use of actinomycetes for enhanced nodulation of soybean co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum*. **Canadian journal of microbiology**, v. 49, n. 8, p. 483-491, 2003.

JARAK, Mirjana et al. Plant growth-promoting rhizobacteria in bean production. **Acta Horticulturae**, n. 960, p. 409, 2012.

- JU, Wenliang et al. Co-inoculation effect of plant-growth-promoting rhizobacteria and rhizobium on EDDS assisted phytoremediation of Cu contaminated soils. **Chemosphere**, v. 254, p. 126724, 2020.
- KAMIL, Fatima H. et al. Biological control of mango dieback disease caused by *Lasiodiplodia theobromae* using streptomycete and non-streptomycete actinobacteria in the United Arab Emirates. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 829, 2018.
- KELLENBERGER, Eduard. Exploring the unknown. **EMBO reports**, v. 2, n. 1, p. 5-7, 2001.
- LE, Xuyen H.; BALLARD, Ross A.; FRANCO, Christopher MM. Effects of endophytic *Streptomyces* and mineral nitrogen on Lucerne (*Medicago sativa* L.) growth and its symbiosis with rhizobia. **Plant and Soil**, v. 405, p. 25-34, 2016.
- LEWIN, Gina R. et al. Evolution and ecology of Actinobacteria and their bioenergy applications. **Annual review of microbiology**, v. 70, p. 235-254, 2016.
- LI, De-Ming; ALEXANDER, Martin. Co-inoculation with antibiotic-producing bacteria to increase colonization and nodulation by rhizobia. **Plant and Soil**, v. 108, p. 211-219, 1988.
- LIMA, José Vinícius Leite et al. Characterization of actinobacteria from the semiarid region, and their antagonistic effect on strains of rhizobia. **African journal of biotechnology**, v. 16, n. 11, p. 499-507, 2017.
- LINDSTRÖM, Kristina; AMSALU ASERSE, Aregu; MOUSAVI, Seyed Abdollah. Evolution and taxonomy of nitrogen-fixing organisms with emphasis on rhizobia. **Biological nitrogen fixation**, p. 21-38, 2015.
- MANIVASAGAN, Panchanathan et al. Actinobacteria mediated synthesis of nanoparticles and their biological properties: A review. **Critical reviews in microbiology**, v. 42, n. 2, p. 209-221, 2016.
- MARKMANN, Katharina; GICZEY, Gábor; PARNISKE, Martin. Functional adaptation of a plant receptor-kinase paved the way for the evolution of intracellular root symbioses with bacteria. **PLoS biology**, v. 6, n. 3, p. e68, 2008.
- MEHTA, Harish Kumar et al. Influence of Biofertilizers, Vermicompost and Chemical Fertilizers on Growth, Nodulation, Nutrient Uptake, Seed Yield and Economics of Black Gram. 2015.
- MINGMA, Ratchanee et al. Isolation of rhizospheric and roots endophytic actinomycetes from Leguminosae plant and their activities to inhibit soybean pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. *glycine*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 271-280, 2014.
- MISK, Azza; FRANCO, Christopher. Biocontrol of chickpea root rot using endophytic actinobacteria. **BioControl**, v. 56, p. 811-822, 2011.

NIMNOI, Pongrawee; PONGSILP, Neelawan; LUMYONG, Saisamorn. Co-inoculation of soybean (*Glycine max*) with actinomycetes and *Bradyrhizobium japonicum* enhances plant growth, nitrogenase activity and plant nutrition. **Journal of Plant Nutrition**, v. 37, n. 3, p. 432-446, 2014.

NITHYA, B.; PONMURUGAN, P. Studies on actinomycetes diversity in Eastern Ghats (Yercaud Hills) of Southern India for secondary metabolite production. **Int J Agric Res**, v. 7, n. 3, p. 152-159, 2012.

PARMAR, Nagina; DUFRESNE, Jaimie. Beneficial interactions of plant growth promoting rhizosphere microorganisms. **Bioaugmentation, biostimulation and biocontrol**, p. 27-42, 2011.

PATEL, J. J. Antagonism of actinomycetes against rhizobia. **Plant and Soil**, v. 41, p. 395-402, 1974.

PEREIRA, João Carlos; NEVES, Maria Cristina Prata; DROZDOWICZ, Adam. Influência da antibiose exercida por actinomicetos às estirpes de *Bradyrhizobium* spp., na nodulação da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, p. 99-108, 1999.

PUGASHETTI, B. K.; ANGLE, J. S.; WAGNER, G. H. Soil microorganisms antagonistic towards *Rhizobium japonicum*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 14, n. 1, p. 45-49, 1982.

QIN, Sheng et al. Actinobacteria in special and extreme habitats: Diversity, function roles, and environmental adaptations. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1415, 2016.

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

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

RL, Raghunatha Reddy et al. Review of trends in soil fertility research (2007–2016) using Scopus database. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 50, n. 8, p. 1063-1080, 2019.

RUIU, Luca. Insect pathogenic bacteria in integrated pest management. **Insects**, v. 6, n. 2, p. 352-367, 2015.

SAHUR, Asmiaty et al. Effect of Seed Inoculation with Actinomycetes and *Rhizobium* Isolated from Indigenous Soybean and Rhizosphere on Nitrogen Fixation, Growth, and Yield of Soybean. **International Journal of Agronomy**, 2018.

SCOTT, Jarrod J. et al. Microbial community structure of leaf-cutter ant fungus gardens and refuse dumps. **PloS one**, v. 5, n. 3, p. e9922, 2010.

SILVA, Valéria Maria Araujo et al. Cross-feeding among soil bacterial populations: selection and characterization of potential bio-inoculants. **Journal of Agricultural Science**, v. 11, n. 5, p. 23, 2019.

SOLANS, Mariana; RUIZ, Oscar A.; WALL, Luis G. Effect of actinobacteria on *Lotus tenuis*–*Mesorhizobium loti* symbiosis: preliminary study. **Symbiosis**, v. 65, n. 1, p. 33-37, 2015.

SOLANS, Mariana; VOBIS, Gernot; WALL, Luis Gabriel. Saprophytic actinomycetes promote nodulation in *Medicago sativa*-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis in the presence of high N. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 28, p. 106-114, 2009.

SULTAN, M. Zakir et al. In vitro antibacterial activity of an active metabolite isolated from *Streptomyces* species. **Biotechnology Research**, v. 1, n. 2, p. 100-106, 2002.

TANG, Li; SHAPIRA, Philip; YOUTIE, Jan. Is there a clubbing effect underlying Chinese research citation Increases?. **Journal of the Association for Information Science and Technology**, v. 66, n. 9, p. 1923-1932, 2015.

TESEO, Serafino et al. The scent of symbiosis: gut bacteria may affect social interactions in leaf-cutting ants. **Animal Behaviour**, v. 150, p. 239-254, 2019.

TRABELSI, Darine et al. Appraisal of the crop-rotation effect of rhizobial inoculation on potato cropping systems in relation to soil bacterial communities. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 54, p. 1-6, 2012.

TRABELSI, Darine et al. Microbial inoculants and their impact on soil microbial communities: a review. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

TRINICK, M. J.; PARKER, C. A.; PALMER, M. J. Interactions of the microflora from nodulation problem and non-problem soils towards *Rhizobium* spp on agar culture. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 15, n. 3, p. 295-301, 1983.

VAN NOORDEN, Richard; MAHER, Brendan; NUZZO, Regina. The top 100 papers. **Nature News**, v. 514, n. 7524, p. 550, 2014.

VAN SCHREVEN, D. A. The effect of some actinomycetes on rhizobia and *Agrobacterium radiobacter*. **Plant and Soil**, v. 21, p. 283-302, 1964.

VIEIRA, R. F. Diversidade e taxonomia de rizóbios. In: SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S., **Microbiota do solo e qualidade ambiental**, 1ª ed. Campinas: Instituto Agrônômico, 2007. p.165-190.

VINOTHINI, Gopal et al. Cell aggregating temperament and biopotency of cultivable indigenous actinobacterial community profile in chicken (*Gallus gallus domesticus*) gut system. **Arabian Journal for Science and Engineering**, v. 43, p. 3429-3442, 2018.

WANG, Mingze et al. Global trends in soil monitoring research from 1999–2013: A bibliometric analysis. **Acta Agriculturae Scandinavica, Section B—Soil & Plant Science**, v. 65, n. 6, p. 483-495, 2015.

ZAINUDDIN, D. U.; SYAM'UN, E.; DACHLAN, A. Production of soybean in the application of Rhizobium spp. and Actinomycetes spp. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, 2019. p. 012251.

ZANJIRCHI, Seyed Mahmoud; REZAEIAN ABRISHAMI, Mina; JALILIAN, Negar. Four decades of fuzzy sets theory in operations management: application of life-cycle, bibliometrics and content analysis. **Scientometrics**, v. 119, p. 1289-1309, 2019.

ZHANG, Liang et al. A review of published wetland research, 1991–2008: ecological engineering and ecosystem restoration. **Ecological Engineering**, v. 36, n. 8, p. 973-980, 2010.

## 2 CO-INOCULAÇÃO ENTRE ACTINOBACTÉRIAS E BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS NODULÍFERAS DO SEMIÁRIDO *IN VITRO* PONTOS CHAVE:

- O solo do semiárido brasileiro é uma fonte de diversidade de actinobactérias e rizóbios.
- A diversidade de gêneros encontradas não apresentou diferença entre as áreas.
- Os microrganismos apresentaram capacidade de produzir enzimas.
- Actinobactérias e rizóbios apresentaram capacidade de facilitação *in vitro*

### RESUMO

Os microrganismos presentes nos sistemas agrícolas desempenham importante papel, auxiliando no aumento de produção e reduzindo o uso de fertilizantes químicos, pesticidas e herbicidas. Entre esses grupos microbianos ativos destacam-se as actinobactérias por sua importância ecológica e capacidade de produzir uma infinidade de moléculas bioativas com extensivas aplicações, e os rizóbios reconhecidos por seu papel na Fixação Biológica de Nitrogênio. Além dos papéis individuais é importante entender as inter-relações estabelecidas entre eles no ambiente e os efeitos do manuseio sobre sua diversidade. Essa pesquisa buscou comparar a capacidade de actinobactérias, isoladas de solos semiáridos em diferentes condições de antropização, de estabelecer inter-relações positivas com bactérias diazotróficas nodulíferas. Foram avaliadas cepas de actinobactérias isoladas de amostras de solo provenientes da Fazenda Não Me Deixes (Quixadá, Ceará) e rizóbios nativos do solo da região semiárida brasileira. Entre as actinobactérias, os gêneros mais frequentemente identificados foram *Streptomyces*, *Nocardia*, *Micromonospora*, *Streptosporangium* e *Actinomadura*. Perfis enzimáticos foram pesquisados, a maioria apresentou atividade amilolítica (47), seguida por atividade xilanolítica (37) e celulolítica (32). Dezoito cepas de rizóbio pertencem ao gênero *Bradyrhizobium* e uma foi identificada como *Rhizobium tropici*. Oito cepas de rizóbios apresentaram produção de amilase. Houve aumento da produção de amilase e de celulase pelas cepas em função da elevação da temperatura, enquanto que a produção de xilanase apresentou declínio. Duas cepas, QX 59 e QX 67, identificadas como *Streptomyces*, provenientes da área antropizada, apresentaram alta capacidade de facilitação quando inoculadas *in vitro* conjuntamente com rizóbios, mostrando o potencial das cepas como bioinoculantes.

**Palavras-chaves:** amilase, celulase, xilanase, atividade enzimática, *Streptomyces*.

## ABSTRACT

Microorganisms present in agricultural systems play an important role, assisting in increasing production and reducing the use of chemical fertilizers, pesticides and herbicides. Among these active microbial groups are actinobacteria for their ecological importance and ability to produce a multitude of bioactive molecules with extensive applications, and rhizobium recognized for their role in Biological Nitrogen Fixation. In addition to individual roles, it is important to understand the interrelationships established between them in the environment and the effects of handling on their diversity. This research aimed to compare the ability of actinobacteria, isolated from semi-arid soils under different anthropization conditions, to establish positive interrelationships with diazotrophic bacteria. Strains of actinobacteria isolated from soil samples from Fazenda Não Me Deixes (Quixadá, Ceará) and rhizobium native to the soil of the Brazilian semiarid region were evaluated. Among the actinobacteria, the most frequently identified gender was *Streptomyces*, *Nocardia*, *Micromonospora*, *Streptosporangium* and *Actinomadura*. Enzymatic profiles were researched, most presented amylolytic activity (47), followed by xylanolytic activity (37) and cellulolytic (32). Eighteen rhizobium strains belong to the genus *Bradyrhizobium* and one has been identified as *Rhizobium tropici*. Eight rhizobium strains showed amylose. There was an increase in the production of amylose and cellulase by the strains due to the increase in temperature, while xylanase production declined. Two strains, QX 59 and QX 67, identified as *Streptomyces*, from the anthropized area, showed high facilitation capacity when inoculated in vitro together with rhizobium, showing the potential of the strains as bioinoculants.

**Keywords:** Amylase. Cellulase. Xylanase. Enzymatic activity. *Streptomyces*.

### 2.1 Introdução

Os microrganismos presentes nos sistemas agrícolas desempenham um importante papel, auxiliando no aumento da produção e reduzindo o uso de fertilizantes químicos, pesticidas e herbicidas (PÉREZ-MONTAÑO *et al.*, 2014). Esses benefícios são possibilitados através da produção de fitormônios (MAHALAKSHMI; BHAGAWATI, 2017), produção de sideróforos

(KUMAR *et al.*, 2018), solubilização de fósforo (SAEID; PROCHOWNIK; DOBROWOLSKA-IWANIEK, 2018) e fixação de nitrogênio (PINHEIRO *et al.*, 2019).

Microrganismos podem ser afetados pelo uso e características do solo, as plantas presentes e fatores ambientais, tais como temperatura, umidade e disponibilidade de nutrientes, modificando a composição, interação e produção enzimática da assembléia microbiana (CHANG *et al.*, 2016; GARCIA-LEMONS *et al.*, 2020; HAN *et al.*, 2017; XU *et al.*, 2014). Em pesquisa realizada por Houfani *et al.* (2019) observou-se que solos florestais e de jardim apresentam maior diversidade microbiana, e atividade de endocelulose mais elevada, assim como maior potencial de decomposição de lignocelulose, quando comparado com solos agrícolas e desérticos. Entre esses microrganismos destacaram-se as actinobactérias e os rizóbios.

As actinobactérias, além da diversidade e importância ecológica, possuem um potencial único devido ao metabolismo secundário e à capacidade de produzir moléculas bioativas com extensas aplicações médicas, industriais e agrícolas (LEWIN *et al.*, 2016), enquanto que os rizóbios são reconhecidos por sua capacidade em produzir diversas enzimas, que permitem a utilização de diferentes substratos (MENÉNDEZ *et al.*, 2016).

As bactérias diazotróficas se apresentam na forma de bacilos, aeróbias, móveis, Gramnegativas e podem ser encontradas tanto na forma livre como associada com leguminosas. São extensamente relatados os benefícios que os rizóbios podem trazer para a agricultura, como o suprimento de nitrogênio pela fixação simbiótica de N<sub>2</sub>, que é a fonte mais importante de nitrogênio nos agroecossistemas por ser renovável e ambientalmente sustentável (ZHENG *et al.*, 2019). Alguns mecanismos auxiliam nessa simbiose, e está relatada a importância da enzima de degradação da parede celular, celulase, no processo de infecção primária e sua importância na infecção simbiótica secundária e na regulação rigorosa de sua produção para estabelecer uma simbiose eficaz (ROBLEDO *et al.*, 2015).

As actinobactérias são bactérias Gram-positivas, filamentosas, encontradas abundantemente no solo, podem interagir com as plantas através da fixação de nitrogênio, da produção de hormônio e da proteção contra infecção (LE *et al.*, 2016; PASSARI *et al.*, 2015; SINGH; GAUR, 2016) e, além disso, a capacidade de degradação das actinobactérias é importante para o ciclo de carbono e para a formação de húmus no ambiente o que aumenta o

potencial de nutrição do solo para o crescimento das plantas (CARVALHO *et al.*, 2017). Elas também participam ativamente da degradação da lignocelulose natural, como resultado de sua capacidade de sintetizar hidrolases poliméricas extracelulares, como celulases, hemicelulases, xilanases, quitinases, pectinases, amilases, peptidases, proteases e queratinases (DAS; SOLANKI; KHANNA, 2014; SAINI; AGGARWAL; YADAV, 2016).

A celulose é o polímero orgânico mais abundante na terra, presente nas paredes celulares das plantas, é principalmente encontrado em combinação com hemicelulose e xilana. A degradação da celulose é um serviço ecossistêmico essencial e tem um valor chave para compreensão da quebra da celulose no ciclo do carbono. Para ocorrer uma degradação eficiente da celulose é necessária uma grande diversidade de enzimas celulolíticas (DE VRIES *et al.*, 2015).

A inoculação conjunta de actinobactérias, rizóbios e rizobactérias promotoras de crescimento de plantas resulta em aumento na absorção de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K), melhorando o rendimento da soja e a qualidade do solo (AMULE *et al.*, 2018), enquanto que a simbiose entre *Bradyrhizobium* e *Streptomyces griseoflavus* promove aumentos significativos no crescimento das plantas, nodulação, fixação de nitrogênio, absorção de nitrogênio, fósforo e potássio e na produção de sementes em feijão mungo (*Vigna radiata*) e soja (*Glycine max* L.) (HTWE *et al.*, 2019).

Essa pesquisa testará a hipótese de que actinobactérias provenientes do semiárido possuem a capacidade de atuar na facilitação *in vitro* de bactérias diazotróficas nodulíferas provenientes do mesmo bioma. O objetivo foi comparar a capacidade de actinobactérias, isoladas de solos semiáridos em diferentes condições de antropização, de estabelecer interações positivas com bactérias diazotróficas nodulíferas. Os resultados obtidos contribuirão para esclarecer interações positivas que ocorrem na comunidade edáfica, assim como destacam o potencial do uso conjunto de cepas de actinobactérias e rizóbios como futuros bioinoculantes.

## 2.2 Material e Métodos

### 2.2.1. Local

As cepas de actinobactérias foram isoladas do solo oriundo da Fazenda Não Me Deixes, localizada no município de Quixadá, Ceará -BR. A localização geográfica é próxima de 4°49'34'' S e 38° 58'9'' W e 210 m de altitude. O clima do município de Quixadá é identificado como Tropical Quente Semiárido (BSh, de acordo com Köppen-Geiger Climate Classification), com pluviosidade média de 717.5 mm, centralizada no período de fevereiro a abril, e temperatura média de 26.6°C (FUNCEME, 2017). O solo da fazenda é classificado como Argissolo (SANTOS, 2018) equivalente ao Lixisol (IUSS WORKING GROUP WRB, 2014). A amostragem de solo foi realizada em duas áreas da fazenda, uma área antropizada em pousio e uma área conservada, pertencente a Reserva Particular de Patrimônio Permanente (RPPN) reconhecida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA).

As cepas de rizóbios são provenientes de amostras de solos próximas dos pontos indicados de Quixadá (4°58'S a 39°1'W) e Cascavel (4°7'S a 38°14'W), no Ceará - BR, e no Rio Grande do Norte- BR, nos municípios Jardim de Angicos (5°39'S a 35°58'W) e Santana do Mato (5°57'S a 36°39'W) (PINHEIRO *et al.*, 2015).

### 2.2.2. Microrganismos

As cepas de actinobactérias foram isoladas do solo através da técnica *spread plate*, utilizando o meio caseína dextrose ágar (CDA) (CLARK, 1965). As cepas de rizóbio foram isoladas usando feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] como planta isca e após esse período os nódulos obtidos foram macerados no meio Ágar extrato de levedura manitol (YMA) (VINCENT, 1970). Os isolados obtidos foram autenticados através do plantio e inoculação do feijão-caupi. As 50 cepas de actinobactérias, 22 provenientes da área antropizada e 28 da área conservada, e 19 cepas de rizóbios estão depositadas na Coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Ambiental do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará (UFC).

### **2.2.3. Análise química do solo**

A análise química do solo foi realizada de acordo com Teixeira *et al.* (2017). Os atributos do solo avaliados foram pH, que foi medido em H<sub>2</sub>O (1:2,5) por potenciometria; acidez potencial (H<sup>+</sup>Al), que foi extraída com acetato de cálcio tamponado a pH 7,0 e determinada por titulometria; Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>, que foram extraídos com solução de KCl 1M e determinados por espectrometria de absorção atômica; alumínio trocável (Al<sup>3+</sup>), que foi extraído com solução KCl 1M e determinado por titulometria. Fósforo (P), sódio (Na<sup>+</sup>) e potássio (K<sup>+</sup>) foram extraídos com solução Mehlich 1, com o P determinado por colorimetria e o K<sup>+</sup> e Na<sup>+</sup> por fotometria de chama

### **2.2.4. Caracterização cultural**

A caracterização cromogênica das actinobactérias foi realizada observando-se os micélios aéreo e reverso após o crescimento das cepas em placas de Petri, segundo Wink (2012), com o uso da cartela de cores RAL, e a classificação das colônias de acordo com Augustine *et al.*, (2013), em aveludada, concêntrica, radial, umbonada e convexa. A caracterização micromorfológica foi realizada por meio do microcultivo segundo Kern; Blevins (1999), com modificações. A cultura foi inoculada em um lado de um cubo de meio CDA contido em uma lâmina e coberto por uma lamínula, junto com algodão umedecido e em seguida incubada por 14 dias a 28°C, após esse período a lamínula foi realocada em uma nova lâmina, corada com azul de algodão e observada sob um microscópio de luz Zeiss a uma ampliação de 1000.

A caracterização das cepas de rizóbios foi analisada através das variáveis culturais (modificação do pH do meio, tempo de crescimento, produção de muco, cor da colônia), e fisiológicas como tolerância a altas temperaturas (39, 41, 43 e 45°C), tolerância a NaCl (1, 2, 2.5, 3, 10 e 20 g L<sup>-1</sup>) e pH (4 e 10) sendo testados no meio YMA. Também foi avaliada a resistência aos antibióticos Amicacina (AMI 30), Amoxicilina (AMC 30), Ampicilina (AMP10), Aztreonam (ATM 30), Cefalotina (CFL 30), Cefepime (CPM 30), Cefoxitina (CFO 30), Ceftadizime (CAZ 30), Ceftriaxone (CRO 30), Ciprofloxacino (CIP 05), Cloranfenicol (CLO 30), Gentamicina (GEN 10), Piperacilina (PIT 110) e Tetraciclina (TET 30) (MUELLER *et al.*, 1988), produção de amilase (ALARIYA *et al.*, 2013), xilanase (KUMAR *et al.*, 2012) e celulase (COURI; FARIAS, 1995) e solubilização de fosfato (NAUTIYAL, 1999). Foram utilizadas como

referências as cepas padrão BR 3486 (*Paraburkholderia phymatum*), INPA 03-11B-*Bradyrhizobium* sp. (BR 3301), BR 3302 (*Bradyrhizobium viridifuturi*), BR 3267 (*Bradyrhizobium yuanmingense*), BR 3262 (*Bradyrhizobium pachyrhizi*), BR 2003 (*Bradyrhizobium elkanii*) e BR 2801 (*Bradyrhizobium elkanii*).

Todas as etapas foram identificadas utilizando o sequenciamento de genes 16S rRNA (SILVA, 2020).

### **2.2.5. Perfil enzimático**

Foi avaliada a produção de amilase (ALARIYA *et al.*, 2013), xilanase (KUMAR *et al.*, 2012) e celulase (COURI; FARIAS, 1995), onde observou-se a degradação dos compostos: amido, xilana e celulose contidas no meio. As cepas de actinobactérias foram incubadas nas temperaturas de 28°, 39°, 41°, 43° e 45 °C para determinar o efeito da temperatura na atividade enzimática.

O índice enzimático (IE) foi calculado utilizando a equação:  $IE = \text{Diâmetro em mm do halo de hidrólise} / \text{Diâmetro em mm do halo da colônia}$  (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1977).

### **2.2.6. Facilitação *in vitro***

As cepas de actinobactérias e rizóbios foram inoculadas separadamente em meio de cultura contendo carboximetilcelulose como única fonte de carbono e energia (COURI; FARIAS, 1995). A presença de zonas de hidrólise ao redor das colônias foi registrada como uma resposta positiva (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1977). Cada experimento foi realizado de forma independente. As cepas de actinobactérias que apresentaram um índice enzimático estatisticamente distinto juntamente com as cepas de rizóbios não-celulolíticas foram selecionados para o teste de facilitação.

As cepas de actinobactérias foram inoculadas separadamente em ágar carboximetilcelulose em “spots” e incubadas a 28 °C por 10 dias. Um mililitro de cultura de cada cepa de rizóbio previamente cultivado em meio (extrato de levedura-manitol) YM por sete dias, foi transferido para microtubos, centrifugado a 9659.52 g por 10 minutos e o precipitado ressuspenso duas vezes. Uma gota de cada cultura de rizóbio purificado foi distribuída em torno de cada colônia de actinobactéria a uma distância de 2 cm. Foi considerado resultado positivo

quando ocorreu o crescimento das colônias de rizóbio (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995).

O Índice de Compatibilidade foi calculado com o número de pares compatíveis detectados dividido por todos os pares possíveis:  $IC = n^{\circ} \text{ de pares compatíveis} / \text{todas as interações entre pares}$ .

### **2.2.7. Análise Estatística**

Todos os testes foram realizados em quadruplicata, com dois ensaios, totalizando oito repetições. Os dados qualitativos de caracterização das actinobactérias e rizóbios foram submetidos ao teste do Qui-quadrado. A normalidade dos dados foi avaliada utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade da variância através do teste de Levene, feitos para verificar os pressupostos dos testes estatísticos aplicados. Os índices enzimáticos foram submetidos a um teste T de Studart para dados não pareados para comparar os valores médios de cada área e a uma análise de variância para comparar as médias entre as enzimas e entre as cepas, utilizando o teste de Tukey como post hoc.

Os dados sobre os efeitos da temperatura na atividade enzimática foram avaliados através do Coeficiente de Correlação de Pearson. Foi estabelecido um intervalo de confiança de 95%. Para todos os testes realizados foi utilizado o programa SPSS (IBM Corp. Released 2011).

## **2.3 Resultados e Discussão**

### **2.3.1 Propriedades do solo**

O solo nas duas áreas apresentou pH baixo, classificando-os como solos fortemente ácidos, e uma capacidade de troca de cátions (T) baixa, a área antropizada se enquadra em baixa fertilidade e susceptível a desertificação (TABELA 2).

Em relação à fertilidade do solo, a área conservada possui maior concentração de nutrientes para as plantas e organismos, expressa por uma maior soma de bases (SB) e capacidade de troca de cátions (T), sua limitação está na acidez (maior H + Al). Mesmo possuindo maior fertilidade natural, o pH baixo pode diminuir a disponibilidade de nutrientes, causando a impressão da área antropizada ser mais fértil do que a natural, esse efeito se dá pela correção do pH e preparo do solo.

Tabela 2: Atributos químicos de solos, de duas áreas, oriundos da Fazenda Não Me Deixes, Quixadá, CE - região semiárida nordestina, Brasil.

EC	Áreas	pH (H <sub>2</sub> O)	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	SB	Al <sup>3+</sup>		T	V	P	N		Classe		
								H+	Al <sup>f</sup>				g/kg	g/kg			
							MO			-----%-----							
							-----cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> -----					mg.kg		dS/m		g/kg	
							textural										
	Conservada	4,5	2,4	0,6	0,33	0,12	3,45	0,1	7,4	10,9	31,8	8,98	2,64	0,68	11,17	Areia Franca	
	Antropizada	5,17	1,81	0,51	0,19	0	2,51	0	1,21	3,7	67,5	3,48	0,55	0,85	2,1	Areia Franca	

*Note.* SB = soma de bases; T = Capacidade de Troca de Cátions ao pH 7.0; V = Saturação de Bases.

Fonte: elaborada pela autora.

### 2.3.2 Caracterização

As 50 cepas selecionadas foram caracterizadas culturalmente através da cor do micélio aéreo e reverso, onde, nas duas áreas, ocorreu uma hegemonia das cores branco e cinza no micélio aéreo, enquanto no micélio reverso há uma primazia da cor amarela na área antropizada e cinza na área conservada. Nas duas áreas houve um domínio da textura radial e do gênero *Streptomyces* (TABELA 3). Não houve diferença significativa entre as cepas das duas áreas analisadas nas características morfologia ( $p = 0,307$ ), cor do micélio aéreo ( $p = 0,396$ ), cor do micélio reverso ( $p = 0,066$ ), textura ( $p = 0,907$ ) e gênero ( $p = 0,851$ ).

Tabela 3: Características morfológicas e identificação de gênero de actinobactérias.

Area	Actinobacteria	Morphology	Color		Strains texture	Genus
			Aerial mycelium	Reverse pigments		
Anthopized	QX1	Short straight spore chain	White	Yellow	Radial furrows	<i>Streptomyces</i>
	QX2	Short straight spore chain	Beige	Yellow	Concentric	<i>Streptomyces</i>
	QX3	Short straight spore chain	Brown	Yellow	Radial furrows	<i>Streptomyces</i>
	QX4	Short straight spore chain	Beige	Yellow	Radial furrows	<i>Streptomyces</i>
	QX5	Cocci	Brown	Brown	Concentric	<i>Micromonospora</i>
	QX7	Cocci and Bacilli	Brown	Yellow	Radial furrows	<i>Nocardia</i>
	QX9	Cocci	Cream	Grey	Radial furrows	<i>Nocardia</i>
	QX10	Flexuous spore chains	Yellow	Yellow	Radial furrows	<i>Streptomyces</i>
	QX12	Flexuous spore chains	Yellow	Yellow	Radial furrows	<i>Streptomyces</i>
	QX59	Short straight spore chain	Pink	Pink	Cottony	<i>Streptomyces</i>
	QX60	Spiral spore chain	Grey	Cream	Cottony	<i>Streptomyces</i>
	QX61	Spore wall	White	Yellow	Concentric	<i>Streptosporagium</i>
	QX62	Short straight spore chain	White	Cream	Cottony	<i>Streptomyces</i>
	QX63	Spiral spore chain	Brown	Brown	Radial furrows	<i>Streptomyces</i>
	QX64	Cocci	Grey	Grey	Cottony	<i>Micromonospora</i>
	QX65	Cocci	Grey	Yellow	Cottony	<i>Nocardia</i>
	QX67	Fasciated spore chain	Grey	Yellow	Umbonate	<i>Streptomyces</i>
	QX68	Spiral spore chain	Grey	Yellow	Radial furrows	<i>Streptomyces</i>
	QX70	Short straight spore chain	Grey	Yellow	Radial furrows	<i>Streptomyces</i>
	QX71	Bacilli	Grey	Grey	Concentric	<i>Nocardia</i>
	QX75	Bacilli	White	Yellow	Cottony	<i>Nocardia</i>
	QX76	Flexuous spore chains	White	Cream	Cottony	<i>Streptomyces</i>
	QX13	Flexuous spore chains	Grey	Yellow	Radial furrows	<i>Streptomyces</i>
	QX14	Flexuous spore chains	Brown	Cream	Cottony	<i>Streptomyces</i>
	QX15	Bacilli	White	White	Radial furrows	<i>Nocardia</i>
	QX16	Spiral spore chain	Grey	Grey	Concentric	<i>Streptomyces</i>

Conserved	QX17	Fasciated spore chain	Brown	Cream	Concentric	<i>Streptomyces</i>
	QX19	Short straight spore chain	Grey	Grey	Radial furrows	<i>Streptomyces</i>
	QX21	Cocci	Grey	Grey	Cottony	<i>Micromonospora</i>
	QX23	Short straight spore chain	Purple	Purple	Cottony	<i>Streptomyces</i>
	QX24	Coccobacilli	Orange	Brown	Radial furrows	<i>Nocardia</i>
	QX25	Short straight spore chain	Grey	Yellow	Radial furrows	<i>Streptomyces</i>
	QX27	Cocci	Brown	Yellow	Radial furrows	<i>Nocardia</i>
	QX28	Cocci	Grey	Beige	Radial furrows	<i>Nocardia</i>
	QX29	Coccobacilli	Grey	Grey	Concentric	<i>Nocardia</i>
	QX30	Fasciated spore chain	White	Yellow	Umbonate	<i>Streptomyces</i>
	QX31	Straight spore chain	Grey	Grey	Concentric	<i>Streptomyces</i>
	QX32	Fasciated spore chain	Grey	Grey	Cottony	<i>Streptomyces</i>
	QX33	Spore wall	Grey	Grey	Radial furrows	<i>Streptosporagium</i>
	QX47	Straight spore chain	Grey	Grey	Cottony	<i>Streptomyces</i>
	QX48	Fasciated spore chain	Cream	Cream	Cottony	<i>Streptomyces</i>
	QX49	Flexuous spore chains	Grey	Grey	Radial furrows	<i>Streptomyces</i>
	QX50	Bacilli	White	Cream	Cottony	<i>Nocardia</i>
	QX52	Straight spore chain	Yellow	Grey	Umbonate	<i>Actinomadura</i>
	QX53	Cocci	Grey	Grey	Concentric	<i>Micromonospora</i>
	QX54	Fasciated spore chain	White	Cream	Radial furrows	<i>Streptomyces</i>
	QX55	Short straight spore chain	Grey	Yellow	Radial furrows	<i>Streptomyces</i>
	QX56	Spore wall	White	Pink	Cottony	<i>Streptosporagium</i>
	QX57	Cocci	Grey	Beige	Concentric	<i>Nocardia</i>
	QX58	Bacilli	Grey	Grey	Concentric	<i>Nocardia</i>

Fonte: elaborada pela autora.

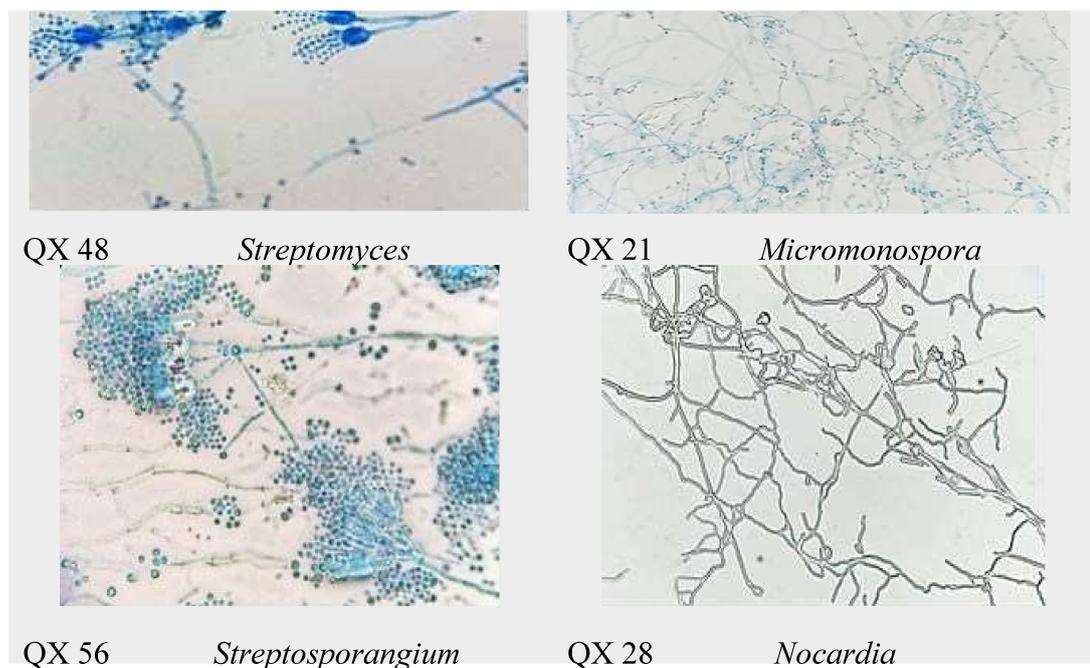
A formação de todos os tipos de hifas aéreas de actinobactérias depende das características da espécie, das condições nutricionais ou do fator ambiental (JIANG *et al.*, 2016), por isso existe essa diferença na expressão de cores entre as áreas, porém a cromogênese não é suficiente para a classificação das espécies, sendo necessário adicionar parâmetros como

morfologia da cadeia de esporos, forma do esporo e da colônia, que são basilares para a taxonomia dos gêneros (WILLIAMS; DAVIES, 1967; THAMPI; BHAI, 2017).

Os resultados encontrados coincidem com aqueles esperados para ambientes áridos, como os observados no deserto no planalto do Tibete por DING *et al.* (2013), onde as cepas estudadas apresentaram cores branco, cinza, amarelo e marrom, com predominância dos gêneros *Streptomyces*, *Micromonospora* e *Streptosporangium*, enquanto que em solos do semiárido brasileiro há relatos da presença dos gêneros *Streptomyces* e *Nocardia* (SILVA *et al.*, 2019).

A identificação dos gêneros ocorreu através da micromorfologia (FIGURA 9), onde a observação da cadeia de esporos permitiu identificar cinco gêneros diferentes, *Streptomyces* (58%), *Nocardia* (26%), *Micromonospora* (8%), *Streptosporangium* (6%) e *Actinomadura* (2%).

Figura 9: Cadeias de esporos e identificação de gênero.

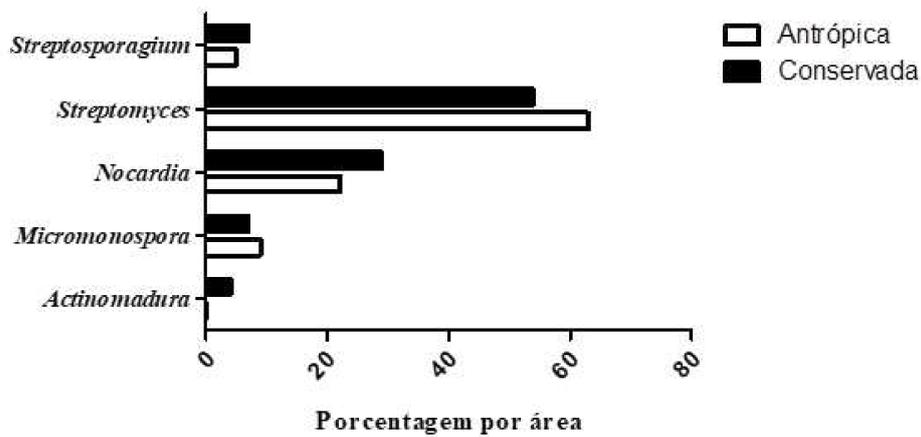


Fonte: elaborada pela autora.

*Streptomyces* é o gênero mais abundante das actinobactérias, frequentemente relatado em solos, inclusive em regiões semiáridas (LIMA *et al.*, 2017). Os cinco gêneros encontrados

estão comumente relacionados a solos desérticos e arenosos (DING *et al.*, 2013; NITHYA *et al.*, 2017). Nesse trabalho foram isoladas 50 cepas de actinobactérias, das quais 22 são procedentes da área antropizada e 28 da área conservada. A diversidade de gêneros encontradas não apresentou diferença entre as áreas (FIGURA 10;  $p = 0,851$ ), com um predomínio do gênero *Streptomyces* nas duas áreas, e o gênero *Actinomadura*, identificado apenas na área conservada.

Figura 10: Porcentagem de gêneros por área de estudo



Fonte: elaborada pela autora.

As 19 cepas de rizóbios mais as sete cepas padrão, foram analisadas através das características fenotípicas, onde, 78% neutralizaram ou alcalinizaram o meio de cultura e 67% apresentaram consistência butírica ou gomosa, 85% das cepas foram tolerantes as altas temperaturas e altas concentrações de sais, porém em relação ao pH apesar de tolerarem bem a alcalinidade apresentaram suscetibilidade a acidez do meio (TABELA 4). Com a comparação das sequências 16S rRNA das bactérias com as disponíveis no banco de dados GenBank® 18 cepas foram identificadas como *Bradyrhizobium* enquanto uma foi identificada como *Rhizobium tropici* (SILVA, 2020). As cepas não apresentaram diferença estatística entre si nas características analisadas ( $p = 0,395$ ).

Tabela 4: Características fenotípicas e fisiológicas das cepas de rizóbio

Rhizobium Isolates	Espécie	pH	Growth rate	Mucus	Colony color	Temperature (°C) †	pH 4 †	pH 10 †	NaCl (g L <sup>-1</sup> )
L1	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	Neut	Slow	Viscous	White	-	+	+	3
L4	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	Alkali	Slow	Viscous	White	39	+	-	3

1) †

L6	<i>Bradyrhizobium vignae</i>	Neut	Slow	Gummy	White	45	-	+	3
L7	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	Acid	Fast	Butyric	Yellow	43	-	+	20
L9	<i>Rhizobium tropici</i>	Alkali	Slow	Butyric	White	39	-	-	2
L11	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	Acid	Fast	Butyric	White	43	+	+	10
L13	<i>Bradyrhizobium kavangense</i>	Neut	Slow	Gummy	White	45	-	+	3
L14	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	Neut	Slow	Gummy	White	45	-	+	3
L15	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Alkali	Slow	Gummy	White	45	-	+	3
L16	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Neut	Slow	Butyric	Yellow	45	-	+	3
L17	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	Alkali	Slow	Viscous	White	41	-	+	3
L18	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	Neut	Slow	Gummy	White	45	-	+	3
L19	<i>Bradyrhizobium kavangense</i>	Neut	Slow	Butyric	White	41	-	+	10
L20	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>	Alkali	Slow	Gummy	White	45	-	+	3
L21	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	Alkali	Slow	Butyric	White	43	+	+	10
L23	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>	Acid	Slow	Gummy	White	41	-	+	2,5
L24	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>	Neut	Slow	Gummy	White	41	-	+	10
L27	<i>Bradyrhizobium iriomotense</i>	Alkali	Slow	Gummy	Yellow	39	+	-	2,5
L29	<i>Bradyrhizobium kavangense</i>	Alkali	Slow	Gummy	White	39	-	-	3
BR 3486	<i>Paraburkholderia phymatum (BR 3486)</i>	Acid	Fast	Butyric	Yellow	43	+	+	10
BR 3267	<i>Bradyrhizobium sp (BR 3267)</i>	Neut	Slow	Butyric	White	45	-	+	3
BR 3302	<i>Bradyrhizobium sp (BR 3302)</i>	Alkali	Slow	Viscous	White	45	-	+	10
BR 3262	<i>Bradyrhizobium sp (BR 3262)</i>	Alkali	Slow	Viscous	White	-	+	+	3
BR 3301	<i>Bradyrhizobium sp (BR 3301)</i>	Alkali	Slow	Viscous	White	39	+	+	3
BR 2003	<i>Bradyrhizobium sp (BR 2003)</i>	Neut	Slow	Butyric	White	-	+	+	3
BR 2801	<i>Bradyrhizobium elkanii (BR 2801)</i>	Neut	Slow	Viscous	White	-	+	+	3

† O símbolo (+) indica resultado positivo enquanto (-) indica resultado negativo.

Fonte: elaborada pela autora

Cepas isoladas localmente possuem capacidade de resistir aos estresses ambientais presentes, que de outro modo poderiam limitar sua produtividade. Rizóbios isolados do Egito por Yanni *et al.* (2016) foram utilizados para produção de biofertilizantes e proporcionaram aumento significativo no rendimento de sementes e na eficiência agrônômica do feijão (*Phaseolus vulgaris*) em condições de campo. Ali *et al.* (2019) isolaram cepas de nódulos de soja, em Bangladesh, e constataram que as cepas locais apresentaram eficácia e resistência a condições de estresse físico, pH, salinidade e temperatura.

As cepas de *Bradyrhizobium* são frequentemente relatadas em nódulos de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) nos trópicos (MARINHO *et al.*, 2017), sendo um grupo taxonômico diversificado, várias espécies de *Bradyrhizobium* foram isoladas de nódulos de feijão-caupi no Brasil (FIGUEREDO *et al.*, 2017; MORAES *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2017).

As cepas de rizóbios apresentaram resistência intrínseca a diversos antibióticos e 14 cepas (oito cepas isoladas e seis cepas padrão) foram capazes de produzir a enzima amilase. No entanto, nenhuma cepa foi capaz de produzir xilanase ou celulase (TABELA 5). As cepas que não apresentaram a capacidade de produzir celulase foram selecionadas para os testes de facilitação com as actinobactérias.

Tabela 5: Resistência intrínseca a antibióticos e perfil enzimático de cepas de rizóbio

Rhizobium Isolates	Antibiotics†															Cellulase†	Amylase†	Xylanase†	Phosphate solubilizing†
	CIP 05	CLO 30	GEN 10	PIT 110	SUT 25	TET 30	CFO 30	CAZ 30	CRO 30	AMI 30	AMC 30	AMP 10	ATM 30	CFL 30	CPM 30				
L1	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-
L2	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+
L3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
L4	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
L6	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
L7	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-
L9	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
L10	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
L11	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
L13	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
L14	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
L15	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
L16	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
L17	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
L18	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
L19	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
L20	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
L21	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
L22	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
L23	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
L24	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
L25	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
L26	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
L27	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
L29	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
<i>Burkholderia phymatum</i> (BR 3486)	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Bradyrhizobium</i> sp (BR 3267)	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>Bradyrhizobium</i> sp (BR 3302)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>Bradyrhizobium</i> sp (BR 3262)	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>Bradyrhizobium</i> sp (BR 3301)	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
<i>Bradyrhizobium</i> sp (BR 2003)	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> (BR 2801)	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-

† O símbolo (+) indica resultado positivo enquanto (-) indica resultado negativo.

Fonte: elaborada pela autora.

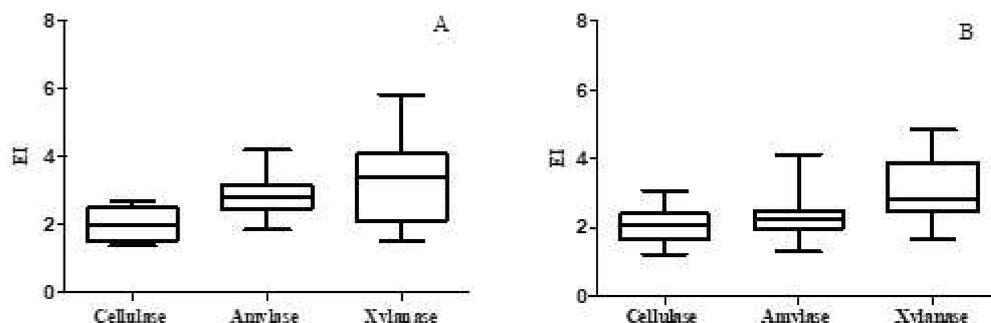
A seleção de cepas de rizóbios resistentes a antibióticos resulta em uma maior capacidade competitiva. Anand *et al.* (2012) mostraram que a inoculação de soja com *Bradyrhizobium* resistente a antibiótico e a fagos apresentam alta capacidade de fixação de nitrogênio, proporcionando aumento da produção de soja em solo indiano.

O antagonismo entre rizóbios e actinobactérias vem sendo a algum tempo estudado, (JHA *et al.*, 2020; VAN SCHREVEN, 1964), portanto foi necessário um estudo preliminar para avaliação da resistência intrínseca das cepas a antibióticos.

### 2.3.3 Perfil Enzimático

Entre as cepas de actinobactérias analisadas 47 apresentaram atividade amilolítica (94%), 37 apresentaram atividade xilanolítica (74%) e 32 apresentaram atividade celulolítica (64%). Não houve diferença estatística na atividade celulolítica ( $p = 0,360$ ) entre as duas áreas, enquanto as atividades amilolítica ( $p = 0,000$ ) e xilanolítica ( $p = 0,005$ ) foram mais elevadas entre as cepas da área antropizada (FIGURA 11). As enzimas menos expressas foram amilolítica e celulolítica, enquanto a xilanolítica apresentou os maiores valores de Índices Enzimáticos (EI), chegando ao máximo de 5.8 e se destacando das demais atividades estatisticamente ( $p = 0,000$ ).

Figura 11: Perfil enzimático (EI) de celulase, amilase e xilanase de cepas de actinobactérias isoladas do semiárido nordestino, Brasil, área antropizada (A) e área conservada (B).



Fonte: elaborada pela autora.

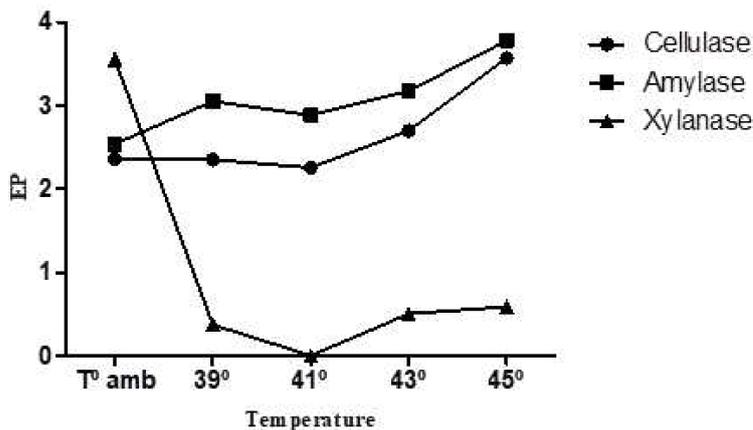
Entre as enzimas analisadas, a cepa QX 67 (*Streptomyces*) proveniente da área antropizada, apresentou índices enzimáticos elevados nas três atividades. As cepas onde foram observados os maiores valores de índice enzimático, para cada atividade, em sua maioria são oriundas da área antropizada, isso ocorre porque a liberação de enzimas nos solos está relacionada às exigências metabólicas e nutrientes disponíveis, mais do que a diversidade de organismos.

A capacidade das comunidades microbianas de manter a diversidade funcional por meio de perturbação, estresse ou sucessão pode ser mais importante para a produtividade do ecossistema do que a diversidade taxonômica, isso reflete nas atividades celulolítica, amilolítica e xilanolítica que estão fortemente influenciadas pela privação de nutrientes (CALDWELL, 2005; CHRONI *et al.*, 2009).

Ademais, as características físico-químicas do solo podem influenciar na produção de xilanase por fungos, bactérias e actinobactérias (RAMANJANEYULU *et al.*, 2017), onde a maior concentração desses organismos ocorreu em um solo com pH 5.1, condizente com os resultados encontrados, onde a área conservada possui um pH mais ácido e apresentou uma menor concentração de cepas de actinobactérias produtoras da enzima xilanase.

A produção da enzima celulase e amilase apresentaram um coeficiente de correlação de Pearson positivo baixo,  $r = 0,133$  e  $r = 0,172$  respectivamente ( $p = 0,000$ ), de acordo com o aumento de temperatura, enquanto que a enzima xilanase apresentou um coeficiente correlação negativo muito forte ( $r = -0,703$ ,  $p = 0,000$ ) (FIGURA 12), apenas três cepas conseguiram apresentar atividade xilanolítica na temperatura de 45°C (QX 15 – *Nocardia*, QX 19 – *Streptomyces*, Qx 29 – *Nocardia*) todas provenientes da área conservada.

Figura 12: Índice enzimático (EI) de celulase, amilase e xilanase influenciado pela temperatura, ambiente, 39°, 41°, 43° e 45°C, de cepas de actinobactérias isoladas do semiárido nordestino, Brasil.



Fonte: elaborada pela autora.

A origem das actinobactérias influencia na sua capacidade de produzir enzimas funcionais sobre condições de grande estresse, cepas originárias de ambientes mais quentes, como áridos e semiáridos, possuem uma capacidade de produzirem enzimas mesmo quando submetidas a altas temperaturas (KARANJA *et al.*, 2010; NITHYA *et al.*, 2017). Chroni *et al.* (2009) observaram que ocorre um aumento no halo indicativo de degradação de celulose com o aumento na temperatura, assim como Minotto *et al.* (2014) que observaram o mesmo para as enzimas celulase e amilase. Segundo Nithya *et al.* (2017) a produção enzimática vai depender principalmente da cepa, composição do meio, métodos de cultivo, crescimento, exigências nutricionais, pH, temperatura e tempo de incubação.

A temperatura ótima para a produção enzimática de actinobactérias pode variar em função da origem, por exemplo, Chaudhary e Prabhu, (2016) descreveram 55°C como temperatura ótima para a produção de amilase e celulase. Enquanto trabalhos com actinobactérias de ambientes marinhos, relataram como temperatura ótima para produção de amilase intervalo entre 25 a 30°C, com uma diminuição da produção quando passou dessa faixa (KRISHNAKUMAR; BAI; PREMKUMAR, 2015).

Apesar de haver relatos na literatura sobre actinobactérias que apresentam atividade xilanolítica em temperaturas de até 80°C (LI *et al.*, 2008; RAHMANI *et al.*, 2018), as cepas estudadas foram afetadas nas mudanças de temperatura. Apenas cinco cepas apresentaram atividade na temperatura de 39°C, próxima a faixa observada por Sanjivkumar *et al.* (2017) onde as cepas de actinobactérias produziram xilanase até 40° C, diminuindo após essa temperatura.

Muitos metabólitos extracelulares são produzidos por cepas de actinobactérias, especialmente *Streptomyces*, que podem suprimir fitopatógenos e atuar como reguladores no crescimento de plantas (SAIF *et al.*, 2014), além de aumentar a germinação de sementes e número de nódulos através da inibição de bactérias competidoras presentes no solo (GREGOR; KLUBEK; VARSA, 2003; OUBAHA *et al.*, 2019). Essas características, capacidade de produção de diversas enzimas e melhor desempenho em altas temperaturas, tornam as actinobactérias candidatas ideais a serem utilizadas como inoculantes microbianos para uso agrícola e na recuperação de áreas degradadas.

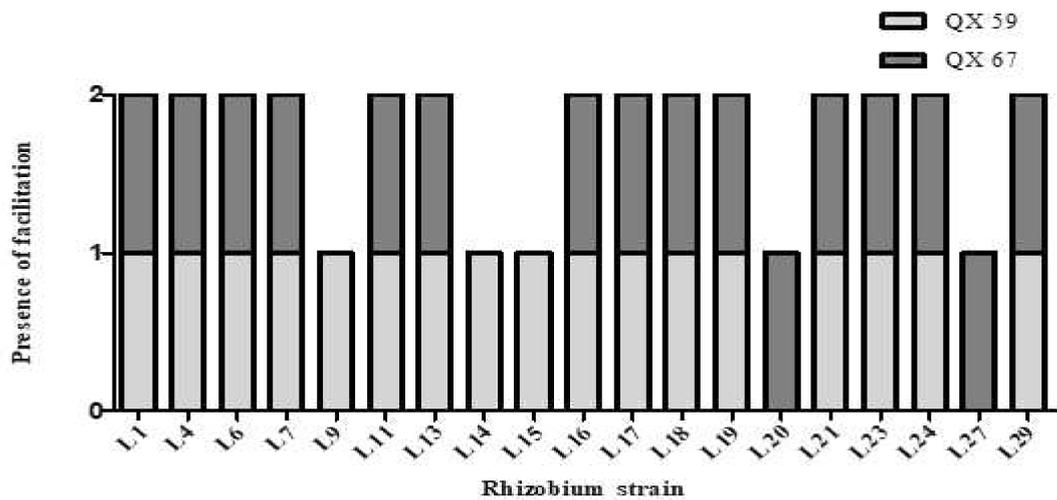
#### 2.3.4 *Facilitação in vitro*

Nenhuma cepa de rizóbio apresentou capacidade de produzir celulase (TABELA 4), enquanto que 32 cepas de actinobactérias apresentaram halo de degradação de celulose. O índice enzimático (EI) foi calculado através da razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia, sendo o resultado submetido a uma análise de variância ( $p = 0,000$ ), onde duas cepas se destacaram em relação as demais, QX 59 e QX 67.

As cepas QX 59 e QX 67 pertencem ao gênero *Streptomyces* e são provenientes da área antropizada e foram selecionadas para serem cultivadas conjuntamente com as 19 cepas de rizóbios que não apresentaram produção de celulase. Os resultados obtidos revelaram 17 relações positivas.

Os rizóbios L20 (*B. yuanamingense*) e L27 (*B. iriomontense*) que não apresentaram atividade de facilitação com a cepa QX 59 (*Streptomyces*) foram capazes de apresentar essa atividade com a cepa QX 67 (*Streptomyces*), enquanto os rizóbios L9 (*Rhizobium tropici*), L14 (*Bradyrhizobium* sp.) e L15 (*B. japonicum*) apresentaram atividade de facilitação apenas com a cepa QX 59 (FIGURA 13). Essa ausência de facilitação pode ser atribuída a baixa resistência intrínseca a antibióticos apresentadas por essas cepas de rizóbios, pois nos testes *in vitro* dos 15 antibióticos testados apresentaram sensibilidade a dez.

Figura 13: Facilitação entre dezenove cepas de rizóbios e duas cepas de actinobacterias, microrganismos isolados da região semiárida nordestina, Brasil.



Fonte: elaborada pela autora.

O índice de compatibilidade das duas cepas de actinobactérias, QX 59 e QX 67, foi de 0,89 e 0,84 respectivamente, mostrando que não houve diferença na capacidade de atuar como facilitadoras para as cepas de rizóbio, sendo porém um índice alto, confirmando a hipótese de que esses microrganismos possuem a aptidão de atuar na facilitação *in vitro* de bactérias

diazotróficas nodulíferas.

O uso de consórcios microbianos é um campo emergente que permite que os microrganismos executem funções complexas que são impossíveis para um único organismo e fornece soluções para fatores de estresse ambiental. A co-inoculação de duas espécies bacterianas diferentes exercem efeitos mais fortes sobre o crescimento das plantas do que a inoculação de uma espécie, sugerindo que as funções sinérgicas de múltiplas cepas são mais efetivas em interações plantas-bactérias (SANTIAGO *et al.*, 2017).

O uso da co-inoculação de actinobactérias com rizóbios ainda é incipiente, porém vem sendo documentado com resultados promissores. Soe e Yamakawa (2013) co-inocularam *Bradyrhizobium yuanmingense* e *Streptomyces griseoflavus* os resultados revelaram um aumento da nodulação, fixação de nitrogênio e rendimento de sementes em diferentes variedades de soja, enquanto que Le *et al.* (2016) relataram que *Sinorhizobium meliloti* coinoculado com *Streptomyces*, inoculados em alfafa, aumentaram o peso seco da planta em até 30%.

O estudo das interações antagônicas entre actinobactérias e rizóbios vem sendo amplamente reportado (LIMA *et al.*, 2017; RASSEM; DAVID, 2017), porém, são poucos os relatos de uma relação sinérgica entre esses grupos. (AUNG; TAKEO, 2015; HTWE *et al.*, 2018; LE *et al.*, 2016; SAHUR *et al.*, 2018; SOE; YAMAKAWA, 2013). Ademais, espécies de actinobactérias e rizóbios de um mesmo ambiente interagem entre si e ao longo do tempo promovem uma coexistência, com interações tanto antagônicas quanto mutualísticas (SILVA *et al.*, 2019).

## 2.4 Conclusão

O nível de antropização não influenciou o padrão fenotípico, taxonômico e o perfil enzimático de actinobactérias, mostrando que as cepas são capazes de sobreviver aos efeitos antrópicos ocorridos no ambiente. A ação humana para preparo e cultivo do solo não reduziu a viabilidade e a capacidade dessas cepas, indicando potencial para seu uso em áreas agrícolas. Destacaram-se as cepas QX 59 e QX 67, identificadas como *Streptomyces* e provenientes da área antropizada, que apresentaram os maiores valores de índice enzimático, e foram selecionadas para o teste de facilitação.

As cepas de rizóbios apresentaram resistência intrínseca a antibióticos permitindo uma alta ocorrência de facilitação *in vitro* com cepas de actinobactérias, podendo participar de testes *in vivo* para comprovar sua capacidade de se beneficiar da inoculação conjunta.

## REFERÊNCIAS

- ALARIYA, Shyam Sunder et al. Amylase activity of a starch degrading bacteria isolated from soil. **Archives of applied science Research**, v. 5, n. 1, p. 15-24, 2013.
- ALI, Syed Raju et al. Isolation, characterization and symbiotic performance evaluation of soybean (*Glycine max*) nodulating rhizobia from different districts of Bangladesh. **Journal of Bioscience and Biotechnology Discovery**, v. 4, n. 1, p. 10-20, 2019.
- AMULE, F. et al. Effect of actinobacterial, rhizobium and plant growth promoting rhizobacteria consortium inoculation on rhizosphere soil properties in soybean in Jabalpur district of Madhya Pradesh. **International Journal of Consumer Studies**, v. 6, n. 1, p. 583-586, 2018.

- ANAND, Akhil et al. Surviving and thriving in terms of symbiotic performance of antibiotic and phage-resistant mutants of Bradyrhizobium of soybean [Glycine max (L.) Merrill]. **Current microbiology**, v. 65, p. 390-397, 2012.
- AUGUSTINE, Deepthi et al. Actinobacteria from sediment samples of Arabian Sea and Bay of Bengal: biochemical and physiological characterization. **International Journal of Research in Marine Sciences**, v. 2, n. 2, p. 56-63, 2013.
- AUNG, Zaw Htwe; TAKEO, Yamakawa. Enhanced plant growth and/or nitrogen fixation by leguminous and non-leguminous crops after single or dual inoculation of Streptomyces griseoflavus P4 with Bradyrhizobium strains. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 49, p. 2337-2344, 2015.
- CALDWELL, Bruce A. Enzyme activities as a component of soil biodiversity: a review. **Pedobiologia**, v. 49, n. 6, p. 637-644, 2005.
- CARVALHO, M. F. et al. Endophytic actinobacteria for sustainable agricultural applications. **Endophytes: Crop Productivity and Protection: Volume 2**, p. 163-189, 2017.
- CHANG, Ed-Haun et al. The effect of altitudinal gradient on soil microbial community activity and structure in moso bamboo plantations. **Applied Soil Ecology**, v. 98, p. 213-220, 2016.
- CHAUDHARY, Nazia; PRABHU, Shraddha. Thermophilic actinomycetes from hot water spring capable of producing enzymes of industrial importance. **Int j res stud biosci**, v. 4, p. 29-35, 2016.
- CHRONI, Christina et al. Investigation of the microbial community structure and activity as indicators of compost stability and composting process evolution. **Bioresource technology**, v. 100, n. 15, p. 3745-3750, 2009.
- CLARK, Francis E. Actinomycetes. **Methods of Soil Analysis: Part 2 Chemical and Microbiological Properties**, v. 9, p. 1498-1501, 1965.
- COURI, Sonia; FARIAS, Antonio Xavier. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. **Rev. Microbiol**, p. 314-7, 1995.
- DA SILVA, Valeria Borges et al. Fast and efficient symbiotic gene-based duplex PCR approach for the preliminary selection of legume root nodule bacteria. **Rhizosphere**, v. 10, p. 100144, 2019.
- DA SILVA, Valeria Borges Micro-organismos colonizadores de nódulos de *Vigna* spp. cultivadas em solos de caatinga. Tese (Doutorado em Ciência do Solo), Universidade Federal da Paraíba. Paraíba, p. 158. 2020.

DAS, Payal; SOLANKI, Renu; KHANNA, Monisha. Isolation and screening of cellulolytic actinomycetes from diverse habitats. **International Journal of Advanced Biotechnology and Research**, v. 5, n. 3, p. 438-451, 2014.

DE JESUS MORAES, Nayara et al. Bradyrhizobium sp. inoculation ameliorates oxidative protection in cowpea subjected to long-term composted tannery sludge amendment. **European Journal of Soil Biology**, v. 76, p. 35-45, 2016.

DE VRIES, Maria et al. Metagenomic analyses reveal no differences in genes involved in cellulose degradation under different tillage treatments. **FEMS microbiology ecology**, v. 91, n. 7, p. fiv069, 2015.

DING, Dong et al. Culturable actinomycetes from desert ecosystem in northeast of Qinghai-Tibet Plateau. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 259-266, 2013.

DÖBEREINER, Johanna; BALDANI, Vera Lúcia Divan; BALDANI, José Ivo. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Embrapa SPI, 1995.

DOS SANTOS, Jonnathan Whiny Moraes et al. Molecular and symbiotic characterization of peanut bradyrhizobia from the semi-arid region of Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 121, p. 177-184, 2017.

FIGUEREDO, María Soledad et al. Induced systemic resistance and symbiotic performance of peanut plants challenged with fungal pathogens and co-inoculated with the biocontrol agent Bacillus sp. CHEP5 and Bradyrhizobium sp. SEMIA6144. **Microbiological research**, v. 197, p. 65-73, 2017.

FUNCEME: Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos. **Dados dos postos pluviométricos do Ceará, 2017**. Disponível em:  
<<http://www.funceme.br/app/calendario/produto/municipios/maxima/diario?data=hoje>>  
Acesso em: 15 fev. 2017.

GARCIA-LEMONS, Adriana M. et al. Under the christmas tree: Belowground bacterial associations with Abies Nordmanniana across production systems and plant development. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 198, 2020.

GREGOR, A. K.; KLUBEK, Brian; VARSA, E. C. Identification and use of actinomycetes for enhanced nodulation of soybean co-inoculated with Bradyrhizobium japonicum. **Canadian journal of microbiology**, v. 49, n. 8, p. 483-491, 2003.

HAN, Cheng-Long et al. Responses of soil microorganisms, carbon and nitrogen to freeze-thaw cycles in diverse land-use types. **Applied Soil Ecology**, v. 124, p. 211-217, 2018.

HANKIN, Lester; ANAGNOSTAKIS, Sandra L. Solid media containing carboxymethylcellulose to detect Cx cellulase activity of micro-organisms. **Microbiology**, v. 98, n. 1, p. 109-115, 1977.

HOUFANI, Aicha Asma et al. Cellulase– hemicellulase activities and bacterial community composition of different soils from Algerian ecosystems. **Microbial ecology**, v. 77, p. 713-725, 2019.

HTWE, Aung Zaw 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**, v. 9, n. 2, p. 77, 2019.

HTWE, Aung Zaw 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**, v. 64, n. 2, p. 222-229, 2018.

IBM Corp. **IBM SPSS Statistics for Windows**, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp. Released 2011.

IUSS Working Group WRB, **World reference base for soil resources**. International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. FAO, Rome, Italy. 2014.

JHA, Prabhat N. et al. Alterations in the endophyte-enriched root-associated microbiome of rice receiving growth-promoting treatments of urea fertilizer and Rhizobium biofertilizer. **Microbial ecology**, v. 79, p. 367-382, 2020.

JIANG, Yi et al. Isolation and cultivation methods of Actinobacteria. **Actinobacteria-basics and biotechnological applications**, p. 39-57, 2016.

KARANJA, E. N. et al. Optimization of growth conditions and characterization of enzymatic activity of selected novel Streptomyces species from Kenyan soils.

KERN, Martha E. **Micologia médica: texto e atlas**. Editorial Premier, 1999.

KRISHNAKUMAR, S.; BAI, V.; PREMKUMAR, J. Production of alpha amylase by salt–Tolerant Actinomycete Streptomyces sp.–SBU3 isolated from marine sponge. 2015.

KUMAR, Pankaj et al. Inoculation of siderophore producing rhizobacteria and their consortium for growth enhancement of wheat plant. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 15, p. 264-269, 2018.

KUMAR, Vijay et al. Screening of actinomycetes from earthworm castings for their antimicrobial activity and industrial enzymes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 205-214, 2012.

LE, Xuyen H. et al. Isolation and characterisation of endophytic actinobacteria and their effect on the early growth and nodulation of lucerne (Medicago sativa L.). **Plant and Soil**, v. 405, p. 13-24, 2016.

- LEWIN, Gina R. et al. Evolution and ecology of Actinobacteria and their bioenergy applications. **Annual review of microbiology**, v. 70, p. 235-254, 2016.
- LI, Ning et al. Cloning, expression, and characterization of a new xylanase with broad temperature adaptability from *Streptomyces* sp. S9. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, p. 231-240, 2008.
- LIMA, José Vinícius Leite et al. Characterization of actinobacteria from the semiarid region, and their antagonistic effect on strains of rhizobia. **African journal of biotechnology**, v. 16, n. 11, p. 499-507, 2017.
- MAHALAKSHMI, V.; BHAGAWATI, Ditisha. Testing the efficacy of phytohormones of microbial origin in promoting plant growth. **J. Microbiol. Biotechnol. Res**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2017.
- MARINHO, Rita de Cássia Nunes et al. Symbiotic and agronomic efficiency of new cowpea rhizobia from Brazilian Semi-Arid. **Bragantia**, v. 76, p. 273-281, 2017.
- MENÉNDEZ, Esther et al. Rhizobium Symbiotic Enzyme Cellulase CelC2: Properties and Applications. In: **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**. Elsevier, 2016. p. 81-89.
- MINOTTO, Elisandra et al. Enzyme characterization of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants. **Journal of Advanced Scientific Research**, v. 5, n. 02, p. 16-23, 2014.
- MUELLER, J. G. et al. Intrinsic antibiotic resistance in *Bradyrhizobium japonicum*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 20, n. 6, p. 879-882, 1988.
- NAUTIYAL, C. Shekhar. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS microbiology Letters**, v. 170, n. 1, p. 265-270, 1999.
- NITHYA, Krishnasamy et al. Purification, characterization, and statistical optimization of a thermostable  $\alpha$ -amylase from desert actinobacterium *Streptomyces fragilis* DA7-7. **3 Biotech**, v. 7, p. 1-13, 2017.
- OUBAHA, Brahim et al. The potential of antagonistic moroccan *Streptomyces* isolates for the biological control of damping-off disease of pea (*Pisum sativum* L.) caused by *Aphanomyces euteiches*. **Journal of Phytopathology**, v. 167, n. 2, p. 82-90, 2019.
- PASSARI, Ajit Kumar et al. In vitro and in vivo plant growth promoting activities and DNA fingerprinting of antagonistic endophytic actinomycetes associates with medicinal plants. **PLoS one**, v. 10, n. 9, p. e0139468, 2015.
- PÉREZ-MONTAÑO, F. et al. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. **Microbiological research**, v. 169, n. 5-6, p. 325-336, 2014.

PINHEIRO, M. S. et al. Isolation and screening of rhizobial strains native from semiarid tolerant to environmental stress. **Encicl. Biosf**, v. 10, p. 2071-2082, 2014.

PINHEIRO, Marcelo de S. et al. Root Nodule Preparation as a Low-Cost Inoculant for Cowpea. **Journal of Agricultural Science**, v. 11, n. 14, p. 265, 2019.

RAHMANI, Nanik et al. Xylanase and feruloyl esterase from actinomycetes cultures could enhance sugarcane bagasse hydrolysis in the production of fermentable sugars. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 82, n. 5, p. 904-915, 2018.

RAMANJANEYULU, G. et al. Xylanase-producing microflora in eastern ghats of andhra pradesh, India. **Journal of forestry research**, v. 28, p. 291-298, 2017.

RASSEM, Abdousslam M.; DAVID, Arun A. In-Vitro evaluates antagonism strains of actinomycetes on growth strains of Rhizobium. **World Journal of pharmacy and pharmaceutical sciences**, v. 6, n. 3, p. 894-903, 2017.

ROBLEDO, Marta et al. Role of Rhizobium cellulase CelC2 in host root colonization and infection. **Biological Nitrogen Fixation**, p. 525-532, 2015.

SAEID, Agnieszka; PROCHOWNIK, Ewelina; DOBROWOLSKA-IWANEK, Justyna. Phosphorus solubilization by Bacillus species. **Molecules**, v. 23, n. 11, p. 2897, 2018.

SAHUR, Asmiaty et al. Effect of Seed Inoculation with Actinomycetes and Rhizobium Isolated from Indigenous Soybean and Rhizosphere on Nitrogen Fixation, Growth, and Yield of Soybean. **International Journal of Agronomy**, 2018.

SAIF, Saima et al. Role of phosphate-solubilizing actinomycetes in plant growth promotion: current perspective. **Phosphate Solubilizing Microorganisms: Principles and Application of Microphos Technology**, p. 137-156, 2014.

SAINI, Anita; AGGARWAL, Neeraj K.; YADAV, Anita. Cellulolytic potential of actinomycetes isolated from different habitats. **Bioeng. Biosci**, v. 4, n. 5, 2016.

SANJIVKUMAR, Muthusamy et al. Biosynthesis, purification and characterization of  $\beta$ -1, 4-xylanase from a novel mangrove associated actinobacterium *Streptomyces olivaceus* (MSU3) and its applications. **Protein Expression and Purification**, v. 130, p. 1-12, 2017.

SANTIAGO, Christine D. et al. Bacterial compatibility in combined inoculations enhances the growth of potato seedlings. **Microbes and environments**, v. 32, n. 1, p. 14-23, 2017.

SANTOS, HG dos et al. Embrapa: Sistema brasileiro de classificação de solos. 2018.

SINGH, S. P.; GAUR, R. Evaluation of antagonistic and plant growth promoting activities of chitinolytic endophytic actinomycetes associated with medicinal plants against *Sclerotium rolfsii* in chickpea. **Journal of applied microbiology**, v. 121, n. 2, p. 506-518, 2016.

- SOE, Khin Myat; YAMAKAWA, Takeo. 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**, v. 59, n. 3, p. 361-370, 2013.
- TEIXEIRA, Paulo César et al. Manual de métodos de análise de solo. 2017.
- THAMPI, Anusree; BHAI, R. Suseela. Rhizosphere actinobacteria for combating Phytophthora capsici and Sclerotium rolfsii, the major soil borne pathogens of black pepper (Piper nigrum L.). **Biological Control**, v. 109, p. 1-13, 2017.
- VAN SCHREVEN, D. A. The effect of some actinomycetes on rhizobia and Agrobacterium radiobacter. **Plant and Soil**, v. 21, p. 283-302, 1964.
- VINCENT, James Matthew et al. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. **A manual for the practical study of the root-nodule bacteria.**, 1970.
- WILLIAMS, S. T.; DAVIES, F. L. Use of a scanning electron microscope for the examination of actinomycetes. **Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 171-177, 1967.
- WINK, J. Compendium of Actinobacteria from Dr. **Joachim M. Wink, University of Braunschweig, an Electronic Manual Including the Important Bacterial Group of the Actinomycetes. Available online at: <https://www.dsmz.de/bacterial-diversity/compendium-of-actinobacteria.html>**, 2012. Acesso em: 15 maio. 2020.
- XU, Meng et al. Soil microbial community structure and activity along a montane elevational gradient on the Tibetan Plateau. **European journal of soil biology**, v. 64, p. 6-14, 2014.
- YANNI, Youssef et al. Enhanced symbiotic performance and productivity of drought stressed common bean after inoculation with tolerant native rhizobia in extensive fields. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 232, p. 119-128, 2016.
- ZHENG, Mianhai et al. Global pattern and controls of biological nitrogen fixation under nutrient enrichment: A meta-analysis. **Global Change Biology**, v. 25, n. 9, p. 3018-3030, 2019.

### 3 CO-INOCULAÇÃO ENTRE ACTINOBACTÉRIAS E BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS NODULÍFERAS DO SEMIÁRIDO *IN VIVO*

#### PONTOS CHAVE:

- Gênero *Streptomyces* apresentou uma maior atividade enzimática
- Actinobactérias e rizóbios apresentaram capacidade de facilitação *in vitro*
- Actinobactérias e rizóbios apresentaram capacidade de facilitação *in vivo*

#### RESUMO

O semiárido possui amplitudes térmicas elevadas, solos com pouca umidade e oligotróficos, aspectos que diminuem a disponibilidade de recursos podendo favorecer interações negativas entre os microrganismos. Esses atributos reforçam a importância de estudos sobre a resiliência desses microrganismos em ecossistemas com recursos limitantes, além de, ao se considerar a produção de fertilizantes orgânicos, deve-se pensar em espécies capazes de lidar eficazmente com o estresse da competição de bactérias que já estão bem adequados para o habitat. O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp - Fabaceae) é uma cultura importante para os sistemas agrícolas do Nordeste brasileiro, porém apresenta baixa produtividade, sendo necessários estudos com o objetivo de melhorar sua produção. Nesse estudo, objetivou-se avaliar o efeito da inoculação conjunta, em experimento *in vivo*, de cepas de actinobactérias e de rizóbios, sobre as características fisiológicas e biométricas de plantas de feijão-caupi. Foram avaliadas cepas de actinobactérias isoladas de amostras de solo provenientes da Fazenda Não Me Deixes (Quixadá, Ceará) e de rizóbios nativos do solo da região semiárida brasileira. Entre as actinobactérias, 22 apresentaram atividade nas três enzimas testadas. Todos os rizóbios foram capazes de manter uma interação positiva com as actinobactérias variando a cepa testada ou o meio de cultura utilizado. Nenhuma cepa apresentou diferença entre as proporções das relações positivas e negativas, de facilitação *in vitro*, na enzima amilase. Não houve diferença estatística entre as variáveis indicando trocas gasosas e as cepas L6, L17 e L23 apresentaram eficiência relativa igual ou maior que a estirpe padrão BR 3301. A inoculação conjunta de microrganismos oriundos do semiárido, actinobactéria, QX 67 (*Streptomyces*), e os rizóbios, L6 (*Bradyrhizobium vignae*), L17 (*Bradyrhizobium* sp.) e L23 (*Bradyrhizobium yuanmingense*),

apresentaram eficiência relativa maior do que a cepa padrão BR 3301 em feijão-caupi (*Vigna unguiculata*).

**Palavras-chaves:** atividade enzimática. *Streptomyces*. rizóbio. facilitação.

### ABSTRACT

The semiarid has high temperature, soils with little moisture and oligotrophic, aspects that decrease the availability of resources and may favor a negative interaction between microorganisms. These attributes reinforce the importance of studies on the resilience of these microorganisms in ecosystems with limiting resources, besides considering the production of organic fertilizers, one should think of species capable of effectively dealing with the stress of competition of bacteria that are already well suited for the habitat. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) is an important crop for agricultural systems in northeastern Brazil, but has low productivity, and studies are needed to improve this production. In this study, the objective of this study was to evaluate the effect of joint inoculation, an *in vivo* experiment, of actinobacteria and rhizobium strains on the physiological and biometric characteristics of cowpea plants. Strains of actinobacteria isolated from soil samples from Fazenda Não Me Deixes (Quixadá, Ceará) and rhizobium native to the soil of the Brazilian semiarid region were evaluated. Among the actinobacteria, 22 showed activity in the three enzymes tested. All rhizobium were able to maintain a positive interaction with actinobacteria by varying the tested strain or culture medium used. No strain showed difference between the proportions of positive and negative relationships, of *in vitro* facilitation, in the enzyme amylase. There was no statistical difference between the variables indicating gas exchange and the strains L6, L17 and L23 presented relative efficiency equal to or greater than the standard strain BR 3301. The joint inoculation of microorganisms from the semi-arid, actinobacteria, QX 67 (*Streptomyces*), and rhizobium, L6 (*Bradyrhizobium vignae*), L17 (*Bradyrhizobium sp.*) and L23 (*Bradyrhizobium yuanmingense*), showed a higher relative efficiency than the standard strain BR 3301 in cowpea (*Vigna unguiculata*).

**Keywords:** enzymatic activity, *Streptomyces*, *Rhizobium*, facilitation.

### 3.1 Introdução

O solo possui uma comunidade de microrganismos grande, heterogênea e metabolicamente ativa, que atuam entre si com diferentes tipos de relações, ao considerarmos as características do semiárido, com suas amplitudes térmicas elevadas e seus solos com pouca umidade e oligotróficos (BRESSIANI *et al.*, 2015), são aspectos que diminuem a disponibilidade de recursos podendo favorecer uma interação negativa entre os microrganismos.

Esses atributos reforçam a importância de estudos sobre a resiliência desses microrganismos em ecossistemas com recursos limitantes, além de, ao se considerar a produção de fertilizantes orgânicos, deve-se pensar em espécies capazes de lidar eficientemente com o estresse da competição entre bactérias que já estão bem adequadas para o habitat (MARINHO *et al.*, 2017). Ao se isolar bactérias nativas, e já adaptadas da região, aumenta-se as chances de uma melhor eficiência (SOARES *et al.*, 2014).

Rizóbios são um grupo de bactérias capazes de fixarem nitrogênio que vivem simbioticamente em plantas da família das leguminosas, formando nódulos radiculares e em algumas espécies nódulos caulinares e são capazes de realizar fixação de nitrogênio, enquanto que actinobactérias são um grupo de bactérias filamentosas encontradas em maior magnitude no solo, que podem atuar no biocontrole de patógenos e são capazes de produzirem enzimas que auxiliam no estabelecimento de uma simbiose eficaz (ROBLEDO *et al.*, 2015).

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) é uma cultura importante para os sistemas agrícolas do Nordeste brasileiro, principalmente os sistemas de agricultura familiar, sendo produzido no Brasil em 1276,9 mil hectares, sendo que 92% dessa área fica no nordeste (CONAB, 2020), porém apresenta baixa produtividade, com 476 kg.ha<sup>-1</sup>, sendo necessários estudos com o objetivo de melhorar essa produção.

O uso da co-inoculação coinoculação de organismos destes dois grupos tem sido bem documentado nas culturas de soja (SAHUR *et al.*, 2018; ZAINUDDIN; SYAM'UN; DACHLAN, 2019), com um aumento no crescimento da planta, na aquisição de nutrientes e na produção por hectare. Na cultura de alfafa, actinobactérias endofíticas apresentaram um desempenho melhor quando inoculadas em consórcio com rizóbios do que isoladamente (LE;

BALLARD; FRANCO, 2016). Como os microrganismos do solo atuam em vários serviços ecossistêmicos que sustentam a produção e a sustentabilidade a inoculação conjunta potencializa as associações para além da rizosfera (TRABELSI *et al.*, 2011, 2012), enquanto a correção do solo com *Rhizobium* sp e compostos inorgânicos aumenta significativamente as populações de fungos, bactérias e actinobactérias (ANSARI; MAHMOOD, 2017).

Nos capítulos anteriores foi abordada a facilitação *in vitro*, com o objetivo de selecionar as cepas mais eficazes de actinobactérias e rizóbios, observando a capacidade de produção ou não da enzima celulase e poder competitivo das cepas. Nesse estudo, objetivou-se avaliar o efeito da inoculação conjunta, em experimento *in vivo*, de cepas de actinobactérias e de rizóbios, nas características fisiológicas e biométricas de plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*).

## 3.2 Material e Métodos

### 3.2.1. Local

As cepas de actinobactérias foram isoladas do solo oriundo da Fazenda Não Me Deixes, localizada no município de Quixadá, Ceará -BR. A localização geográfica aproximada é 4°49'34'' S e 38° 58'9'' W, e 210 m de altitude. O clima do município de Quixadá é identificado como Tropical Quente Semiárido (BSh, de acordo com Köppen-Geiger Climate Classification), com pluviosidade média de 717.5 mm, centralizada no período de fevereiro a abril, e temperatura média de 26.6°C (FUNCEME, 2017). O solo da fazenda é classificado como Argissolo, equivalente ao Lixisol (IUSS WORKING GROUP WRB, 2014). A amostragem de solo foi realizada em duas áreas da fazenda, uma antropizada em pousio e uma conservada, pertencente a Reserva Particular de Patrimônio Natural (RPPN) reconhecida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA).

As cepas de rizóbios são provenientes de amostras de solos de Quixadá (4°58'S a 39°1'W) e Cascavel (4°7'S a 38°14'W), no Ceará - BR, e no Rio Grande do Norte- BR, nos municípios Jardim de Angicos (5°39'S a 35°58'W) e Santana do Mato (5°57'S a 36°39'W) (PINHEIRO *et al.*, 2015).

### 3.2.2. *Microrganismos*

As cepas de actinobactérias foram isoladas do solo através da técnica *spread plate*, utilizando o meio caseína dextrose ágar (CDA) (CLARK, 1965). As cepas de rizóbio foram isoladas usando feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] como planta-isca e os nódulos obtidos foram macerados no meio yeast manitol agar (YMA) (VINCENT, 1970). Os isolados obtidos foram autenticados através do plantio e inoculação do feijão-caupi. As 50 cepas de actinobactérias e 19 cepas de rizóbios estão depositadas na Coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Universidade Federal do Ceará (UFC).

### 3.2.3. *Perfil Enzimático*

Foi avaliada a produção de amilase (ALARIYA *et al.*, 2013), xilanase (KUMAR *et al.*, 2012), e celulase (COURI; FARIAS, 1995), onde observou-se a degradação dos compostos: amido, xilana e celulose.

O índice enzimático (IE) foi calculado utilizando a equação:  $IE = \text{Diâmetro em mm do halo de hidrólise} / \text{Diâmetro em mm do halo da colônia}$  (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1977).

### 3.2.4. *Facilitação in vitro*

As cepas de actinobactérias e de rizóbios foram inoculadas separadamente em meios de cultura contendo amido (ALARIYA *et al.*, 2013), xilana (KUMAR *et al.*, 2012) e celulase (COURI; FARIAS 1995) como única fonte de carbono. A presença de zonas de hidrólise ao redor das colônias foi registrada como uma resposta positiva (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1977). Cada experimento foi realizado de forma independente. As cepas de actinobactérias que apresentaram um índice enzimático estatisticamente distinto juntamente com as estirpes não-amilolíticas e não-xilanolíticas de rizóbios foram selecionados para o teste de facilitação *in vitro*.

As cepas de actinobactérias foram inoculadas separadamente em meio ágar celulase, meio ágar nutritivo mais amido e ágar xilana, em “spots” e incubadas a 28 °C por 10 dias. Um mililitro de cultura de cada cepa de rizóbio previamente cultivado em meio YM por sete dias, foi transferido para microtubos, centrifugado a 9659.52 G por 10 minutos e o precipitado ressuspenso duas vezes. Uma gota de cada cultura de rizóbio purificado foi distribuída em torno

de cada colônia de actinobactérias a uma distância de 2 cm. Foi considerado resultado positivo quando ocorreu o crescimento das colônias de rizóbio (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995).

### **3.2.5. *Facilitação in vivo***

Foi instalado um experimento em casa de vegetação, com vasos contendo substrato composto por vermiculita e areia, na proporção 2:1, esterilizados em autoclave por duas horas a 121 °C e 1,5 atm, utilizando o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) como planta-isca.

As cepas de actinobactérias que apresentaram *facilitação in vitro* com as cepas de rizóbios foram repicadas individualmente em meio CDA líquido e incubadas por sete dias em temperatura ambiente com agitação horizontal constante de 150 rpm. Para os tratamentos com actinobactérias, foram adicionados superficialmente, em cada vaso, 3 mL da suspensão no dia do plantio e 14 dias após o plantio (PEREIRA *et al.*, 1999).

As cepas de rizóbios que demonstraram uma resposta a *facilitação* das actinobactérias *in vitro* foram selecionadas e replicadas individualmente no meio YM líquido, e agitadas em mesa agitadora orbital com velocidade de 150 rpm por sete dias. As cepas foram inoculadas na semeadura à razão de 3 mL/semente com 7 e 21 dias após a semeadura.

Foram semeadas quatro sementes de feijão-caupi por vaso, previamente desinfestadas em álcool, 96° GL por 30 segundos, NaClO 10% por dois minutos, e por fim, seis lavagens consecutivas com água destilada esterilizada. Sete dias após o plantio foi feito o desbaste deixando uma planta por vaso (PEREIRA *et al.*, 1999), e após 30 dias foi realizada a coleta.

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo quatro tratamentos, um contendo actinobactérias + rizóbios e mais três controles, para efeitos de comparação, plantas sem adição de nitrogênio, plantas com adição de nitrogênio na proporção 80 kg.ha<sup>-1</sup> e plantas inoculadas apenas com a cepa padrão BR 3301 (*Bradyrhizobium* sp).

### **3.2.6. Trocas gasosas foliar**

As avaliações das trocas gasosas foliar foram feitas na fase vegetativa (28 dias), realizadas no período da manhã entre 8h e 10h. As variáveis avaliadas foram: CO<sub>2</sub> ambiente (Cref), concentração interna de CO<sub>2</sub> (Ci), fotossíntese (A), condutância estomática (gs), taxa de transpiração (E), razão entre concentração interna e externa de CO<sub>2</sub> (Ci/Ca) e eficiência de carboxilação (A/Ci), a eficiência instantânea no uso da água (A/E). As variáveis foram determinadas por analisador de gás por infravermelho (IRGA (modelo LCI, ADC BioScientific, Inglaterra), em sistema aberto sob luz saturante e condições ambientes de temperatura e concentração de CO<sub>2</sub>. Determinou-se o índice SPAD utilizando um medidor portátil de clorofila SPAD-502 (Minolta Camera Co. Ltda.).

### **3.2.7. Avaliação do desenvolvimento vegetativo**

Foram avaliados os seguintes crescimentos vegetativos: número de nódulos por planta (ND), peso dos nódulos secos (PN), massa seca da parte aérea (SDM), do sistema radícula (RDM) e das folhas (LDM), altura da planta, do caule até o ápice da haste principal (HP), número de folhas (NL), tamanho da raiz (HR) e área foliar. A eficiência relativa, calculada pela divisão da massa de matéria seca da parte aérea dos tratamentos inoculados pela massa de matéria seca da parte aérea do tratamento com 80 kg.ha<sup>-1</sup> de N, multiplicada por 100 (BERGERSEN *et al.*, 1971). O material foi colocado em estufa com circulação de ar forçada a 65° C, por aproximadamente 72 horas, até atingir uma massa constante, após a secagem, o material foi pesado em uma balança de precisão.

### **3.2.8. Análise Estatística**

Todos os testes foram realizados em quadruplicata. A normalidade dos dados foi avaliada utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov, a homogeneidade de variância através do teste de Levene, a igualdade das matrizes de covariância através do teste Box's M e a multicolinearidade através de uma matriz de correlação, esses testes foram feitos para verificar os pressupostos das técnicas estatísticas aplicadas. Os índices enzimáticos foram submetidos a uma análise de variância para comparar as médias entre as cepas, utilizando o teste de Tukey como *post hoc*.

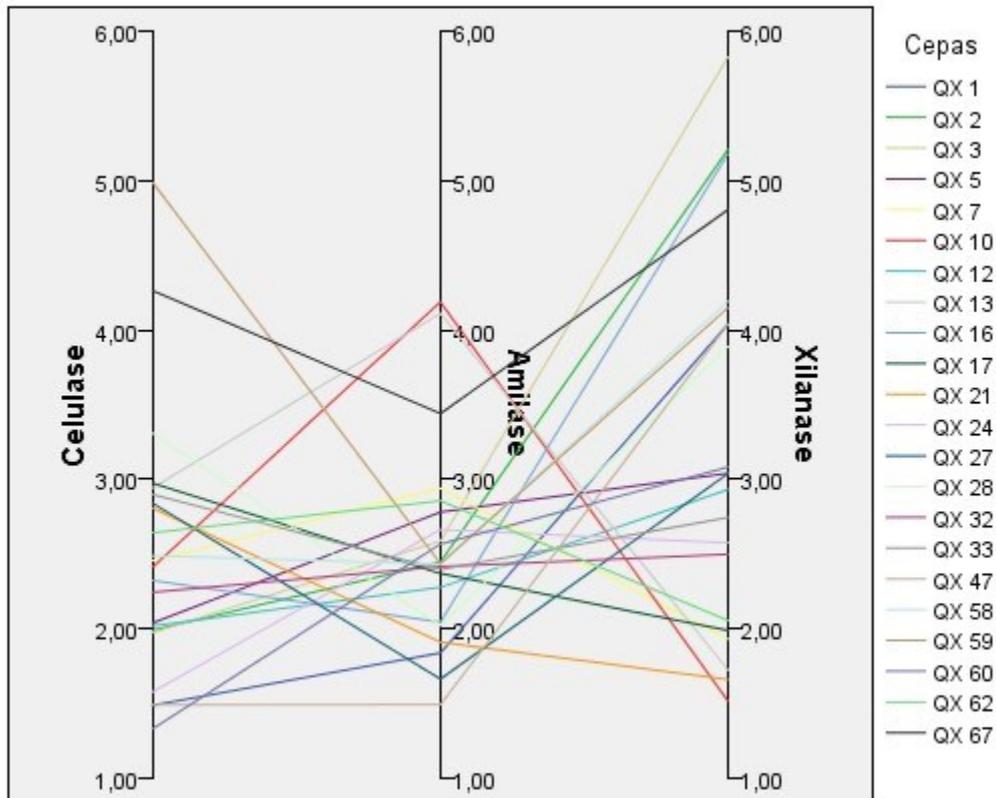
A facilitação *in vitro*, foi realizado um teste binomial. Para a escolha das cepas de rizóbio foi utilizado uma técnica de classificação de K-médias. Dos dados de trocas gasosas e de medidas biométricas foi realizada uma Análise de Variância Multivariada, com teste de Tukey como *post hoc* e uma correlação de Pearson para as variáveis selecionadas. Com os resultados gerais do teste *in vivo* foi utilizado uma análise discriminante. Foi estabelecido um intervalo de confiança de 95%. Para todos os testes realizados foi utilizado o programa SPSS (IBM Corp. Released 2011).

### **3.3 Resultados e Discussão**

#### ***3.3.1. Perfil Enzimático***

Entre as cepas analisadas 22 apresentaram atividade nas três enzimas testadas (FIGURA 14), sendo realizada uma ANOVA para cada enzima, para verificar quais cepas se sobressaíram estatisticamente. Na atividade celulolítica ( $p = 0,000$ ) destacaram-se as cepas QX 59 e QX 67, na atividade amilolítica ( $p = 0,000$ ) destacaram-se as cepas QX 4, QX 9, QX 10, QX 13, QX 31 e QX 67, na atividade xilanolítica ( $p = 0,000$ ) destacaram-se as cepas QX 2, QX 3, QX 16, QX 19 e QX 67.

Figura 14: Índice Enzimático (IE) de celulase, amilase e xilanase produzidas por 22 cepas de actinobactérias isoladas da região semiárida nordestina, Brasil.



Fonte: elaborada pela autora.

O gênero *Streptomyces* foi o principal encontrado entre as cepas que apresentaram atividade nas três enzimas, compondo 63% (catorze) das 22 relatadas, esse gênero é o principal produtor de xilanase entre actinobactérias (MUKHTAR *et al.*, 2017). Além da influência do gênero, outro fator que pode afetar a produção de enzimas é o local de origem, actinobactérias isoladas de sedimentos apresentam maior atividade proteolítica enquanto que as isoladas do solo apresentam maior atividade amilolítica e celulolítica (LAMILLA *et al.*, 2017).

### 3.3.2 Facilitação *in vitro*

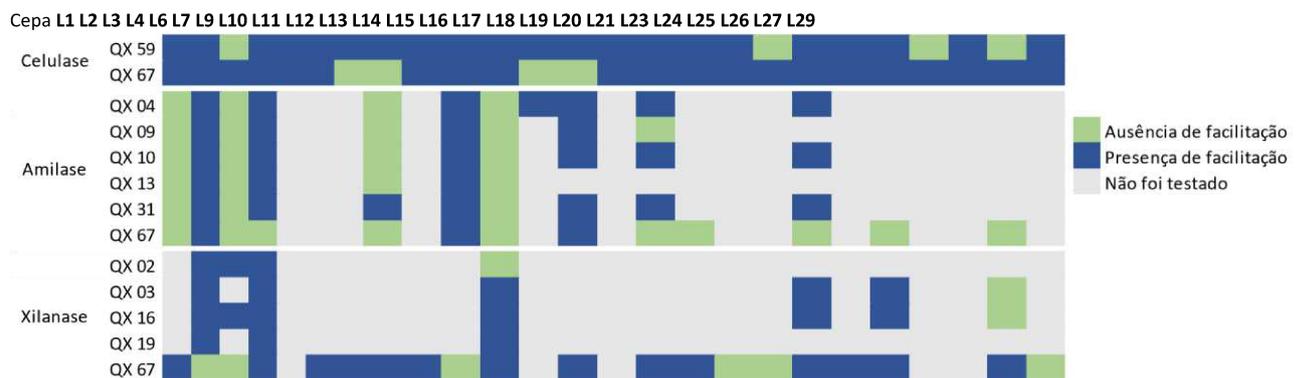
Nenhuma cepa de rizóbio apresentou capacidade de produzir celulase e xilanase, enquanto oito delas foram capazes de produzir amilase. As cepas de actinobactérias que se destacaram estatisticamente nos testes enzimáticos foram selecionadas para verificar a ocorrência de facilitação *in vitro*, sendo QX 59 e QX 67 para a facilitação no meio contido

celulose, QX 4, QX 9, QX 10, QX 13, QX 31 e QX 67 no meio contendo amido e QX 2, QX 3, QX 16, QX 19 e QX 67 no meio contendo xilana. Estas cepas foram selecionadas para serem cultivadas conjuntamente com as 19 cepas de rizóbios que não apresentaram atividade enzimática no meio de cultura testado. Todas as cepas selecionadas pertencem ao gênero *Streptomyces* exceto a cepa QX 9 que pertence ao gênero *Nocardia*.

Os resultados obtidos revelaram 103 relações positivas e 47 relações negativas (FIGURA 15). Todos os rizóbios foram capazes de manter uma interação positiva com as actinobactérias variando a cepa testada ou o meio de cultura utilizado.

Um teste binomial foi realizado para verificar a existência de diferenças significativas entre as proporções de ocorrência e não ocorrência de facilitação para cada cepa de actinobactéria. As cepas QX 59 ( $p = 0,01$ ) e QX 67 ( $p = 0,01$ ) no substrato celulose e as cepas QX 2 ( $p = 0,00$ ), QX 3 ( $p = 0,00$ ), QX 16 ( $p = 0,00$ ) e QX 19 ( $p = 0,00$ ) no substrato xilana apresentaram proporção maior de relações positivas. Nenhuma cepa apresentou diferença entre as proporções das relações positivas e negativas no substrato amido.

Figura 15: Facilitação entre 19 cepas de rizóbios e 11 cepas de actinobactérias, em três meios de cultura distintos.



Fonte: elaborada pela autora.

Nesse estudo, as cepas de rizóbios e actinobactérias apresentaram uma alta taxa de interações positivas, um dos fatores que influenciou esse resultado foi a composição da membrana externa dos rizóbios, classificados como bactérias Gram-negativas, enquanto que a atividade antimicrobiana das actinobactérias geralmente está relacionada a bactérias Grampositivas (CHAROUSOVÁ *et al.*, 2017). Além da sensibilidade ao tipo de membrana,

outro fator que afetou as interações microbianas foi a resistência presente nos genes, podendo ser adquirida no ambiente de origem (RELLER *et al.*, 2009). As cepas testadas nesse estudo são oriundas de regiões semiáridas, sendo adaptadas aos estresses ambientais, bióticos e abióticos, encontrados nesse meio.

Outro fator que afetou a ocorrência de facilitação foi a fonte de carbono presente no meio de cultura, cepas inoculadas no meio contendo amido apresentaram menores interações positivas. Esse carboidrato foi o único capaz de ser degradado pelos rizóbios e, além disso, a fonte de carbono afeta a síntese de metabólitos extracelulares (ARASU *et al.*, 2009) não sendo necessária a ação das actinobactérias.

A actinobactéria QX 67, por ter apresentado um alto desempenho nas três enzimas e por ter apresentado valores positivos nos testes *in vitro* foi selecionada para dar continuidade ao experimento sendo utilizada nos testes *in vivo*. Para a escolha dos rizóbios a serem utilizados foi realizada uma análise de agrupamento, com um procedimento não hierárquico de K-medias, utilizando os dados de caracterização cultural (Capítulo 2), sendo selecionadas as cepas presentes no grupo 1: L6, L16, L17, L21, L23 e L24.

### 3.3.3 Trocas gasosas foliar

Não teve diferença estatística entre as variáveis indicando trocas gasosas, sendo realizada uma MANOVA para medir a diferença entre os tratamentos (TABELA 6).

Tabela 6: Médias para Índice SPAD, CO<sub>2</sub> ambiente (C<sub>ref</sub>), concentração interna de CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub>), taxa de transpiração (E), condutância estomática (gs), fotossíntese (A), razão entre concentração interna e externa de CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub>/C<sub>a</sub>), eficiência de carboxilação (A/C<sub>i</sub>) e eficiência de carboxilação (A/C<sub>i</sub>) e eficiência instantânea no uso da água (A/E) para plantas de feijão-caupi com adubação nitrogenada, inoculada com estirpe padrão BR 3301 e inoculadas com a cepa de actinobactérias QX 67 e seis diferentes cepas de rizóbios.

---

SPAD	C <sub>ref</sub>	C <sub>i</sub>	E	gs	A	C <sub>i</sub> /C <sub>a</sub>	A/C <sub>i</sub>	A/E
			mmol.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup>	mol.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup>	mmol.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup>			

		(ppm)	(ppm)	2.s-1	1	1			
<b>BR 3301</b>	55,07±3,2	382,67±1,5	207±31,6	6,11±1,7	0,44±0,4	23,02±4,9	0,54±0,1	0,11±0,0	3,86±0,9
<b>Nitrogênio</b>	51,15±6,1	382,67±1,2	230±29,6	3,9±0,7	0,13±0,0	15,64±11,8	0,6±0,1	0,07±0,1	4,59±4,4
<b>QX 67 + L6</b>	52,6±5,6	382,33±0,6	245±34,2	7,9±1,6	0,48±0,1	19,8±8	0,64±0,1	0,08±0,0	2,43±0,6
<b>QX 67 + L16</b>	47,78±10,6	382,25±2,2	263,75±29,1	7,24±1,3	0,45±0,2	15,82±7,1	0,69±0,1	0,06±0,0	2,13±0,6
<b>QX 67 + L17</b>	58,53±1,2	382,25±1,3	228,5±62,1	6,73±0,7	0,36±0,1	17,66±7,9	0,6±0,2	0,09±0,1	2,66±1,2
<b>QX 67 + L21</b>	56,58±3,9	382,5±2,4	251,75±59,7	5,76±1,6	0,3±0,2	20,25±9,9	0,66±0,2	0,09±0,1	3,83±2,6
<b>QX 67 + L23</b>	54,95±5,6	383±1,7	210,33±67,8	7,27±1,6	0,47±0,2	23,49±8,4	0,55±0,2	0,13±0,1	3,35±1,5
<b>QX 67 + L24</b>	45,75±10,2	382,25±1,7	206,25±57,3	6,21±2,4	0,33±0,2	19,42±9,5	0,54±0,2	0,11±0,1	3,04±1,2
p-value	0,154	0,999	0,679	0,115	0,461	0,906	0,684	0,776	0,718

Fonte: elaborada pela autora.

### 3.3.4 Avaliação do desenvolvimento vegetativo

Houve diferença estatística entre as variáveis SDM, LDM, PN, ND, área foliar, HR e eficiência relativa, sendo realizado uma MANOVA para medir a diferença entre os tratamentos (TABELA 7). Na variável HR foi constatado que quanto menor a eficiência maior o tamanho da raiz, uma correlação negativa moderada ( $r = -0,53$ ,  $pvalue = 0,002$ ), porém todos os tratamentos apresentaram um acréscimo significativo em relação ao controle sem nitrogênio. Em relação a eficiência relativa, calculado em função da massa seca, a cepa L17 apresentou o mesmo valor que a estirpe padrão (72%), enquanto as cepas L6 e L23 apresentaram uma eficiência relativa maior, 75% e 87% respectivamente.

Tabela 7: Médias para massa seca da parte aérea (SDM), da raiz (RDM) e das folhas (LDM), peso dos nódulos secos (PN), número de nódulos por planta (ND), número de folhas (NL), altura da planta, caule até o ápice da haste principal (HP), área foliar, tamanho da raiz (HR) e eficiência relativa, para plantas de feijão-caupi com adubação nitrogenada, inoculada com estirpe padrão BR 3301 e inoculadas com a cepa de actinobactérias QX 67 e seis diferentes

	SDM (g)	RDM (g)	LDM (g)	PN (g)	ND	NL	HP (cm)	Área Foliar (cm <sup>2</sup> )	HR (cm)	Eficiência relativa
<b>BR 3301</b>	1,05±0,1b	0,76±0,2a	0,73±0,1b	0,08±0,0a	32±4,4a	12,67±1,5a	13,17±1,6a	197,46±16,3ab	20,33±1,5bc	0,72±0,1ab
<b>Nitrogênio</b>	1,46±0,8a	0,59±0,5a	1,01±0,6a	0±0b	1,25±2,5b	10,25±3,5a	12,13±3,9a	220,86±125,5a	15,13±3,9c	-
<b>QX 67 + L6</b>	0,9±0,5b	0,62±0,4a	0,63±0,3b	0,07±0,0a	38±11,5a	13,25±1,5a	12±2,5a	148,17±74,8ab	21,88±1,4b	0,75±0,3ab
<b>QX 67 + L16</b>	0,85±0,4b	0,59±0,3a	0,6±0,2b	0,08±0,0a	32,75±2,2a	12,5±1,9a	11±2,1a	130,9±62,9b	21,13±1,8b	0,58±0,2ab
<b>QX 67 + L17</b>	1,06±0,2b	0,69±0,2a	0,73±0,1b	0,12±0,0a	39,25±9,3a	14±0a	12,38±1,3a	179,07±29,0ab	22,13±2,0ab	0,72±0,1ab
<b>QX 67 + L21</b>	0,93±0,2b	0,58±0,1a	0,68±0,2b	0,12±0,0a	41,25±5,8a	12,5±1,7a	12,13±1,1a	178,82±30,6ab	25,63±1,7a	0,64±0,2ab
<b>QX 67 + L23</b>	1,09±0,4ab	0,6±0,2a	0,76±0,3ab	0,11±0,1a	35,5±11,3a	13,75±0,5a	11,88±1,1a	166,25±48,8ab	20,5±0,6bc	0,87±0,2ab
<b>QX 67 + L24</b>	0,74±0,2b	0,42±0,1a	0,53±0,1a	0,08±0,0a	35,75±10,9a	15,25±4,7a	11,13±1,8a	131,92±43,5b	25,5±1,3a	0,51±0,1b
p-value	0,001	0,568	0,001	0	0	0,474	0,349	0,007	0	0,023

Letras nas colunas comparando os diferentes tratamentos (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

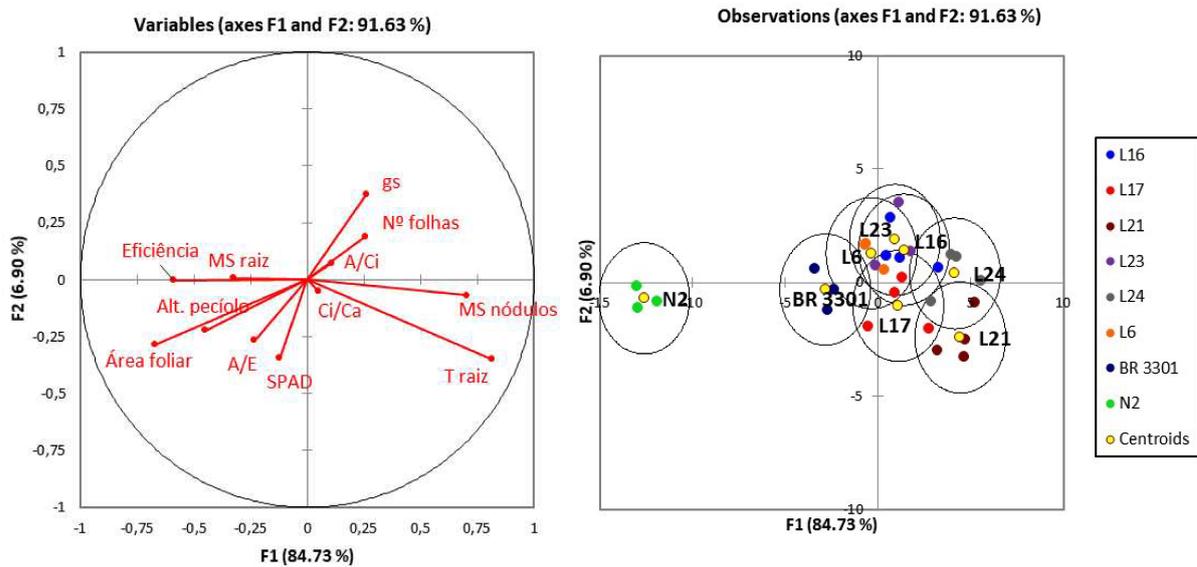
Fonte: elaborada pela autora.

O gênero *Bradyrhizobium* é o mais comumente encontrado em associações simbióticas com plantas de feijão-caupi (ZHANG *et al.*, 2008). Todas as cepas de rizóbios utilizadas no experimento pertencem a esse gênero *Bradyrhizobium*, incluindo a cepa padrão utilizada como controle, porém, não houve diferença significativa entre as cepas nos parâmetros biométricos e fisiológicos da planta, o que pode ter ocorrido devido à forte relação entre o genótipo da planta e o gênero de cepas utilizadas (MARINHO *et al.*, 2017).

Os efeitos da inoculação com actinobactéria ocorrem cedo nas plantas, podendo estar associada à colonização dos rizóbios, sinalização da planta ou síntese do fator Nod (LE; BALLARD; FRANCO, 2016). A inoculação conjunta de rizóbios e de bactérias também afeta o nível de nutrientes encontrado nas plantas, como relatado em estudos com soja (NIMNOI; PONGSILP; LUMYONG, 2014).

Com o intuito de classificar as cepas de rizóbios que apresentaram melhores desempenhos foi realizada uma análise discriminante (FIGURA 16), onde os tratamentos com as cepas de rizóbios foram comparados com o tratamento contendo a estirpe padrão (BR 3301). Para evitar a ocorrência de multicolienaridade, um dos pressupostos do teste, foram selecionadas apenas as variáveis  $g_s$ ,  $C_i/C_a$ ,  $A/C_i$ ,  $A/E$ , RDM, PN, NL, HP, Área foliar, HR, SPAD e Eficiência relativa.

Figura 16: Análise discriminante entre os valores de condutância estomática ( $g_s$ ), razão entre concentração interna e externa de  $CO_2$  ( $C_i/C_a$ ), eficiência de carboxilação ( $A/C_i$ ) e eficiência instantânea no uso da água ( $A/E$ ), índice SPAD, massa seca da raiz, peso dos nódulos secos, número de folhas, área foliar, tamanho da raiz (HR) e eficiência relativa, para plantas de feijão-caupi com adubação nitrogenada, inoculada com estirpe padrão BR 3301 e inoculadas com a cepa de actinobactérias QX 67 e seis diferentes cepas de rizóbios.



Fonte: elaborada pela autora.

O tratamento com adubação nitrogenada apresentou um centroide distinto dos demais, isso ocorreu devido aos valores de eficiência relativa, já que para o cálculo dessa variável é a divisão da massa de matéria seca da parte aérea dos tratamentos pela massa de matéria seca da parte aérea do tratamento com nitrogênio. As cepas que apresentaram um valor mais próximo ao inoculante com a cepa padrão foram a L6 (*Bradyrhizobium vignae*), L17 (*Bradyrhizobium sp.*) e L23 (*Bradyrhizobium yuanmingense*). As três cepas que apresentaram uma eficiência relativa igual ou superior a da cepa padrão.

Cepas de actinobactérias isoladas, independente da associação com rizóbios, podem trazer benefícios para as plantas, como controle de doenças (HAMDALI *et al.*, 2008) produção de sideróforos e de ácido indol acético (Le *et al.*, 2016). O intuito de estudar associações microbianas são os maiores benefícios trazidos pela interação do que pelos microrganismos isolados como mostrado em estudos com *Streptomyces*, rizóbios e fungos, que além de melhorar o crescimento e a nutrição da planta, também foram capazes de beneficiar a colonização da raiz em cultivo da soja (SAHUR *et al.*, 2018) e ervilha (BOER *et al.*, 2005).

### 3.4 Conclusão

A co-inoculação de microrganismos oriundos do semiárido, actinobactéria *Streptomyces* (QX 67) e os rizóbios *Bradyrhizobium vignae* (L6), *Bradyrhizobium sp.* (L17) e *Bradyrhizobium yuanmingense* (L23) apresentou uma eficiência relativa maior do que a cepa

padrão BR 3301 em feijão-caupi (*Vigna unguiculata*). O uso dessa co-inoculação obteve uma maior eficiência, podendo trazer uma produção maior, a um custo baixo, levando melhorias para a produção no semiárido de feijão caupi. Além dos benefícios para a comunidade microbiana nos solos da região, através do uso de microrganismos selecionados que já estão presentes e são capazes de competir, resistir ao estresse e interagir com outros grupos microbianos.

## REFERÊNCIAS

ALARIYA, Shyam Sunder et al. Amylase activity of a starch degrading bacteria isolated from soil. **Archives of applied science Research**, v. 5, n. 1, p. 15-24, 2013.

ANSARI, Rizwan Ali; MAHMOOD, Irshad. Optimization of organic and bio-organic fertilizers on soil properties and growth of pigeon pea. **Scientia Horticulturae**, v. 226, p. 1-9, 2017.

ARASU, M. Valan et al. In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). **Journal de Mycologie Médicale**, v. 19, n. 1, p. 22-28, 2009.

BERGERSEN, F. J. et al. Studies of natural populations and mutants of *Rhizobium* in the improvement of legume inoculants. **Plant and Soil**, v. 35, p. 3-16, 1971.

BOER, Wietse de et al. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. **FEMS microbiology reviews**, v. 29, n. 4, p. 795-811, 2005.

CHAROUSOVÁ, Ivana et al. Antimicrobial and enzymatic activity of actinomycetes isolated from soils of coastal islands. **Journal of advanced pharmaceutical technology & research**, v. 8, n. 2, p. 46, 2017.

CLARK, Francis E. Actinomycetes. **Methods of Soil Analysis: Part 2 Chemical and Microbiological Properties**, v. 9, p. 1498-1501, 1965.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO CONAB. Acompanhamento da safra brasileira: grãos, v. 5 - safra 2019/20- n. 4 - quarto levantamento, março 2018. Disponível em: [www.conab.gov.br](http://www.conab.gov.br) Acesso em: 15 de mar. 2020.

COURI, Sonia; FARIAS, Antonio Xavier. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. **Rev. Microbiol**, p. 314-7, 1995.

DE ALMEIDA BRESSIANI, Danielle et al. Review of soil and water assessment tool (SWAT) applications in Brazil: Challenges and prospects. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, v. 8, n. 3, p. 9-35, 2015.

DÖBEREINER, Johanna; BALDANI, Vera Lúcia Divan; BALDANI, José Ivo. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Embrapa SPI, 1995.

FUNCEME: Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos. **Dados dos postos pluviométricos do Ceará, 2017**. Disponível em:

<<http://www.funceme.br/app/calendario/produto/municipios/maxima/diario?data=hoje>>

Acesso em: 15 fev. 2017.

HAMDALI, Hanane et al. Rock phosphate-solubilizing Actinomycetes: screening for plant growth-promoting activities. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 2565-2575, 2008.

HANKIN, Lester; ANAGNOSTAKIS, Sandra L. Solid media containing carboxymethylcellulose to detect Cx cellulase activity of micro-organisms. **Microbiology**, v. 98, n. 1, p. 109-115, 1977.

IBM Corp. **IBM SPSS Statistics for Windows**, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp. Released 2011.

IUSS WORKING GROUP et al. World reference base for soil resources 2014. International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. **(No Title)**, 2014.

KUMAR, Vijay et al. Screening of actinomycetes from earthworm castings for their antimicrobial activity and industrial enzymes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 205-214, 2012.

LAMILLA, Claudio et al. Bioprospecting for extracellular enzymes from culturable Actinobacteria from the South Shetland Islands, Antarctica. **Polar Biology**, v. 40, n. 3, p. 719-726, 2017.

LE, Xuyen H. et al. Isolation and characterisation of endophytic actinobacteria and their effect on the early growth and nodulation of lucerne (*Medicago sativa* L.). **Plant and Soil**, v. 405, p. 13-24, 2016.

LE, Xuyen H.; BALLARD, Ross A.; FRANCO, Christopher MM. Effects of endophytic *Streptomyces* and mineral nitrogen on Lucerne (*Medicago sativa* L.) growth and its symbiosis with rhizobia. **Plant and Soil**, v. 405, p. 25-34, 2016.

MARINHO, Rita de Cássia Nunes et al. Symbiotic and agronomic efficiency of new cowpea rhizobia from Brazilian Semi-Arid. **Bragantia**, v. 76, p. 273-281, 2017.

MUKHTAR, Salma et al. Actinomycetes: a source of industrially important enzymes. **J Proteomics Bioinform**, v. 10, n. 12, p. 316-319, 2017.

NIMNOI, Pongrawee; PONGSILP, Neelawan; LUMYONG, Saisamorn. Co-inoculation of soybean (*Glycine max*) with actinomycetes and *Bradyrhizobium japonicum* enhances plant

growth, nitrogenase activity and plant nutrition. **Journal of Plant Nutrition**, v. 37, n. 3, p. 432-446, 2014.

PEREIRA, João Carlos; NEVES, Maria Cristina Prata; DROZDOWICZ, Adam. Influência da antibiose exercida por actinomicetos às estirpes de *Bradyrhizobium* spp., na nodulação da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, p. 99-108, 1999.

PINHEIRO, M. S. et al. Isolation and screening of rhizobial strains native from semiarid tolerant to environmental stress. **Encicl. Biosf**, v. 10, p. 2071-2082, 2014.

RELLER, L. Barth et al. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. **Clinical infectious diseases**, v. 49, n. 11, p. 1749-1755, 2009.

ROBLEDO, Marta et al. Role of *Rhizobium* cellulase CelC2 in host root colonization and infection. **Biological Nitrogen Fixation**, p. 525-532, 2015.

SAHUR, Asmiaty et al. Effect of Seed Inoculation with Actinomycetes and *Rhizobium* Isolated from Indigenous Soybean and Rhizosphere on Nitrogen Fixation, Growth, and Yield of Soybean. **International Journal of Agronomy**, 2018.

SANTOS, HG dos et al. Embrapa: Sistema brasileiro de classificação de solos. 2018.

SOARES, Bruno Lima et al. Cowpea symbiotic efficiency, pH and aluminum tolerance in nitrogen-fixing bacteria. **Scientia Agricola**, v. 71, p. 171-180, 2014.

TRABELSI, Darine et al. Appraisal of the crop-rotation effect of rhizobial inoculation on potato cropping systems in relation to soil bacterial communities. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 54, p. 1-6, 2012.

TRABELSI, Darine et al. Effect of on-field inoculation of *Phaseolus vulgaris* with rhizobia on soil bacterial communities. **FEMS microbiology ecology**, v. 77, n. 1, p. 211-222, 2011.

VINCENT, James Matthew et al. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. **A manual for the practical study of the root-nodule bacteria.**, 1970.

ZAINUDDIN, D. U.; SYAM'UN, E.; DACHLAN, A. Production of soybean in the application of *Rhizobium* spp. and *Actinomycetes* spp. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, 2019. p. 012251.

ZHANG, Yong Fa et al. *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium yuanmingense* and *Bradyrhizobium japonicum* are the main rhizobia associated with *Vigna unguiculata* and *Vigna radiata* in the subtropical region of China. **FEMS Microbiology Letters**, v. 285, n. 2, p. 146-154, 2008.

## REFERÊNCIAS

- ABRAMO, Giovanni; D'ANGELO, Ciriaco Andrea. How do you define and measure research productivity?. **Scientometrics**, [s.l.] v. 101, p. 1129-1144, 2014.
- ALARIYA, Shyam Sunder et al. Amylase activity of a starch degrading bacteria isolated from soil. **Archives of applied science Research**, [s.l.]. v. 5, n. 1, p. 15-24, 2013.
- ALI, Syed Raju et al. Isolation, characterization and symbiotic performance evaluation of soybean (*Glycine max*) nodulating rhizobia from different districts of Bangladesh. **Journal of Bioscience and Biotechnology Discovery**, [s.l.]. v. 4, n. 1, p. 10-20, 2019.
- AMULE, F. et al. Effect of actinobacterial, rhizobium and plant growth promoting rhizobacteria consortium inoculation on rhizosphere soil properties in soybean in Jabalpur district of Madhya Pradesh. **International Journal of Consumer Studies**, [s.l.]. v. 6, n. 1, p. 583-586, 2018.
- ANAND, Akhil et al. Surviving and thriving in terms of symbiotic performance of antibiotic and phage-resistant mutants of *Bradyrhizobium* of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. **Current microbiology**, [s.l.]. v. 65, p. 390-397, 2012.
- ANSARI, Rizwan Ali; MAHMOOD, Irshad. Optimization of organic and bio-organic fertilizers on soil properties and growth of pigeon pea. **Scientia Horticulturae**, [s.l.]. v. 226, p. 1-9, 2017.
- ARASU, M. Valan et al. In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). **Journal de Mycologie Médicale**, [s.l.]. v. 19, n. 1, p. 22-28, 2009.
- ARIA, Massimo; CUCCURULLO, Corrado. bibliometrix: An R-tool for comprehensive science mapping analysis. **Journal of informetrics**, [s.l.]. v. 11, n. 4, p. 959-975, 2017.
- AUGUSTINE, Deepthi et al. Actinobacteria from sediment samples of Arabian Sea and Bay of Bengal: biochemical and physiological characterization. **International Journal of Research in Marine Sciences**, [s.l.] v. 2, n. 2, p. 56-63, 2013.
- AUNG, Zaw Htwe; TAKEO, Yamakawa. Enhanced plant growth and/or nitrogen fixation by leguminous and non-leguminous crops after single or dual inoculation of *Streptomyces griseoflavus* P4 with *Bradyrhizobium* strains. **African Journal of Microbiology Research**, [s.l.] v. 9, n. 49, p. 2337-2344, 2015.
- BARKA, Essaid Ait et al. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. **Microbiology and molecular biology reviews**, [s.l.]. v. 80, n. 1, p. 1-43, 2016.
- BARRION, M.; HABTE, M. Interaction of *Bradyrhizobium* sp. with an antagonistic actinomycete in culture medium and in soil. **Biology and fertility of soils**, [s.l.]. v. 6, p. 306-310, 1988.

BERGERSEN, F. J. et al. Studies of natural populations and mutants of Rhizobium in the improvement of legume inoculants. **Plant and Soil**, [s.l.] v. 35, p. 3-16, 1971.

BILYK, Oksana; LUZHETSKYY, Andriy. Metabolic engineering of natural product biosynthesis in actinobacteria. **Current opinion in biotechnology**, [s.l.] v. 42, p. 98-107, 2016.

BOER, Wietse de et al. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. **FEMS microbiology reviews**, [s.l.] v. 29, n. 4, p. 795-811, 2005.

BORNMANN, Lutz; MUTZ, Rüdiger. Growth rates of modern science: A bibliometric analysis based on the number of publications and cited references. **Journal of the association for information science and technology**, [s.l.] v. 66, n. 11, p. 2215-2222, 2015.

BOUCHEZ, Théodore et al. Molecular microbiology methods for environmental diagnosis. **Environmental Chemistry Letters**, [s.l.] v. 14, p. 423-441, 2016.

CALDWELL, Bruce A. Enzyme activities as a component of soil biodiversity: a review. **Pedobiologia**, [s.l.] v. 49, n. 6, p. 637-644, 2005.

CARVALHO, M. F. et al. Endophytic actinobacteria for sustainable agricultural applications. Endophytes: **Crop Productivity and Protection**: [s.l.] v. 2, p. 163-189, 2017.

CHANG, Ed-Haun et al. The effect of altitudinal gradient on soil microbial community activity and structure in moso bamboo plantations. **Applied Soil Ecology**, [s.l.] v. 98, p. 213-220, 2016.

CHAROUSOVÁ, Ivana et al. Antimicrobial and enzymatic activity of actinomycetes isolated from soils of coastal islands. **Journal of advanced pharmaceutical technology & research**, [s.l.] v. 8, n. 2, p. 46, 2017.

CHAUDHARY, Nazia; PRABHU, Shraddha. Thermophilic actinomycetes from hot water spring capable of producing enzymes of industrial importance. **Int j res stud biosci**, [s.l.] v. 4, p. 29-35, 2016.

CHELIUS, M. K.; TRIPLETT, E. W. The Diversity of Archaea and Bacteria in Association with the Roots of Zea mays L. **Microbial ecology**, [s.l.] p. 252-263, 2001.

CHRONI, Christina et al. Investigation of the microbial community structure and activity as indicators of compost stability and composting process evolution. **Bioresource technology**, [s.l.] v. 100, n. 15, p. 3745-3750, 2009.

CLARK, Francis E. Actinomycetes. Methods of Soil Analysis: Part 2 **Chemical and Microbiological Properties**, [s.l.] v. 9, p. 1498-1501, 1965.

- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO CONAB. Acompanhamento da safra brasileira: grãos, v. 5 - safra 2017/18- n. 6 - sexto levantamento, março 2018. Disponível em: [www.conab.gov.br](http://www.conab.gov.br) Acesso em: 15 de mar. 2020.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO CONAB. Acompanhamento da safra brasileira: grãos, v. 5 - safra 2019/20- n. 4 - quarto levantamento, março 2018. Disponível em: [www.conab.gov.br](http://www.conab.gov.br) Acesso em: 15 de mar. 2020.
- COURI, Sonia; FARIAS, Antonio Xavier. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. **Rev. Microbiol**, [s.l.] p. 314-7, 1995.
- DA SILVA, Valeria Borges et al. Fast and efficient symbiotic gene-based duplex PCR approach for the preliminary selection of legume root nodule bacteria. **Rhizosphere**, [s.l.] v. 10, p. 100144, 2019.
- DA SILVA, Valeria Borges **Micro-organismos colonizadores de nódulos de *Vigna* spp. cultivadas em solos de caatinga**. Tese (Doutorado em Ciência do Solo), Universidade Federal da Paraíba. Paraíba, p. 158. 2020.
- DAMIRGI, Salih M.; JOHNSON, Herbert W. Effect of Soil Actinomycetes on Strains of *Rhizobium japonicum* 1. **Agronomy Journal**, [s.l.] v. 58, n. 2, p. 223-224, 1966.
- DAS, Payal; SOLANKI, Renu; KHANNA, Monisha. Isolation and screening of cellulolytic actinomycetes from diverse habitats. **International Journal of Advanced Biotechnology and Research**, [s.l.] v. 5, n. 3, p. 438-451, 2014.
- DATTA, Abhinav et al. An effective and beneficial plant growth promoting soil bacterium “*Rhizobium*”: a review. **Ann Plant Sci**, [s.l.] v. 4, n. 1, p. 933-942, 2015.
- DE ALMEIDA BRESSIANI, Danielle et al. Review of soil and water assessment tool (SWAT) applications in Brazil: Challenges and prospects. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, [s.l.] v. 8, n. 3, p. 9-35, 2015.
- DE JESUS MORAES, Nayara et al. Bradyrhizobium sp. inoculation ameliorates oxidative protection in cowpea subjected to long-term composted tannery sludge amendment. **European Journal of Soil Biology**, [s.l.] v. 76, p. 35-45, 2016.
- DE SOUSA, Juliani Barbosa et al. In Vitro Coinoculation Between Actinobacteria and Diazotrophic Nodulating Bacteria from the Semiarid. **Revista de Gestão Social e Ambiental**, [s.l.] v. 17, n. 9, p. e04127-e04127, 2023.
- DE VRIES, Maria et al. Metagenomic analyses reveal no differences in genes involved in cellulose degradation under different tillage treatments. **FEMS microbiology ecology**, [s.l.] v. 91, n. 7, p. fiv069, 2015.
- DING, Dong et al. Culturable actinomycetes from desert ecosystem in northeast of Qinghai-Tibet Plateau. **Annals of Microbiology**, [s.l.]v. 63, n. 1, p. 259-266, 2013.

- DÖBEREINER, Johanna; BALDANI, Vera Lúcia Divan; BALDANI, José Ivo. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Seropédica: Embrapa SPI, 1995.
- DOS SANTOS, Jonnathan Whiny Moraes et al. Molecular and symbiotic characterization of peanut bradyrhizobia from the semi-arid region of Brazil. **Applied Soil Ecology**, [s.l.] v. 121, p. 177-184, 2017.
- FERNANDES, Maria Josefa; CORDEIRO, Lázara. Efeito da inoculação conjunta de rizóbio e microrganismos antagônicos a rizóbio na nodulação e desenvolvimento de neotonia wightii lackley. **Boletim de Indústria Animal**, [s.l.]. v. 54, n. 2, p. 39-44, 1997.
- FERNANDEZ-REAL, José-Manuel et al. Gut microbiota interacts with brain microstructure and function. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [s.l.]. v. 100, n. 12, p. 4505-4513, 2015.
- FIGUEREDO, María Soledad et al. Induced systemic resistance and symbiotic performance of peanut plants challenged with fungal pathogens and co-inoculated with the biocontrol agent Bacillus sp. CHEP5 and Bradyrhizobium sp. SEMIA6144. **Microbiological research**, [s.l.] v. 197, p. 65-73, 2017.
- FUENTES, María S. et al. Selection of an actinobacteria mixed culture for chlordane remediation. Pesticide effects on microbial morphology and bioemulsifier production. **Journal of Basic microbiology**, [s.l.] v. 56, n. 2, p. 127-137, 2016.
- FUNCEME: Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos. Dados dos postos pluviométricos do Ceará, 2017. Disponível em:  
<<http://www.funceme.br/app/calendario/produto/municipios/maxima/diario?data=hoje>>  
Acesso em: 15 fev. 2017.
- FYANS, Joanna K.; BOWN, Luke; BIGNELL, Dawn RD. Isolation and characterization of plant-pathogenic Streptomyces species associated with common scab-infected potato tubers in Newfoundland. **Phytopathology**, [s.l.] v. 106, n. 2, p. 123-131, 2016.
- GAGE, Daniel J. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. **Microbiology and molecular biology reviews**, [s.l.] v. 68, n. 2, p. 280-300, 2004.
- GARCIA-LEMOES, Adriana M. et al. Under the christmas tree: Belowground bacterial associations with Abies Nordmanniana across production systems and plant development. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.] v. 11, p. 198, 2020.
- GLYAN'KO, A. K. Signaling systems of rhizobia (Rhizobiaceae) and leguminous plants (Fabaceae) upon the formation of a legume-rhizobium symbiosis. **Applied biochemistry and microbiology**, [s.l.] v. 51, p. 494-504, 2015.

GOMES, Karen Machado; DUARTE, Rafael Silva; DE FREIRE BASTOS, Maria do Carmo. Lantibiotics produced by Actinobacteria and their potential applications (a review).

**Microbiology**, [s.l.] v. 163, n. 2, p. 109-121, 2017.

GREENACRE, Michael. **Correspondence analysis in practice**. CRC press, s.l. s.n.2017.

GREGOR, A. K.; KLUBEK, Brian; VARSA, E. C. Identification and use of actinomycetes for enhanced nodulation of soybean co-inoculated with Bradyrhizobium japonicum.

**Canadian journal of microbiology**, [s.l.] v. 49, n. 8, p. 483-491, 2003.

HAMDALI, Hanane et al. Rock phosphate-solubilizing Actinomycetes: screening for plant growth-promoting activities. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s.l.] v. 24, p. 2565-2575, 2008.

HAN, Cheng-Long et al. Responses of soil microorganisms, carbon and nitrogen to freeze–thaw cycles in diverse land-use types. **Applied Soil Ecology**, [s.l.] v. 124, p. 211-217, 2018.

HANKIN, Lester; ANAGNOSTAKIS, Sandra L. Solid media containing carboxymethylcellulose to detect Cx cellulase activity of micro-organisms. **Microbiology**, [s.l.] v. 98, n. 1, p. 109-115, 1977.

HOUFANI, Aicha Asma et al. Cellulase– hemicellulase activities and bacterial community composition of different soils from Algerian ecosystems. **Microbial ecology**, [s.l.] v. 77, p. 713-725, 2019.

HTWE, Aung Zaw 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, 2019.

IBM Corp. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp. Released 2011.

IUSS WORKING GROUP et al. **World reference base for soil resources 2014**.

International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. (No Title), [s.l.] [s.n.] 2014.

JARAK, Mirjana et al. Plant growth-promoting rhizobacteria in bean production. **Acta Horticulturae**, [s.l.] n. 960, p. 409, 2012.

JHA, Prabhat N. et al. Alterations in the endophyte-enriched root-associated microbiome of rice receiving growth-promoting treatments of urea fertilizer and Rhizobium biofertilizer.

**Microbial ecology**, [s.l.] v. 79, p. 367-382, 2020.

JIANG, Yi et al. Isolation and cultivation methods of Actinobacteria. **Actinobacteria-basics and biotechnological applications**, [s.l.] p. 39-57, 2016.

JU, Wenliang et al. Co-inoculation effect of plant-growth-promoting rhizobacteria and rhizobium on EDDS assisted phytoremediation of Cu contaminated soils. **Chemosphere**, [s.l.] v. 254, p. 126724, 2020.

KAMIL, Fatima H. et al. Biological control of mango dieback disease caused by *Lasiodiplodia theobromae* using streptomycete and non-streptomycete actinobacteria in the United Arab Emirates. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.] v. 9, p. 829, 2018.

KARANJA, E. N. et al. Optimization of growth conditions and characterization of enzymatic activity of selected novel *Streptomyces* species from Kenyan soils. 2012. <  
<https://repository.maseno.ac.ke/handle/123456789/1655>> Acesso em: 15 de agosto de 2020.

KELLENBERGER, Eduard. Exploring the unknown. **EMBO reports**, [s.l.] v. 2, n. 1, p. 5-7, 2001.

KERN, Martha E. **Micologia médica: texto e atlas**. [s.l.], Editorial Premier, 1999.

KRISHNAKUMAR, S.; BAI, V.; PREMKUMAR, J. Production of alpha amylase by salt-Tolerant Actinomycete *Streptomyces* sp.–SBU3 isolated from marine sponge, **Indian Journal of Geo-Marine Sciences** [s.l.].v.44, n.4, p. 583-588, 2015.

KUMAR, Pankaj et al. Inoculation of siderophore producing rhizobacteria and their consortium for growth enhancement of wheat plant. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, [s.l.] v. 15, p. 264-269, 2018.

KUMAR, Vijay et al. Screening of actinomycetes from earthworm castings for their antimicrobial activity and industrial enzymes. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s.l.] v. 43, p. 205-214, 2012.

LAMILLA, Claudio et al. Bioprospecting for extracellular enzymes from culturable Actinobacteria from the South Shetland Islands, Antarctica. **Polar Biology**, [s.l.] v. 40, n. 3, p. 719-726, 2017.

LE, Xuyen H. et al. Isolation and characterisation of endophytic actinobacteria and their effect on the early growth and nodulation of lucerne (*Medicago sativa* L.). **Plant and Soil**, [s.l.] v. 405, p. 13-24, 2016.

LE, Xuyen H.; BALLARD, Ross A.; FRANCO, Christopher MM. Effects of endophytic *Streptomyces* and mineral nitrogen on Lucerne (*Medicago sativa* L.) growth and its symbiosis with rhizobia. **Plant and Soil**, [s.l.] v. 405, p. 25-34, 2016.

LEWIN, Gina R. et al. Evolution and ecology of Actinobacteria and their bioenergy applications. **Annual review of microbiology**, [s.l.] v. 70, p. 235-254, 2016.

LI, De-Ming; ALEXANDER, Martin. Co-inoculation with antibiotic-producing bacteria to increase colonization and nodulation by rhizobia. **Plant and Soil**, [s.l.] v. 108, p. 211-219, 1988.

- LI, Ning et al. Cloning, expression, and characterization of a new xylanase with broad temperature adaptability from *Streptomyces* sp. S9. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.] v. 80, p. 231-240, 2008.
- LIMA, José Vinícius Leite 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, 2017.
- LINDSTRÖM, Kristina; AMSALU ASERSE, Aregu; MOUSAVI, Seyed Abdollah. **Evolution and taxonomy of nitrogen-fixing organisms with emphasis on rhizobia. Biological nitrogen fixation**, [s.l.] [s.n.] p. 21-38, 2015.
- MAHALAKSHMI, V.; BHAGAWATI, Ditisha. Testing the efficacy of phytohormones of microbial origin in promoting plant growth. **J. Microbiol. Biotechnol. Res**, [s.l.] v. 7, n. 1, p. 1-8, 2017.
- MANIVASAGAN, Panchanathan et al. Actinobacteria mediated synthesis of nanoparticles and their biological properties: A review. **Critical reviews in microbiology**, [s.l.] v. 42, n. 2, p. 209-221, 2016.
- MARINHO, Rita de Cássia Nunes et al. **Symbiotic and agronomic efficiency of new cowpea rhizobia from Brazilian Semi-Arid**. *Bragantia*, [s.n.] v. 76, p. 273-281, 2017.
- MARKMANN, Katharina; GICZEY, Gábor; PARNISKE, Martin. Functional adaptation of a plant receptor-kinase paved the way for the evolution of intracellular root symbioses with bacteria. **PLoS biology**, [s.l.] v. 6, n. 3, p. e68, 2008.
- MEHTA, Harish Kumar et al. Influence of Biofertilizers, Vermicompost and Chemical Fertilizers on Growth, Nodulation, Nutrient Uptake, Seed Yield and Economics of Black Gram. **International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology**, [s.l.] v. 6, n.3, p.249-251, 2015.
- MENÉNDEZ, Esther et al. **Rhizobium Symbiotic Enzyme Cellulase CelC2: Properties and Applications**. *In: New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 81-89.
- MINGMA, Ratchanee et al. Isolation of rhizospheric and roots endophytic actinomycetes from Leguminosae plant and their activities to inhibit soybean pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. *glycine*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s.l.] v. 30, p. 271-280, 2014.
- MINOTTO, Elisandra et al. Enzyme characterization of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants. **Journal of Advanced Scientific Research**, [s.l.] v. 5, n. 02, p. 16-23, 2014.
- MISK, Azza; FRANCO, Christopher. Biocontrol of chickpea root rot using endophytic actinobacteria. **BioControl**, [s.l.] v. 56, p. 811-822, 2011.

MUELLER, J. G. et al. Intrinsic antibiotic resistance in *Bradyrhizobium japonicum*. **Soil Biology and Biochemistry**, [s.l.] v. 20, n. 6, p. 879-882, 1988.

MUKHTAR, Salma et al. Actinomycetes: a source of industrially important enzymes. **J Proteomics Bioinform**, [s.l.] v. 10, n. 12, p. 316-319, 2017.

NAUTIYAL, C. Shekhar. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS microbiology Letters**, [s.l.] v. 170, n. 1, p. 265-270, 1999.

NIMNOI, Pongrawee; PONGSILP, Neelawan; LUMYONG, Saisamorn. Co-inoculation of soybean (*Glycine max*) with actinomycetes and *Bradyrhizobium japonicum* enhances plant growth, nitrogenase activity and plant nutrition. **Journal of Plant Nutrition**, [s.l.] v. 37, n. 3, p. 432-446, 2014.

NITHYA, B.; PONMURUGAN, P. Studies on actinomycetes diversity in Eastern Ghats (Yercaud Hills) of Southern India for secondary metabolite production. **Int J Agric Res**, [s.l.] v. 7, n. 3, p. 152-159, 2012.

NITHYA, Krishnasamy et al. Purification, characterization, and statistical optimization of a thermostable  $\alpha$ -amylase from desert actinobacterium *Streptomyces fragilis* DA7-7. **3 Biotech**, [s.l.] v. 7, p. 1-13, 2017.

OUBAHA, Brahim et al. The potential of antagonistic moroccan *Streptomyces* isolates for the biological control of damping-off disease of pea (*Pisum sativum* L.) caused by *Aphanomyces euteiches*. **Journal of Phytopathology**, [s.l.] v. 167, n. 2, p. 82-90, 2019.

PARMAR, Nagina; DUFRESNE, Jaimie. **Beneficial interactions of plant growth promoting rhizosphere microorganisms. Bioaugmentation, biostimulation and biocontrol**, [s.l.] [s.n.] p. 27-42, 2011.

PASSARI, Ajit Kumar et al. In vitro and in vivo plant growth promoting activities and DNA fingerprinting of antagonistic endophytic actinomycetes associates with medicinal plants. **PLoS one**, [s.l.] v. 10, n. 9, p. e0139468, 2015.

PATEL, J. J. Antagonism of actinomycetes against rhizobia. **Plant and Soil**, [s.l.] v. 41, p. 395-402, 1974.

PEREIRA, João Carlos; NEVES, Maria Cristina Prata; DROZDOWICZ, Adam. Influência da antibiose exercida por actinomicetos às estirpes de *Bradyrhizobium* spp., na nodulação da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [s.l.] v. 34, p. 99-108, 1999.

PÉREZ-MONTAÑO, F. et al. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. **Microbiological research**, [s.l.] v. 169, n. 5-6, p. 325-336, 2014.

PINHEIRO, M. S. et al. Isolation and screening of rhizobial strains native from semiarid tolerant to environmental stress. **Encicl. Biosf**, [s.l.] v. 10, p. 2071-2082, 2014.

PINHEIRO, Marcelo de S. et al. Root Nodule Preparation as a Low-Cost Inoculant for Cowpea. **Journal of Agricultural Science**, [s.l.] v. 11, n. 14, p. 265, 2019.

PUGASHETTI, B. K.; ANGLE, J. S.; WAGNER, G. H. Soil microorganisms antagonistic towards *Rhizobium japonicum*. **Soil Biology and Biochemistry**, [s.l.] v. 14, n. 1, p. 45-49, 1982.

QIN, Sheng et al. Actinobacteria in special and extreme habitats: Diversity, function roles, and environmental adaptations. **Frontiers in microbiology**, [s.l.] v. 7, p. 1415, 2016.

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

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

RAHMANI, Nanik et al. Xylanase and feruloyl esterase from actinomycetes cultures could enhance sugarcane bagasse hydrolysis in the production of fermentable sugars. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, [s.l.] v. 82, n. 5, p. 904-915, 2018.

RAMANJANEYULU, G. et al. Xylanase-producing microflora in eastern ghats of andhra pradesh, India. **Journal of forestry research**, [s.l.] v. 28, p. 291-298, 2017.

RASSEM, Abdousslam M.; DAVID, Arun A. In-Vitro evaluates antagonism strains of actinomycetes on growth strains of *Rhizobium*. **World Journal of pharmacy and pharmaceutical sciences**, [s.l.] v. 6, n. 3, p. 894-903, 2017.

RELLER, L. Barth et al. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. **Clinical infectious diseases**, [s.l.] v. 49, n. 11, p. 1749-1755, 2009.

RL, Raghunatha Reddy et al. Review of trends in soil fertility research (2007–2016) using Scopus database. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, [s.l.] v. 50, n. 8, p. 1063-1080, 2019.

ROBLEDO, Marta et al. **Role of *Rhizobium cellulase CelC2* in host root colonization and infection**. **Biological Nitrogen Fixation**, [s.l.] [s.n.] p. 525-532, 2015.

RUIU, Luca. Insect pathogenic bacteria in integrated pest management. **Insects**, [s.l.] v. 6, n. 2, p. 352-367, 2015.

SAEID, Agnieszka; PROCHOWNIK, Ewelina; DOBROWOLSKA-IWANEK, Justyna. Phosphorus solubilization by *Bacillus* species. **Molecules**, [s.l.] v. 23, n. 11, p. 2897, 2018.

- SAHUR, Asmiaty et al. Effect of Seed Inoculation with Actinomycetes and Rhizobium Isolated from Indigenous Soybean and Rhizosphere on Nitrogen Fixation, Growth, and Yield of Soybean. **International Journal of Agronomy**, [s.l.] 2018.
- SAIF, Saima et al. Role of phosphate-solubilizing actinomycetes in plant growth promotion: current perspective. Phosphate Solubilizing Microorganisms: **Principles and Application of Microphos Technology**, [s.l.] p. 137-156, 2014.
- SAINI, Anita; AGGARWAL, Neeraj K.; YADAV, Anita. Cellulolytic potential of actinomycetes isolated from different habitats. **Bioeng. Biosci**, [s.l.] v. 4, n. 5, 2016.
- SANJIVKUMAR, Muthusamy et al. Biosynthesis, purification and characterization of  $\beta$ -1, 4-xylanase from a novel mangrove associated actinobacterium *Streptomyces olivaceus* (MSU3) and its applications. **Protein Expression and Purification**, [s.l.] v. 130, p. 1-12, 2017.
- SANTIAGO, Christine D. et al. Bacterial compatibility in combined inoculations enhances the growth of potato seedlings. **Microbes and environments**, [s.l.] v. 32, n. 1, p. 14-23, 2017.
- SANTOS, HG dos et al. **Embrapa: Sistema brasileiro de classificação de solos**. [s.l.] [s.n.] 2018.
- SCOTT, Jarrod J. et al. Microbial community structure of leaf-cutter ant fungus gardens and refuse dumps. **PLoS one**, [s.l.] v. 5, n. 3, p. e9922, 2010.
- SILVA, Valéria Maria Araujo et al. 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, 2019.
- SINGH, S. P.; GAUR, R. Evaluation of antagonistic and plant growth promoting activities of chitinolytic endophytic actinomycetes associated with medicinal plants against *Sclerotium rolfsii* in chickpea. **Journal of applied microbiology**, [s.l.] v. 121, n. 2, p. 506-518, 2016.
- SOARES, Bruno Lima et al. Cowpea symbiotic efficiency, pH and aluminum tolerance in nitrogen-fixing bacteria. **Scientia Agricola**, [s.l.] v. 71, p. 171-180, 2014.
- SOE, Khin Myat; YAMAKAWA, Takeo. 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, 2013.
- SOLANS, Mariana; RUIZ, Oscar A.; WALL, Luis G. Effect of actinobacteria on *Lotus tenuis*–*Mesorhizobium loti* symbiosis: preliminary study. **Symbiosis**, [s.l.] v. 65, n. 1, p. 33-37, 2015.
- SOLANS, Mariana; VOBIS, Gernot; WALL, Luis Gabriel. Saprophytic actinomycetes promote nodulation in *Medicago sativa*-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis in the presence of high N. **Journal of Plant Growth Regulation**, [s.l.] v. 28, p. 106-114, 2009.

SULTAN, M. Zakir et al. In vitro antibacterial activity of an active metabolite isolated from *Streptomyces* species. **Biotechnology Research**, [s.l.] v. 1, n. 2, p. 100-106, 2002.

TANG, Li; SHAPIRA, Philip; YOUTIE, Jan. Is there a clubbing effect underlying Chinese research citation Increases?. **Journal of the Association for Information Science and Technology**, [s.l.] v. 66, n. 9, p. 1923-1932, 2015.

TEIXEIRA, Paulo César et al. **Manual de métodos de análise de solo**. [s.l.] [s.n.] 2017.

TESEO, Serafino et al. The scent of symbiosis: gut bacteria may affect social interactions in leaf-cutting ants. **Animal Behaviour**, [s.l.] v. 150, p. 239-254, 2019.

THAMPI, Anusree; BHAI, R. Suseela. Rhizosphere actinobacteria for combating *Phytophthora capsici* and *Sclerotium rolfsii*, the major soil borne pathogens of black pepper (*Piper nigrum* L.). **Biological Control**, [s.l.] v. 109, p. 1-13, 2017.

TRABELSI, Darine et al. Appraisal of the crop-rotation effect of rhizobial inoculation on potato cropping systems in relation to soil bacterial communities. **Soil Biology and Biochemistry**, [s.l.] v. 54, p. 1-6, 2012.

TRABELSI, Darine et al. Effect of on-field inoculation of *Phaseolus vulgaris* with rhizobia on soil bacterial communities. **FEMS microbiology ecology**, [s.l.] v. 77, n. 1, p. 211-222, 2011.

TRABELSI, Darine et al. Microbial inoculants and their impact on soil microbial communities: a review. **BioMed research international**, [s.l.] v. 2013, 2013.

TRINICK, M. J.; PARKER, C. A.; PALMER, M. J. Interactions of the microflora from nodulation problem and non-problem soils towards *Rhizobium* spp on agar culture. **Soil Biology and Biochemistry**, [s.l.] v. 15, n. 3, p. 295-301, 1983.

VAN NOORDEN, Richard; MAHER, Brendan; NUZZO, Regina. The top 100 papers. **Nature News**, [s.l.] v. 514, n. 7524, p. 550, 2014.

VAN SCHREVEN, D. A. The effect of some actinomycetes on rhizobia and *Agrobacterium radiobacter*. **Plant and Soil**, [s.l.] v. 21, p. 283-302, 1964.

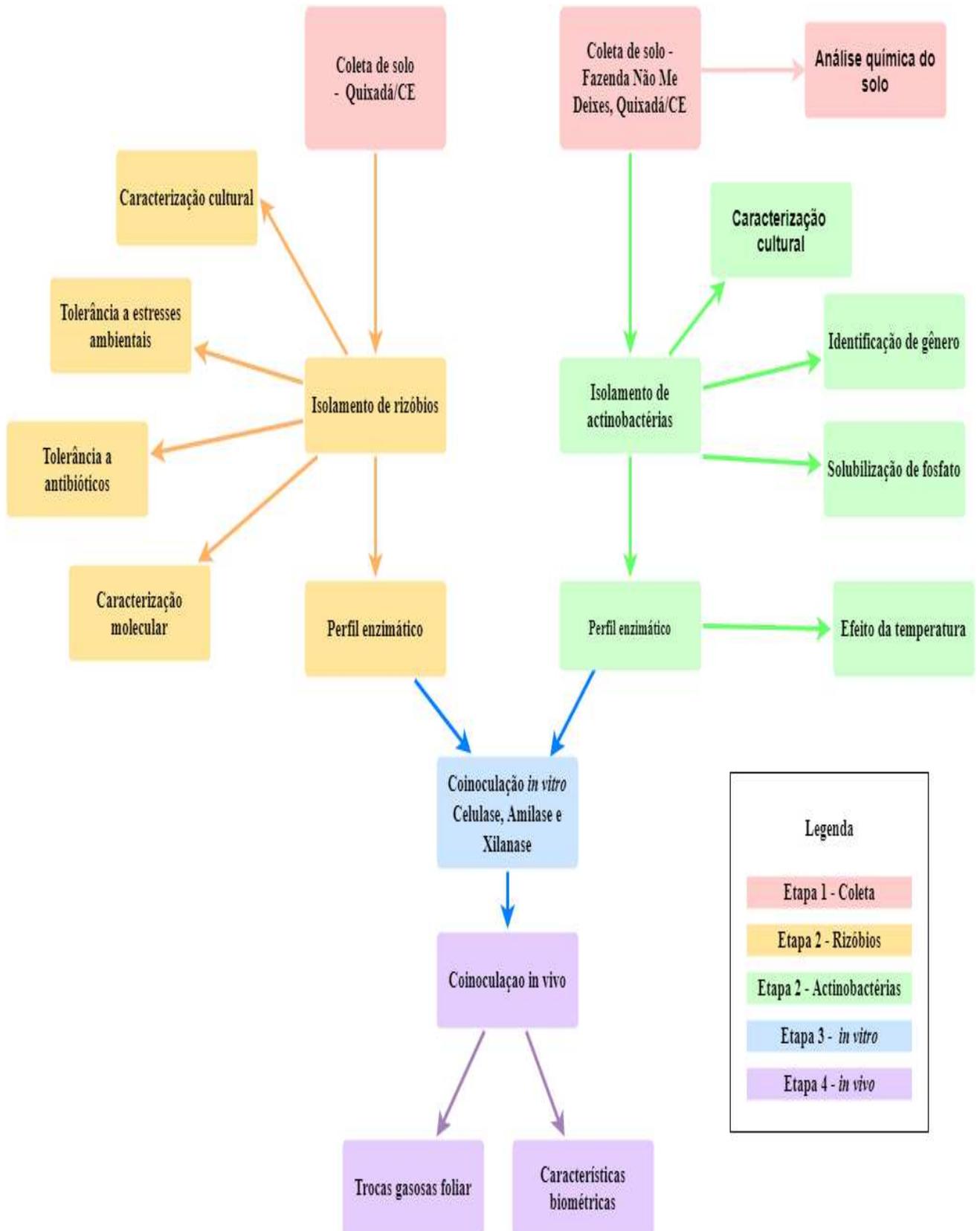
VIEIRA, R. F. **Diversidade e taxonomia de rizóbios**. In: SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S., *Microbiota do solo e qualidade ambiental*, 1ª ed. Campinas: Instituto Agrônômico, 2007. p.165-190.

VINCENT, James Matthew et al. **A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria.**, [s.l.] [s.n.] 1970.

VINOTHINI, Gopal et al. Cell aggregating temperament and biopotency of cultivable indigenous actinobacterial community profile in chicken (*Gallus gallus domesticus*) gut system. **Arabian Journal for Science and Engineering**, [s.l.] v. 43, p. 3429-3442, 2018.

- WANG, Mingze et al. Global trends in soil monitoring research from 1999–2013: A bibliometric analysis. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B, Soil & Plant Science*, [s.l.] v. 65, n. 6, p. 483-495, 2015.
- WILLIAMS, S. T.; DAVIES, F. L. Use of a scanning electron microscope for the examination of actinomycetes. *Microbiology*, [s.l.] v. 48, n. 2, p. 171-177, 1967.
- WINK, J. Compendium of Actinobacteria from Dr. Joachim M. Wink, University of Braunschweig, an Electronic Manual Including the Important Bacterial Group of the Actinomycetes. Available online at: <https://www.dsmz.de/bacterial-diversity/compendium-of-actinobacteria.html>, 2012. Acesso em: 15 maio. 2020.
- XU, Meng et al. Soil microbial community structure and activity along a montane elevational gradient on the Tibetan Plateau. *European journal of soil biology*, [s.l.] v. 64, p. 6-14, 2014.
- YANNI, Youssef et al. Enhanced symbiotic performance and productivity of drought stressed common bean after inoculation with tolerant native rhizobia in extensive fields. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, [s.l.] v. 232, p. 119-128, 2016.
- ZAINUDDIN, D. U.; SYAM'UN, E.; DACHLAN, A. Production of soybean in the application of Rhizobium spp. and Actinomycetes spp. *In: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. [s.l.] IOP Publishing, 2019. p. 012251.
- ZANJIRCHI, Seyed Mahmoud; REZAEIAN ABRISHAMI, Mina; JALILIAN, Negar. Four decades of fuzzy sets theory in operations management: application of life-cycle, bibliometrics and content analysis. *Scientometrics*, [s.l.] v. 119, p. 1289-1309, 2019.
- ZHANG, Liang et al. A review of published wetland research, 1991–2008: ecological engineering and ecosystem restoration. *Ecological Engineering*, [s.l.] v. 36, n. 8, p. 973-980, 2010.
- ZHANG, Yong Fa et al. Bradyrhizobium elkanii, Bradyrhizobium yuanmingense and Bradyrhizobium japonicum are the main rhizobia associated with Vigna unguiculata and Vigna radiata in the subtropical region of China. *FEMS Microbiology Letters*, [s.l.] v. 285, n. 2, p. 146-154, 2008.
- ZHENG, Mianhai et al. Global pattern and controls of biological nitrogen fixation under nutrient enrichment: A meta-analysis. *Global Change Biology*, [s.l.] v. 25, n. 9, p. 3018-3030, 2019.

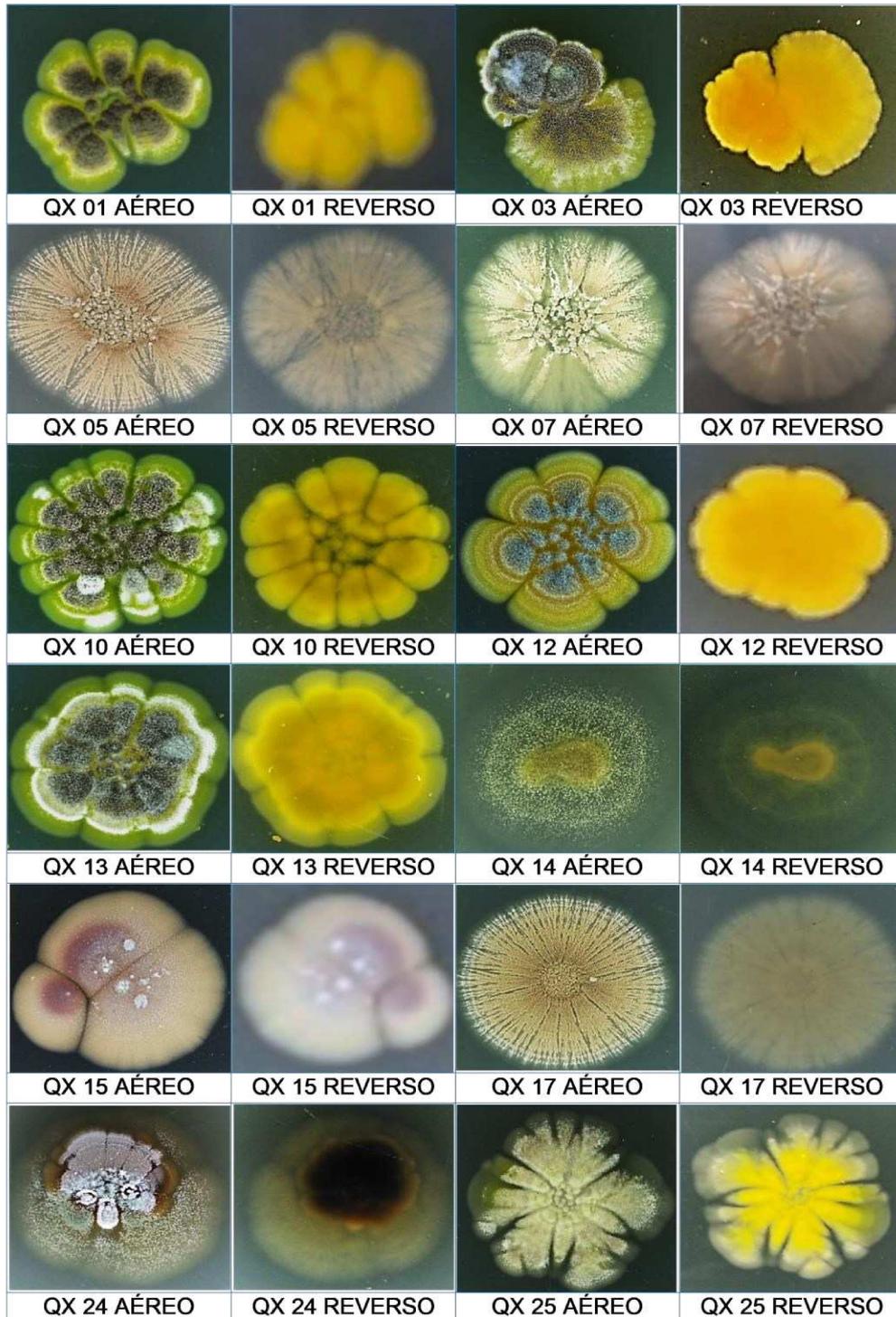
## APÊNDICE A – FLUXOGRAMA REPRESENTANDO AS ETAPAS DA PESQUISA

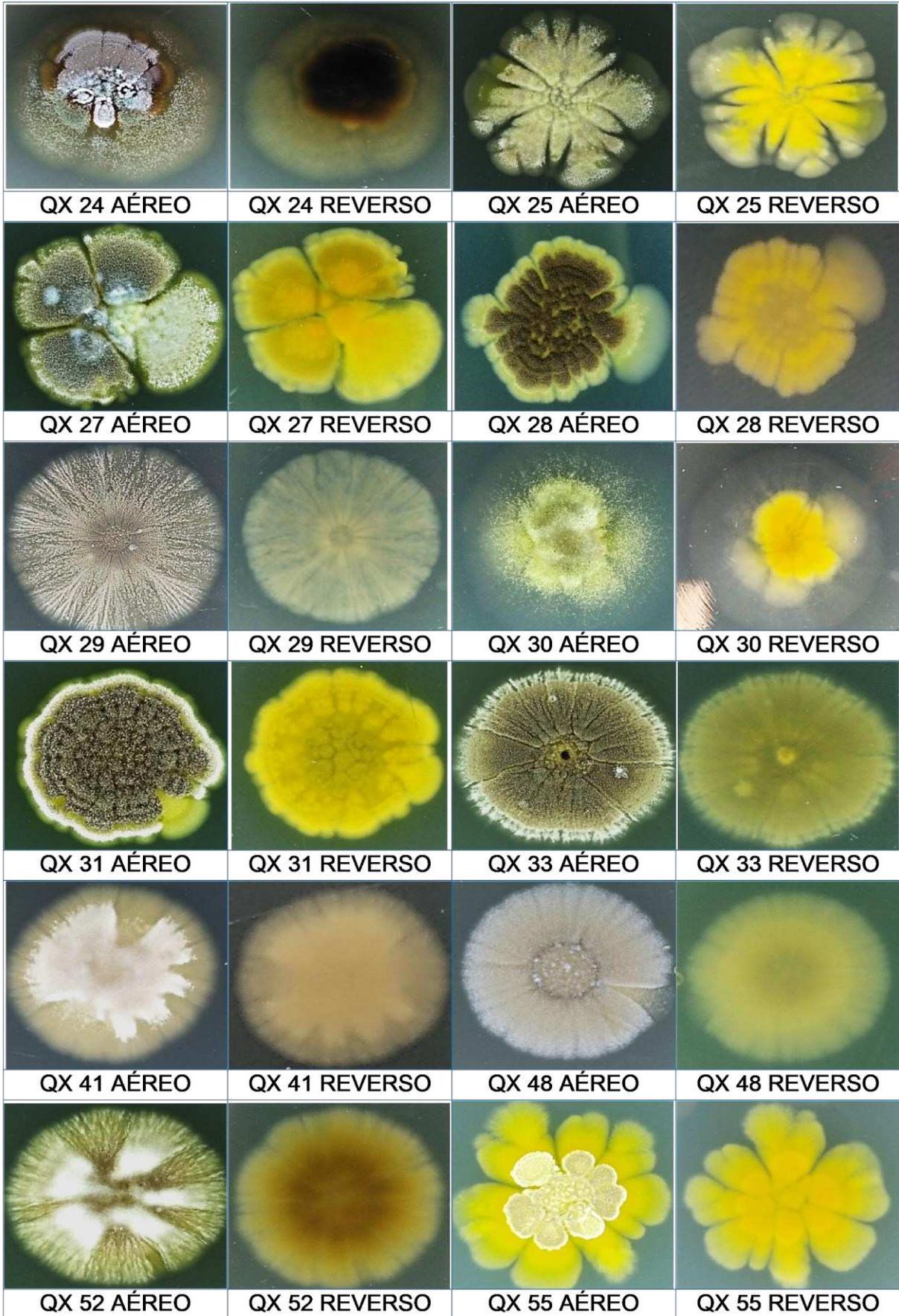


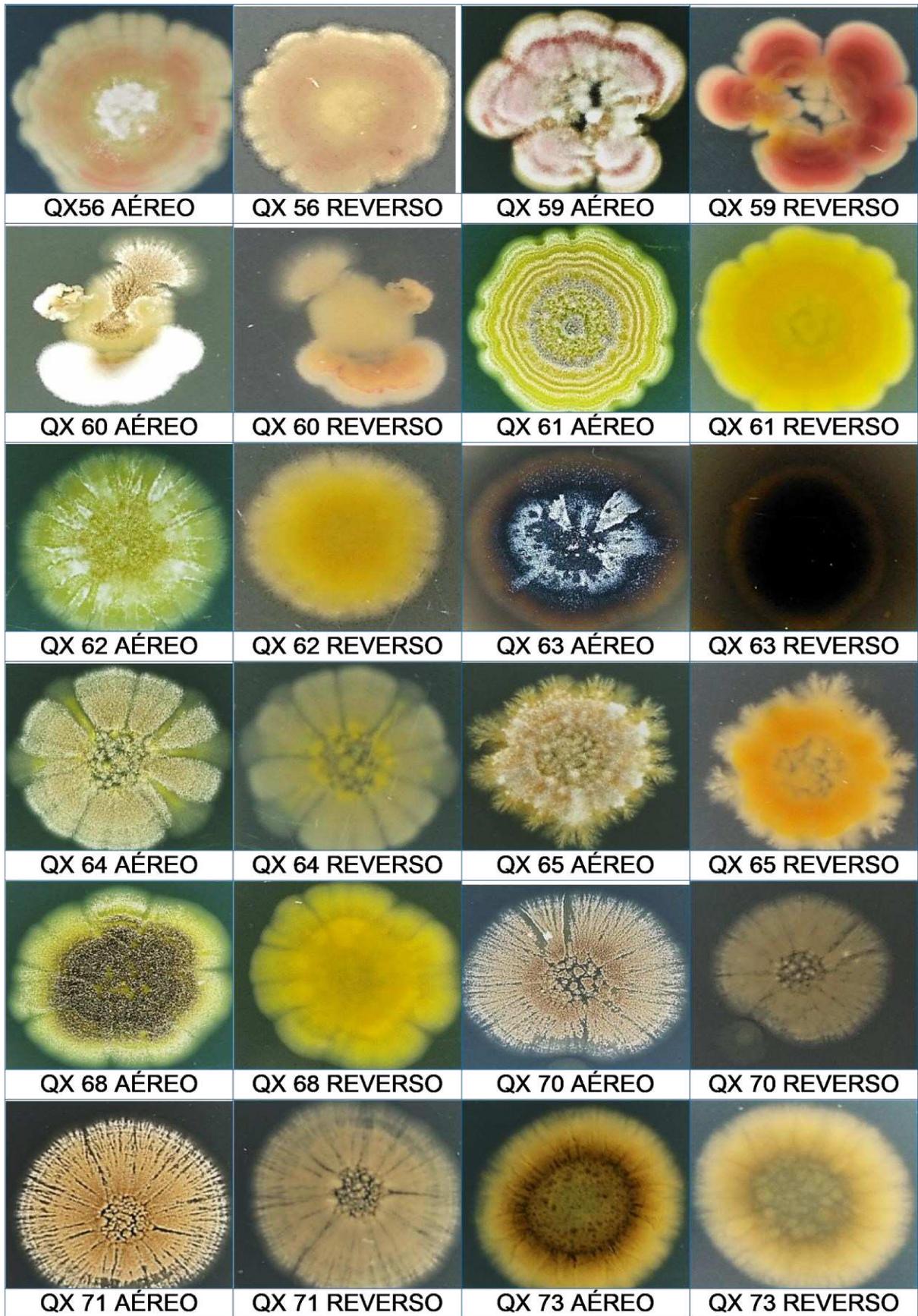
Fonte: elaborada pela autora.

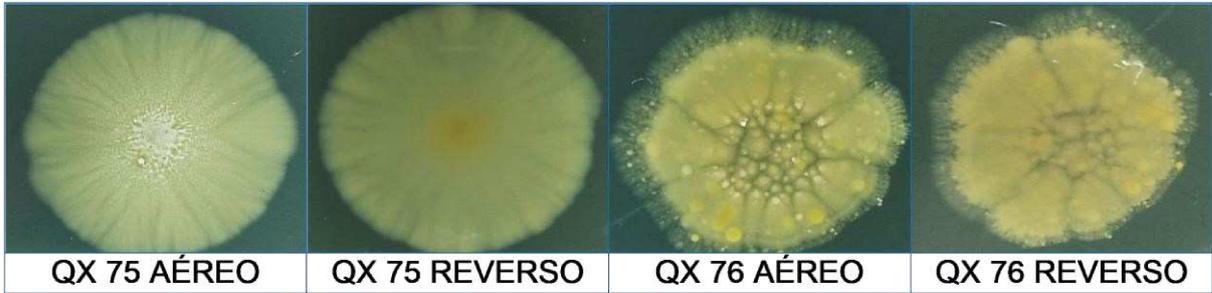
## APÊNDICE B – REGISTRO FOTOGRÁFICO

**Figura 1:** Diversidade cultural das cepas de actinobactérias oriundas de Quixadá (Ce) em colônias isoladas (Fonte: Jamili Sousa)

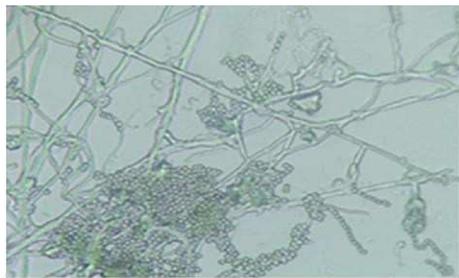




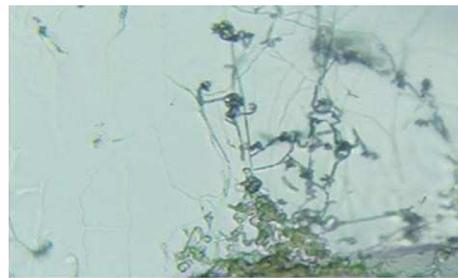




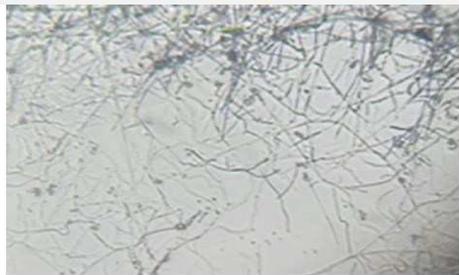
**Figura 2:** Morfologia da cadeia de esporos e classificação gênero das cepas de actinobactérias oriundas de Quixadá (Ce). (Fonte: Jamili Sousa).



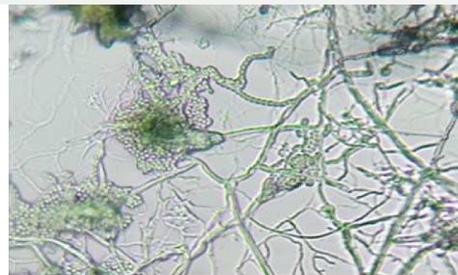
QX04 streptomyces



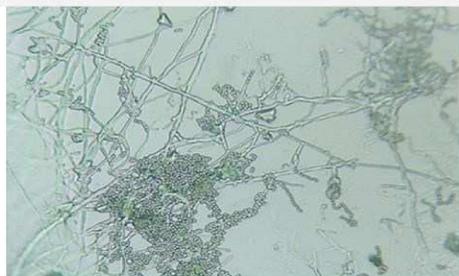
QX14 micromonospora



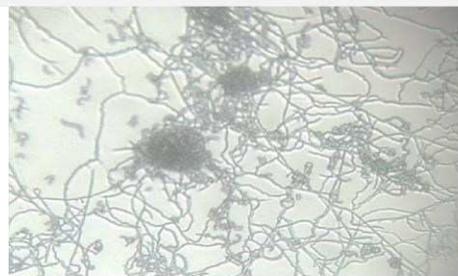
QX15 Nocardia



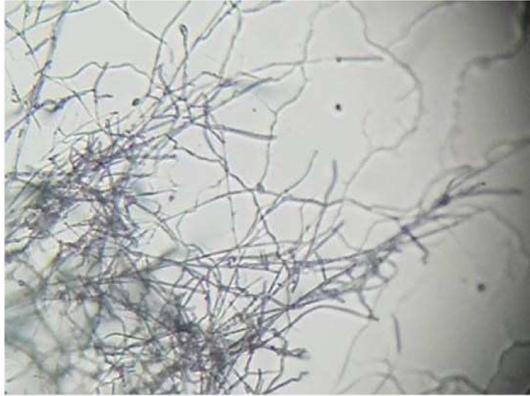
QX19 streptomyces



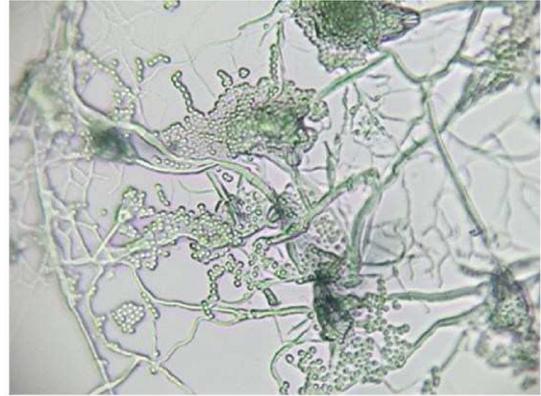
QX 23 Actinomadura



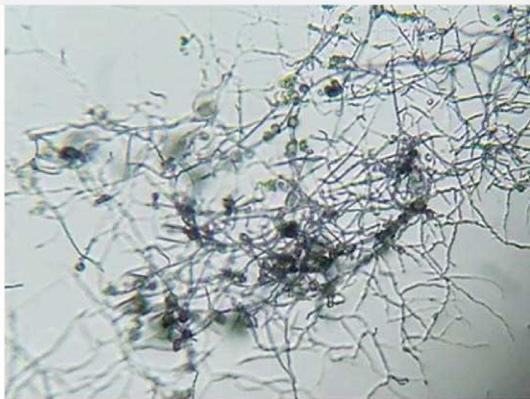
QX28 Nocardia



**QX29 Nocardia**



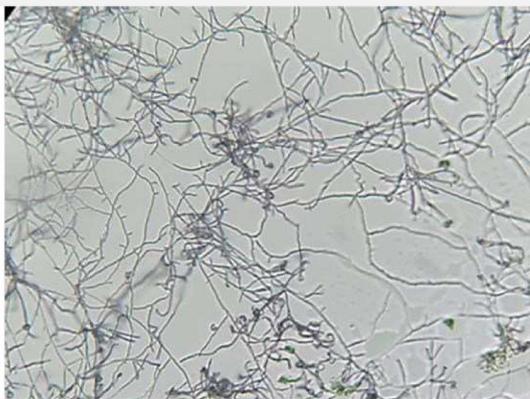
**QX30 streptomyces**



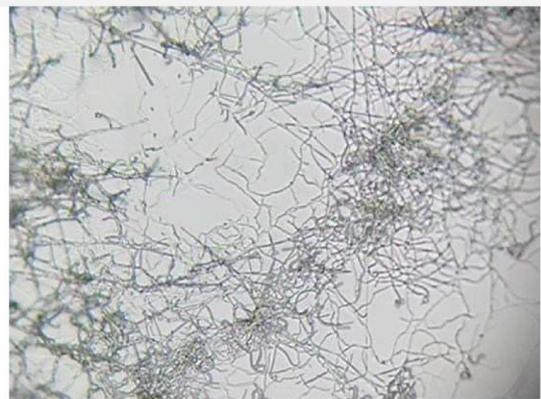
**QX31 streptomyces**



**QX52 actinomadura**



**QX58 Nocardia**



**QX68 streptomyces**

## **ANEXO A - HISTÓRICO DE CRIAÇÃO E ASPECTOS LEGAIS DA RPPN NÃO ME DEIXES, RAQUEL DE QUEIROZ**

A Fazenda Não Me Deixes está localizada no distrito de Daniel de Queiroz no município de Quixadá, Estado do Ceará. Está distante, aproximadamente, 30 km da sede do município e possui uma área total de 928 hectares.

O velho Miguel Francisco de Queiroz, tio-avô de Daniel de Queiroz, pai de Rachel e Maria Luiza (atual proprietária da Fazenda) era homem de muitas posses e dono de quase todas as terras daquela região. A um dos sobrinhos ele deu um pedaço do Junco (a fazenda sede), a parte que ficava do outro lado da estrada de ferro que lhe cortava as terras. O sobrinho ficou lá algum tempo, mas, seduzido pelas histórias da riqueza da borracha no Amazonas, vendeu a terra e foi-se para o Norte. Tempos depois, doente de malária, alquebrado e pobre, voltou ao sertão, E o tio lhe disse: “Olhe, comprei de volta à terra que você vendeu. Vá cuidar do que você abandonou, ponha na Fazenda o nome de “Não Me Deixes” e nunca mais saia de lá.” E assim foi. Quando esse sobrinho morreu, como não tinha filhos, a fazenda tornou a fazer parte do Junco, já então com outro sobrinho, Daniel de Queiroz, de onde passou por herança a Rachel de Queiroz, anos depois, por iniciativa da escritora, parte da fazenda foi transformada em Reserva Particular do Patrimônio Natural RPPN e, por sua morte, a fazenda passou a ser da sua irmã, Maria Luiza de Queiroz.

A atual proprietária informou que a reserva foi criada pela sua irmã no intuito de garantir a conservação da exuberante vegetação de Caatinga da propriedade, que garante um clima mais agradável mesmo nos períodos de estiagem, e também para preservar as várias espécies de animais que ali habitam. Sendo a criação da RPPN de caráter perpétuo, todos estes atributos naturais teriam sua existência assegurados.

A RPPN Não Me Deixes foi criada pela Portaria do IBAMA Nº 37-N de 16 de abril de 1999, no intuito de conservar a biodiversidade da Caatinga e garantir a perpetuidade da preservação de uma era significativa da Fazenda Não Me Deixes. A área apresenta boas condições de conservação da vegetação sendo usada como área de soltura de aves nativas apreendidos pelo IBAMA em feiras e comércio irregular.

A RPPN, compreendida pela área da "Fazenda Não Me Deixes", tem trezentos hectares (300 ha) e protege uma área de Caatinga arbórea e arbustiva, sendo parte da fazenda destinada para uso agropecuário.

Fonte: MMA/IBAMA, Plano de Manejo Reserva Particular do Patrimônio Natural – RPPN Não Me Deixes. 2012.