



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS - UEG
CAMPUS DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS - CCET
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS APLICADAS A
PRODUTOS PARA SAÚDE (PPG-CAPS)

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENÉTICA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE
SORGO (*Sorghum bicolor* L. MOENCH)**

LARISSA BATISTA DA SILVA

Anápolis - GO
Junho, 2017

LARISSA BATISTA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENÉTICA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE
SORGO (*Sorghum bicolor* L. MOENCH)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde da Universidade Estadual de Goiás como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde.

Orientadora: Prof.^a Dra. Claudia Cristina Garcia Martin Didonet.

Co-orientadora: Prof.^a Dra. Karina Freire d'Eça Nogueira Santos

Anápolis - GO
Junho, 2017

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UEG
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Batista-Silva, Larissa
BB333c Caracterização fenotípica e genética de bactérias isoladas de sorgo (Sorghum bicolor L. Moench) / Larissa Batista-Silva; orientador Claudia Cristina Garcia Martin-Didonet; co-orientador Karina Freire d'Eça Nogueira Santos . -- Anápolis, 2017. 85 p.
Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação Mestrado Acadêmico em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde) -- Câmpus-Anápolis CET, Universidade Estadual de Goiás, 2017.
1. Microrganismos endofíticos. 2. Testes bioquímicos. 3. Solubilização de fosfato. 4. Enzimas. 5. PCR 16S-23S. I. Martin-Didonet, Claudia Cristina Garcia , orient. II. Santos , Karina Freire d'Eça Nogueira , coorient. III. Título.

Larissa Batista da Silva

“Caracterização fenotípica e genética de bactérias isoladas de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench)”

Dissertação defendida no Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde da Universidade Estadual de Goiás, para obtenção do título de Mestre, aprovada em 01 de agosto de 2017, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



Profa. Dra. Claudia Cristina Garcia Martin Didonet

Presidente da Banca

UEG/CCET



Profa. Dra. Elisa Flávia Luiz Cardoso Bailão

Membro Externo

UEG



Prof. Dr. Anderson Petrônio de Brito Ferreira

Membro Externo

EMBRAPA

Dedico este trabalho as pessoas mais importantes na minha vida: meus pais, *João Luiz*, *Sandra Beatriz* e minha irmã *Naisla Batista* que com amor, incentivo e apoio incondicional não mediram esforços para que eu pudesse concluir mais este desafio.

AGRADECIMENTOS

- Em primeiro lugar agradeço a Deus, pelas oportunidades e principalmente pela força e coragem para dar continuidade ao trabalho diante da pressão e desafios encontrados ao longo dessa caminhada.
- Agradeço a minha mãe Sandra Beatriz e ao meu pai João Luiz pelo apoio, e dedicação concedida ao longo de toda essa caminhada, por acreditar na minha capacidade.
- À Professora Dra. Cláudia Cristina Garcia Martin Didonet, por ter aceito o desafio de me orientar, e por ter contribuído com minha formação profissional durante o curso.
- Agradeço a co-orientadora Professora Dra. Karina Freire d'Eça Nogueira Santos pelas contribuições ao longo da execução prática e teórica deste trabalho.
- Agradeço aos professores e colegas do Laboratório pelas dicas ao longo do curso. Agradeço à Lucas Leonardo companheiro diário, pelas inúmeras contribuições na execução prática dos experimentos.
- À UEG e PPG-CAPS pelo apoio financeiro.

“Descobrir consiste em olhar para o que todo mundo está vendo e pensar uma coisa diferente”

Roger Von Oech

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 A Cultura de Sorgo	15
2.2 Associação entre bactérias e plantas.....	16
2.3 Bactérias endofíticas.....	17
2.4 Caracterização de bactérias	17
2.4.1 Caracterização morfológica e bioquímica	18
2.4.2 Caracterização genética	20
2.4.3 Enzimas bacterianas	22
3. OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo geral	28
3.2 Objetivos específicos.....	28
4. METODOLOGIA	29
4.1 Material biológico	29
4.2 Seleção e manutenção dos isolados	29
4.3 Caracterização morfológica e bioquímica	30
4.3.1 Coloração de Gram.....	30
4.3.2 Morfologia.....	30
4.3.3 Teste de sensibilidade a antibióticos	30
4.3.4 Teste de crescimento em fonte de carbono	31
4.3.5 Detecção de sideróforos.....	32
4.3.6 Testes enzimáticos.....	32
4.3.6.1 Teste de catalase	32
4.3.6.2 Teste de urease.....	32
4.3.6.3 Teste de redução de nitrato.....	32

4.3.6.4 Avaliação qualitativa da enzima nitrogenase	33
4.3.6.5 Teste de detecção de enzimas extracelulares.....	33
4.3.6.6 Solubilização de fosfato.....	34
4.4 Caracterização genética	35
4.4.1 Extração DNA	35
4.4.2 Amplificação em PCR da região espaçadora intergênica 16s-23S rRNA.....	36
4.5 Análise de dados	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 Caracterização morfológica e bioquímica	38
5.1.1 Coloração de Gram e morfologia celular	38
5.1.2 Morfologia da colônia	38
5.1.3 Teste de sensibilidade a antibióticos	40
5.1.4 Teste de crescimento em fonte de carbono.....	42
5.1.5 Detecção de sideróforos.....	44
5.1.6 Testes enzimáticos	45
5.1.6.1 Catalase.....	45
5.1.6.2 Urease	46
5.1.6.3 Redução de nitrato	46
5.1.6.4 Avaliação qualitativa da enzima nitrogenase	47
5.1.6.5 Produção de enzimas extracelulares	47
5.1.6.6 Solubilização de fosfato.....	51
5.2 Análise de similaridade para características morfológicas e bioquímicas	53
5.3 Caracterização genética	55
6. CONCLUSÃO.....	58
7. REFERÊNCIAS	59
ANEXOS	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AMP-Ampicilina

CBS- Comissão de Biossegurança em Saúde

CLO- Cloranfenicol

CMC- Carboximetilcelulose

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EST- Estreptomicina

FBN – Fixação biológica de nitrogênio

IE- Índice enzimático

IS- Índice de solubilização

J - Coeficiente de Jaccard

KPB - kilo pares de bases

NAL- Ácido nalidíxico

NBRI-P- *National Botanical Research Institute Phosphate*

NFb - *Nitrogen free bromothymol*

PGPB - *Plant Growth-Promoting Bacteria*

PCR- *Polymerase Chain Reaction*

pH - Potencial hidrogeniônico

PSB- Bactérias solubilizantes de fosfato

PVK- Pikovskaya

RNA- Ácido ribonucleico

rRNA- Ácidos ribonucleicos ribossomais

rpm - Rotações por minuto

TET- Tetraciclina

UPGMA – *Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Isolados bacterianos resistentes a concentração de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos antibióticos EST (estreptomicina), AMP (ampicilina), TET (tetraciclina) e CLO (clorafenicol). 40
- Figura 2.** Percentual de isolados de sorgo com índice enzimático igual ou superior a 1,0 ($\text{IE} \geq 1,0 =$ positivos/ $\text{IE} \geq 1,5 =$ bons produtores de enzimas extracelulares). 48
- Figura 3:** Halos de degradação enzimática para protease, lipase e celulase produzidas pelas bactérias isoladas de sorgo. **A:** Isolado NS77 - halo de hidrólise de proteínas do leite; **B:** Isolado LS6 - halo de degradação de Tween; **C:** Isolado YS54 - halo de hidrólise de carboximetilcelulose. 49
- Figura 4.** Percentual de isolados de sorgo com índice de solubilização igual ou superior a 1,0 ($\text{IS} \geq 1,0 =$ positivos/ $\text{IS} \geq 1,5 =$ bons produtores de enzimas extracelulares). 51
- Figura 5.** Halos de degradação enzimática para protease, lipase e celulase produzidas pelas bactérias isoladas de sorgo. **A:** Isolado NS77 - halo de hidrólise de proteínas do leite; **B:** Isolado LS6 - halo de degradação de Tween; **C:** Isolado YS54 - halo de hidrólise de carboximetilcelulose. 53
- Figura 6.** Dendrograma gerado no software NTSYSpc (versão 2.02i) definido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando o coeficiente de Jaccard com base na comparação entre os testes morfofisiológicos e bioquímicos realizados para 24 bactérias isoladas de sorgo (*S. bicolor*, L. Moench) e estirpes padrão FP2 (*A. brasilense*), BR322 (*R. tropici*) e Pal5 (*G. diazotrophicus*). Testes inseridos na análise: morfológico (coloração de Gram); bioquímicos (antibiograma, teste de crescimento em fonte de carbono e teste de citrato); enzimáticos (catalase, urease, redução de nitrato, avaliação qualitativa da enzima nitrogenase, produção de enzimas extracelulares e solubilização de fosfato). 54

Figura 7. Perfil eletroforético da amplificação em PCR da região espaçadora intergênica (16S-23S rRNA) para 24 isolados de sorgo (*S. bicolor*, L. Moench) e estirpes padrão FP2, BR322 e Pal5 em gel de agarose (1,2%) com marcador molecular 1 kb-DNA-Ladder..... 55

Figura 8. Dendrograma gerado no software NTSYSpc (versão 2.02i) definido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando o coeficiente de Jaccard com base nos fragmentos amplificados da região intergênica 16S-23S rRNA por PCR de realizado para 24 bactérias isoladas de sorgo (*S. bicolor*, L. Moench) e estirpes padrão FP2 (*A. brasilense*), BR322 (*R. tropici*) e Pal5 (*G. diazotrophicus*)..... 56

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Relação da atividade enzimática, meios de cultura e período de incubação para o teste de triagem de atividade enzimática dos isolados bacterianos estudados. 33
- Tabela 2.** Composição da mistura reacional PCR região espaçadora intergênica 16S-23S rRNA. 36
- Tabela 3.** Morfologia da colônia de 24 bactérias isoladas de sorgo (*S. bicolor*, L. Moench) e estirpes padrão FP2 (*A. brasilense*), BR322 (*R. tropici*) e Pal5 (*G. diazotrophicus*). 39
- Tabela 4.** Resistência de 24 isolados de sorgo (*S. bicolor*, L. Moench) e estirpes padrão para concentrações (30, 50, 100 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de diferentes antibióticos. 41
- Tabela 5.** Utilização de fontes de carbono para as 24 bactérias isoladas de sorgo e estirpes padrão FP2 (*A. brasilense*), PA15 (*G. diazotrophicus*) e BR322 (*R. tropici*). 43
- Tabela 6.** Avaliação da atividade enzimática de catalase, nitrato redutase, urease e nitrogenase para as 24 bactérias isoladas de sorgo (*S. bicolor*, L. Moench) e estirpes padrão FP2, BR322 e Pal5 (*G. diazotrophicus*). 45
- Tabela 7.** Índices enzimáticos das 24 bactérias isoladas de sorgo (*S. bicolor*, L. Moench) e estirpes padrão FP2 (*A. brasilense*), BR322 (*R. tropici*) e Pal5 (*G. diazotrophicus*). 49
- Tabela 8.** Índice de Solubilização (IS) de 24 bactérias isoladas de sorgo (*S. bicolor*, L. Moench) e estirpes padrão FP2 (*A. brasilense*), BR322 (*R. tropici*) e Pal5 (*G. diazotrophicus*). 52

RESUMO

O sorgo é um cereal de grande importância comercial. Todavia, essa gramínea não se adapta bem a solos de baixa fertilidade tornando a cultura dependente do uso de fertilizantes industriais. Na busca para solucionar esse problema, a os benefícios que podem ser proporcionados interação entre bactérias associadas a plantas têm sido objeto de estudo de vários trabalhos de pesquisa. No entanto, atualmente existem poucos estudos sobre bactérias isoladas do sorgo. O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização polifásica (morfológica, bioquímica e genética) de bactérias endofíticas isoladas de raízes de sorgo. Foram selecionadas um total de 24 isolados usando o meio semisseletivo de NFb-lactato, LGI-P e YMA. A caracterização foi baseada nos aspectos de morfológicos; bioquímicos com ênfase no potencial para produção de enzimas e genético pela análise da região intergênica 16S-23S rRNA. Todos os isolados foram classificados como gram-negativo e apresentaram grande resistência a antibióticos e ampla flexibilidade metabólica quanto ao uso de diferentes fontes de carbono. A maioria dos isolados (95,8%) mostrou atividade enzimática para de catalase, urease, redutase de nitrato e nitrogenase. Entre as enzimas hidrolíticas, as bactérias isoladas de sorgo apresentaram maior potencial para produção de lipases (70,8%) e celulasas (50%). Mais de 90% dos isolados foram capazes de solubilizar o fosfato. A análise de similaridade permitiu identificar uma grande diversidade morfofisiológica e genética entre as bactérias isoladas das raízes de sorgo. Foi possível ainda constatar que vários isolados apresentaram mecanismo relacionado à promoção do crescimento da planta e podem ser considerados promissores como inoculantes ou como novas fontes de enzimas para uso biotecnológico.

Palavras-chave: Microrganismos endofíticos, testes bioquímicos, solubilização de fosfato, enzimas, PCR 16S-23S.

ABSTRACT

Sorghum is a cereal of great commercial importance. However, this grass does not adapt well to soils of low fertility making the crop dependent on the use of industrial fertilizers. In the quest to address this problem, the benefits that can be provided for interaction between bacteria associated with plants have been the subject of study of various research papers. However, there are currently few studies on bacteria isolated from sorghum. The objective of this work was to characterize polyphase (morphological, biochemical and genetic) of endophytic bacteria isolated from sorghum roots. A total of 24 isolates were selected using the NFb-lactate, LGI-P and YMA semi-insulin medium. The characterization was based on morphological aspects; biochemicals, directed to enzymatic potential and genetic by PCR of the 16S-23S rRNA intergenic region. All isolates were classified as gram-negative and showed high resistance to antibiotics and wide metabolic flexibility regarding the use of different carbon sources. Most of the isolates (95.8%) showed enzymatic activity for catalase, urease, nitrate reductase and nitrogenase. Among the hydrolytic enzymes, the bacteria isolated from sorghum presented higher potential to produce lipases (70.8%) and cellulases (50%). More than 90% of the isolates solubilize phosphate. The analysis of similarity allowed identify morpho-physiological and genetic diversity between the bacteria isolated from the roots of sorghum. It was also possible to verify isolates with mechanisms related to the promotion of plant growth, which can be considered as promising as inoculants or as new sources of enzymes for biotechnological use.

Key words: Endophytic microorganisms, biochemical tests, phosphate solubilization, enzymes, PCR 16S-23S

1. INTRODUÇÃO

O sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) é o quinto cereal mais cultivado no mundo, com alto valor agrônomico e nutritivo, sendo bastante utilizado para alimentação animal (ARAÚJO-NETO et al., 2014). O sorgo é uma gramínea que, apesar de sua resistência ao estresse hídrico e a elevadas temperaturas, não se adapta a solos degradados de baixa fertilidade (COELHO, 2011). A tecnologia da inoculação utilizando bactérias endofíticas no cultivo de plantas de interesse econômico, é uma alternativa que tem demonstrado promover respostas positivas significativas em culturas de cereais e gramíneas. Essa tecnologia tem se demonstrado promissora para promoção do crescimento das plantas, manejo do solo e qualidade ambiental (BERGAMASCHI et al., 2007; ROESCH et al., 2007; ERMAWAR et al., 2015).

As bactérias endofíticas são representadas por diferentes grupos filogenéticos. Esses microrganismos podem ser encontrados no ambiente em vida livre, em simbiose ou associados a plantas (PÉREZ et al., 2015). Os microrganismos endofíticos têm despertado o interesse da comunidade científica, especialmente por apresentar potencial na produção de compostos de interesse econômico (SOUZA et al., 2004). Entre esses compostos se destacam as enzimas, amplamente utilizadas em diversos processos biotecnológicos sendo empregadas principalmente na modificação de compostos orgânicos (BALDO et al., 2013; GRIEBELER et al., 2015).

As enzimas bacterianas são cada vez mais requeridas, na busca por novos métodos e processos que sejam mais ecológicos e que resultem na obtenção de produtos mais competitivos para o setor biotecnológico. Deste modo, atualmente os esforços se concentram não só na produção dessas enzimas, mas também na caracterização de bactérias que sejam capazes de produzir tais compostos (VERMELHO et al., 2013).

Os métodos clássicos de fenotipagem como a avaliação de aspectos bioquímicos, morfológicos e fisiológicos foram por muito tempo o principal meio para a caracterização de microrganismos. No entanto, nas últimas décadas as técnicas moleculares passaram a integrar a caracterização de bactérias em uma abordagem que prioriza a adoção de critérios polifásicos visando uma identificação e classificação microbiana mais eficiente (IKEDA et al., 2013).

Portanto, a caracterização de estirpes bacterianas é uma ferramenta importante na descoberta e obtenção de enzimas e substâncias, que após estudos mais aprofundados possam ser exploradas na formulação de bioprodutos, tais como inoculantes e agentes de biocontrole pela indústria biotecnológica em diversos setores.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Cultura de Sorgo

O sorgo vem ganhando espaço no mercado mundial de grãos devido a sua ampla adaptabilidade, versatilidade e rusticidade. Planta nativa da África, o sorgo pertencente à família Poaceae e é produto da domesticação do homem (PEREIRA FILHO; RODRIGUES, 2015; SANTOS et al., 2015). A partir de 1950, o sorgo passou a ser estudado por institutos de pesquisa e universidades, que visavam sua introdução no Brasil (PURCINO, 2011). No ano de 2015, a cultura do grão representou a sexta maior área plantada (732.631 ha) e o sexto maior índice de produção no Brasil, perdendo apenas para soja, milho, algodão, arroz e feijão. A região Centro-Oeste é hoje a maior produtora de sorgo, sendo o estado de Goiás responsável pela produção de aproximadamente 341,7 mil toneladas do grão apenas na safra de 2015/2016 (IBGE, 2016; CONAB, 2016).

O sorgo nos diferentes tipos (granífero, forrageiro e sacarino) pode ser comparado ao milho em relação ao seu valor agrônomico e nutritivo. Apesar de seu valor de mercado menos convidativo quando comparado ao milho, o sorgo apresenta a vantagem de ser uma espécie que se adapta bem a ambientes extremos, sendo resistente a estresses abióticos, como temperatura e umidade. (MOLINA et al., 2000; RODRIGUES et al., 2002). Assim, o sorgo vem se destacando principalmente nas regiões de pouca precipitação, como substituição ao milho na alimentação animal, demonstrando ser uma alternativa interessante em termos de exigências nutricionais e de produção (FIALHO et al., 2002; PURCINO, 2011).

A facilidade de adaptação do sorgo às regiões mais secas, aliado ao seu alto potencial de produção, boa adequação à mecanização, versatilidade (feno, silagem e pastejo direto) e ao fato de poder ser utilizado como ração animal, contribuem para que o sorgo seja uma cultura mais segura (PURCINO, 2011; TOLENTINO, 2014). Contudo, apesar de várias vantagens econômicas, a produção do sorgo ainda depende do uso de fertilizantes nitrogenados, que além de elevar os custos de produção, pode acarretar em sérios danos ambientais, como contaminação dos solos e eutrofização de rios (LARA CABEZAS et al., 2000; TEIXEIRA FILHO et al., 2010).

Dentre as alternativas para amenizar os impactos ambientais causados pelo uso da adubação nitrogenada, tem se destacado a fixação biológica de nitrogênio (FBN) através da inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio, ou diazotróficas. Essa técnica é atualmente caracterizada como o mais bem-sucedido exemplo de aplicação biotecnológica de microrganismos na agricultura (NOGUEIRA; HUNGRIA, 2013). No Brasil, a cultura da soja

apresenta os melhores resultados utilizando a inoculação de bactérias fixadoras de N, sendo constatado nessa prática melhores rendimentos em produtividade (HUNGRIA et al., 1997; URQUIAGA et al., 2006). Assim, com o mesmo objetivo da cultura da soja, estudos têm sido desenvolvidos visando a utilização da inoculação com bactérias para reduzir ou eliminar o uso de fertilizantes nitrogenados na produção de sorgo.

2.2 Associação entre bactérias e plantas

A interação entre bactérias e plantas em diversas culturas de interesse agrônômico tem sido estudada devido seu potencial biotecnológico, que pode aumentar a produtividade e reduzir os custos da produção agrícola. As interações entre bactérias e plantas são divididas em três categorias: simbiótica, patogênica e associativas e podem ocorrer em todos os estágios de desenvolvimento da planta (ROMEIRO, 2012).

Os diazotróficos compreendem uma gama de microrganismos procariotos, que incluem arqueobactérias, cianobactérias, bactérias gram-positivas e negativas (TEIXEIRA; FERREIRA; SANTOS, 2008; MOREIRA et al., 2010). Esses microrganismos podem ser encontrados tanto sob formas de vida livre quanto associados a espécies vegetais, e podem se comportar como bactérias diazotróficas associativas ou ainda estabelecer uma relação de simbiose com plantas leguminosas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; MOREIRA et al., 2010; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2014).

A relação de simbiose mais conhecida ocorre entre bactérias diazotróficas, comumente denominadas rizóbios com leguminosas. Nessa relação simbiótica as bactérias fornecem o nitrogênio que a planta necessita e em troca a planta hospedeira fornece nutrientes necessários ao crescimento bacteriano. Esse tipo de interação bactéria-leguminosa é tipicamente caracterizado pela indução da formação de nódulos nas raízes da planta hospedeira, e são nessas estruturas hipertróficas que ocorre a fixação do nitrogênio atmosférico (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; SOARES-NETO, 2015).

Diferentemente do que ocorre com leguminosas, na associação bactéria-gramínea, não ocorre, a formação de estruturas especializadas para a fixação do nitrogênio (VIDEIRA; ARAÚJO; BALDANI, 2007; GARCIA, 2014). A interação simbiótica bactéria-leguminosa é a mais amplamente estudada, todavia, a associação de bactérias a várias espécies de plantas da família Poaceae também têm mostrado potencial significativo na FBN (STRALIOTTO; RUMJANEK, 1999; VIDEIRA; ARAÚJO; BALDANI, 2007).

2.3 Bactérias endofíticas

Dentre as bactérias que se encontram associadas a plantas, existe um grupo denominado endofítico. A principal característica desses microrganismos é a capacidade de se estabelecerem inter e/ou intracelularmente em tecidos vegetais, mantendo interações bioquímicas ativas com seu hospedeiro (WILSON, 1993; BANDARA; SENEVIRATNE; KULASOORIYA, 2006; VERMA; GANGE, 2014). Os microrganismos procariotos endofíticos estão representados por uma variedade de bactérias pertencentes a diferentes grupos filogenéticos, sendo a maior parte pertencente ao filo das proteobacterias (CHELIUS; TRIPLETT, 2001). Apesar da importância das bactérias endofíticas, ainda há poucos estudos explorando o potencial destes microrganismos visando a identificação e desenvolvimento de produtos naturais passíveis de aplicação biotecnológica (GOVINDASAMY; FRANCO; GUPTA, 2014).

Os microrganismos endofíticos desempenham funções importantes para seu hospedeiro. Bactérias endofíticas, por exemplo, podem apresentar uma série de mecanismos envolvidos na promoção do crescimento da planta sendo, portanto, denominadas bactérias promotoras de crescimento de plantas - PGPB do inglês: *Plant Growth-Promoting Bacteria*, cujos efeitos podem ser diretos ou indiretos (TEIXEIRA et al., 2007; MAREQUE et al., 2015).

Entre os mecanismos de efeito direto das bactérias promotoras de crescimento de plantas pode ser citada a FBN (TEIXEIRA et al., 2007). Também se destaca a solubilização de fósforo (P) que promove a conversão de fosfatos inorgânicos em orgânico, tornando-o disponível à planta (SHARMA et al., 2013; LIU et al., 2014). Outro efeito direto importante é a capacidade de produzir fitohormônios de crescimento e substâncias análogas tais como: auxinas, citoquininas e giberelinas (GLICK, 2012). Já os mecanismos indiretos incluem o controle biológico contra fitopatógenos através da síntese de antibióticos e enzimas líticas, a produção de sideróforos e ainda a competição por nutrientes e nichos (GLICK, 2012; BRADER et al., 2014).

2.4 Caracterização de bactérias

Um dos principais problemas enfrentados no atual cenário da pesquisa microbiológica é a falta de caracterização de estirpes nativas. Tal fato limita a descoberta e identificação de enzimas e outros bioprodutos com potencial aplicação biotecnológica (BERGAMASCHI et al., 2007; MOREIRA et al., 2013).

Tradicionalmente métodos clássicos de caracterização microbiológica se baseavam nas características morfofisiológicas desses microrganismos. Já nos últimos anos, com o avanço e

acessibilidade às novas tecnologias, a diversidade microbiana vem sendo determinada principalmente pelo uso de técnicas moleculares (CHAGAS JUNIOR; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2010; IKEDA, 2010).

Apesar de atualmente serem menos utilizados para determinação de relações filogenéticas, a avaliação de características morfológicas e bioquímicas bacteriana não deixam de ser importante e ainda são consideradas etapas iniciais na identificação de novos grupos taxonômicos de microrganismos (SILVA et al., 2007; CHAGAS JUNIOR; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2010; IKEDA, 2010). Hoje é possível verificar uma tendência na adoção de critérios polifásicos na identificação taxonômica de microrganismos, aliando características bioquímicas, morfológicas, fisiológicas e genotípicas por meio de métodos moleculares desenvolvidos nas últimas décadas (STRALIOTTO; RUMJANEK, 1999; CHAGAS JUNIOR; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2010).

2.4.1 Caracterização morfológica e bioquímica

Na caracterização de bactérias nativas, os estudos são focados inicialmente na avaliação de aspectos fisiológicos e bioquímicos tais como informações de cultivo e adaptabilidade metabólica do microrganismo (VIDEIRA; ARAÚJO; BALDANI, 2007). Também são bastante utilizadas características como crescimento em diferentes temperaturas, pH e umidade, resistência a antibióticos, capacidade de utilização de várias fontes de carbono e produção de enzimas (SILVA et al., 2007; CHAGAS JUNIOR; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2010).

Morfologia

Características morfológicas observadas em colônias bacterianas, por exemplo, podem ser consideradas estratégias de sobrevivência ou forma de proteção dessas bactérias contra estresses ambientais e ataque de diferentes organismos (OLIVEIRA, 2015). Além das características morfológicas pertinentes à colônia bacteriana, um aspecto ainda bastante analisado é sua morfologia celular, isso porque bactérias podem apresentar tipos morfológicos distintos. Devido as diferentes composições da parede celular, as bactérias são passíveis de serem divididas em dois grandes grupos: gram-positivas e gram-negativas. A distinção entre esses grupos se dá por meio da técnica de coloração de Gram, que consiste em exposição rápida e sucessiva das células bacterianas a diferentes corantes (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; NOGUEIRA; MIGUEL, 2009).

Resistência a antibióticos

Outro fator muito utilizado na caracterização de bactérias está relacionado sua variabilidade metabólica e a capacidade de responder rapidamente às mudanças ambientais. Entre os diversos mecanismos evolutivos que ampliam a capacidade das bactérias em colonizar habitats pouco favoráveis está a resistência a antibióticos. Essa característica pode ser amplamente benéfica e tende a se fixar na espécie, favorecendo que bactérias resistentes se tornem predominantes no ambiente (OLIVEIRA et al., 2009; BAPTISTA, 2013).

Além disso, a síntese de diferentes antibióticos é frequentemente associada a capacidade de PGPB indireta, e atua prevenindo, por exemplo, a proliferação de fungos fitopatógenos, representando assim uma alternativa promissora para o controle biológico (COMPANT et al., 2005; GLICK, 2012).

Fontes de carbono

Um aspecto também importante na caracterização de bactérias é a capacidade de crescimento em diferentes fontes de carbono. A avaliação dessa característica pode revelar o potencial do isolado bacteriano em utilizar carbono presente em moléculas com diferenças em sua natureza química. Essa flexibilidade metabólica caracteriza uma alta capacidade de adaptação, sendo esta uma importante vantagem ecológica para os microrganismos (LEITE, 2011).

Solubilização de fosfato

A capacidade solubilizar fosfato é outra característica visada na identificação de bactérias nativas. Isso porque o P desempenha um papel crítico na fotossíntese, influenciando tanto no crescimento quanto no desenvolvimento da planta. Apesar do fósforo (P) ser abundante em solos em formas inorgânicas e orgânicas, é um dos principais limitantes para o crescimento de plantas (SHARMA et al., 2013). Essa limitação é decorrente em grande parte do P presente no solo se encontra em formas de difícil solubilização e assimilação (P não lábil), ficando indisponíveis a absorção da planta. Atualmente nas práticas agrícolas é empregada a aplicação fertilizantes químicos a fim de sanar essa deficiência de P (KHAN et al., 2009; SHARMA et al., 2013).

No entanto, o uso excessivo desses fertilizantes pode causar impactos ambientais imprevistos, ocasionando, por exemplo, danos a estrutura e composição solo, além disso, são caros e elevam o custo da produção. Isso reforça a importância da identificação de bactérias

solubilizadoras de P, que figuram como alternativa em potencial, uma vez que possam ser utilizadas como fertilizantes biológicos em substituição aos fertilizantes químicos (SHARMA et al., 2013; KAUR; REDDY, 2015).

Produção de sideróforos

A produção de sideróforos é um traço de importância significativa na caracterização de bactérias. É através da produção de sideróforos que o Fe^{3+} é absorvido pela membrana celular das bactérias, reduzido a Fe^{2+} e liberado do sideróforo para a célula. Tal mecanismo é importante pois, apesar de presente no ambiente, o ferro é encontrado principalmente como Fe^{+3} e tende a formar hidróxidos e oxihidróxidos insolúveis, tornando-o em grande parte indisponível para os microrganismos (RAJKUMAR et al., 2010).

Em condições de baixa disponibilidade ou limitação de ferro, as bactérias PGPB produzem uma gama de tipos de sideróforos com afinidades de ligação extremamente elevadas, aglutinando o íon férrico facilmente mesmo que esse elemento esteja em níveis extremamente baixos (RAJKUMAR, et al.; 2010; MADIGAN et al., 2012). Trata-se de uma característica de efeito indireto das PGPB, pois permite as essas bactérias atuarem forma antagônica contra microrganismos fitopatogênicos protegendo assim a planta hospedeira (GLICK, 2012).

2.4.2 Caracterização genética

As características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas foram amplamente utilizadas na identificação de bactérias. Todavia, para tal abordagem era imprescindível a obtenção de culturas puras, o que em grande parte das vezes era um fator limitante ao estudo, pois a maior parte dos microrganismos não é cultivável por técnicas de rotina (BITTENCOURT, 2005; NEIVERTH, 2012). Nas últimas décadas o interesse em estudos taxonômicos microbianos tomou novo fôlego com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, as quais trouxeram à tona uma grande quantidade de métodos que permitem a identificação e classificação rápida e precisa (STRALIOTTO; RUMJANEK, 1999).

Dentro das técnicas de análises genotípicas mais empregadas estão todas as metodologias direcionadas ao estudo das moléculas de DNA ou RNA (STRALIOTTO; RUMJANEK, 1999). A comparação das sequências de ácidos ribonucleicos ribossomais (rRNA) ainda que pouco utilizada na década de 1990, já dava indícios de que seria uma

ferramenta poderosa ao permitir a dedução de relações filogenéticas e evolutivas entre bactérias (WEISBURG et al., 1991).

Entre as principais tecnologias empregadas na obtenção de dados moleculares encontram-se a eletroforese de “*pulsed-field*”, a reação em cadeia da polimerase (PCR) e o sequenciamento automatizado (STRALIOTTO; RUMJANEK, 1999). A detecção por PCR é a abordagem mais utilizada, e é privilegiada por apresentar precisão, rapidez e sensibilidade (KRISHNAN, 2015). A técnica permite que fragmentos específicos do genoma bacteriano sejam sinteticamente amplificados em proporção exponencial com o uso de uma DNA polimerase termoestável (*Taq* DNA polimerase) e oligonucleotídeos iniciadores complementares a uma sequência específica de interesse (SAIKI et al., 1985).

O RNA bacteriano apresenta três genes distintos (rRNAs 16S, 23S e 5S) e exibem uma organização em operons como unidades de transcrição funcional. De modo geral esse tipo de organização consiste em uma região promotora, uma sequência que codifica o rRNA 16S, um espaçador ou uma sequência intergênica (que pode apresentar sequências de codificação para tRNA), uma sequência codificadora de rRNA 23S, e em seguida a sequência que codifica o rRNA 5S. (GURTLER, STANISICH, 1996; BARRY, 1991).

Os rRNAs (RNA ribossômico) são hoje considerados as moléculas mais adequadas para estudos de diversidade (REIS JUNIOR; REIS; TEIXEIRA, 2006). Isso porque, os genes de rRNA se encontram universalmente distribuídos e permanecem altamente conservados em toda a sua extensão e estrutura (BITTENCOURT, 2005; REIS JUNIOR; REIS; TEIXEIRA, 2006). Assim, no caso de eventuais substituições de nucleotídeos, esses passam a funcionar como um relógio para a história evolutiva do organismo (BITTENCOURT, 2005).

O uso da sequência de nucleotídeos do gene que codifica o 16S rRNA é estabelecida como método padrão de análise para bactérias (IKEDA, 2010). A PCR do 16S rRNA é considerada ideal, pois essa sequência é caracterizada por ser altamente conservada e ainda assim, apresentar variação e quantidade elevada de informações (WEISBURG et al., 1991; FERNANDES; FERNANDES; HUNGRIA, 2003). Isso permite que essa sequência seja utilizada para a identificação taxonômica ou das relações filogenéticas entre as espécies bacterianas. Após a amplificação a sequência do gene ribossomal 16S obtida pode ser utilizada em estudo comparativo por similaridade com sequências ribossomais das estirpes de referência de espécies bacterianas já depositadas em bancos de dados como o GenBank do NCBI - *National Center for Biotechnology Information* (VIDEIRA, 2008; NEIVERTH, 2012).

A análise da região espaçadora intergênica localizada entre os genes 16S e 23S é outra abordagem bastante utilizada em avaliações genéticas de procariotos. Trata-se de uma sequência que apresenta muitas variações, mas que está localizada entre regiões altamente conservadas do genoma bacteriano (genes 16S-23S rRNAs). Tal característica a torna ideal para análises mais apuradas de diversidade intra e inter-específica entre indivíduos com elevado grau de semelhança genética, pois permite a identificação de polimorfismo (GARCÍA-MARTÍNEZ et al., 1999; REIS JUNIOR; REIS; TEIXEIRA, 2006, BOAKYE et al., 2016).

2.4.3 Enzimas bacterianas

Além de todas as características morfofisiológicas e genéticas, as bactérias endofíticas podem ainda apresentar potencial para produção de diferentes tipos de bioprodutos, entre os quais se destacam as enzimas como um dos produtos mais explorados pela indústria biotecnológica (SILVA, 2009). A diversidade de processos biotecnológicos que envolvem o uso de enzimas bacterianas impulsiona o avanço de pesquisas que visam soluções sustentáveis, ambientalmente favoráveis e economicamente viáveis (ADRIO; DEMAIN, 2014).

Um importante fator a ser considerado para utilização, elaboração e desenvolvimento de produtos biotecnológicos derivados de bactérias tem como ponto principal a segurança da sua utilização (MAGNÚSSON et al., 2012). Assim, tendo em vista a necessidade de uma avaliação formal dos riscos na utilização desses microrganismos, no Brasil a Comissão de Biossegurança em Saúde (CBS) do Ministério da Saúde estabelece a “*Classificação de Risco dos Agentes Biológicos*” e determina para esses agentes algumas classes de risco. Os critérios de classificação se baseiam em aspectos como: gravidade de infecção; disseminação no meio ambiente; virulência; modo de transmissão; estabilidade do agente; e origem do material (BRASIL, 2010).

Bactérias endofíticas são comumente encontrados habitando tecidos vegetais de plantas utilizadas na alimentação humana “*in natura*” tais como: milho, arroz, banana, abacaxi, tomate, alface e outras (CRUZ et al., 2001; BARRETTI; SOUZA; POZZA, 2008; SANTOS, 2008; DIAS, 2012; KOZUSNY-ANDREANI; ANDREANI JUNIOR, 2014). Assim, as bactérias endofíticas apresentam menor probabilidade de serem nocivas ao organismo humano e podem ser classificadas na classe 1 que caracteriza microrganismos de baixo risco individual e coletivo (BRASIL, 2010).

Outro aspecto a ser considerado é o aumento da utilização e consumo dessas enzimas no dia-a-dia do homem comum e no setor biotecnológico que tem como consequência o

aumento na demanda mundial (GOPALAN; NAMPOOTHIRI, 2016). No atual cenário econômico, o setor de enzimas contribui significativamente para a receita anual global. A expectativa é que até 2021 alcance a marca de 6,3 bilhões de dólares, considerando uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 4,7% entre 2016-2021 (BBC-RESEARCH, 2017; SINGH et al., 2016; VANDENBERGHE et al., 2016).

Entre os diversos tipos de enzimas já classificadas pela Comissão de Enzimas (EC - *Enzyme Commission*), destaca-se a catalase (EC 1.11.1.6.), uma enzima oxidoreductase cuja atividade metabólica é caracterizada pela decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio ($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$). A catalase foi uma das primeiras enzimas a serem descritas em bactérias. Essa enzima é altamente eficiente a catalase e não pode ser saturada por H_2O_2 em qualquer concentração (HERBERT; PINSENT; 1948; LLEDIAS; RANGEL; HANSBERG, 1998; CARVALHO, 2007).

A urease EC 3.5.1.5, é uma enzima cuja atividade proporciona as bactérias a capacidade de utilizar ureia como única fonte de nitrogênio. A enzima urease é capaz de hidrolisar a ureia em duas moléculas de amônia (NH_3) e uma de anidrido carbônico (CO_2). Esse processo consiste em uma etapa do ciclo do nitrogênio que disponibiliza este elemento às plantas (SIRKO; BRODZIK, 2000; LIU et al., 2003; CASSINI, 2005).

A ação da enzima nitrato redutase microbiana culmina na redução de nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) com a liberação de nitrogênio molecular e óxido nitroso (N_2O), processo chamado de desnitrificação enzimática. Na desnitrificação o N é perdido ou volatilizado para a atmosfera. A nitrato redutase é uma enzima cuja síntese e atividade são induzidas pelo substrato, sendo ativada apenas quando o suprimento de oxigênio é insuficiente para satisfazer a demanda biológica (CASSINI, 2005; REIS; FURLANI-JUNIOR; HAGA, 2007; IKEDA, 2010).

Outra enzima importante a ser destacada é a nitrogenase, enzima responsável por catalisar a redução do nitrogênio atmosférico (N_2) em amônio (NH_4^+), forma metabolicamente utilizável pela planta (MOREIRA et al., 2010). Essa característica é responsável pela FBN promovida por bactérias diazotróficas associadas a plantas. Essas bactérias atualmente se destacam como alternativa eficaz principalmente na substituição parcial ou total de fertilizantes nitrogenados. Além dessa importante função, a enzima nitrogenase pode ainda reduzir outros substratos, como o acetileno em etileno que pode ser detectado através de cromatografia gasosa (GALLOWAY et al., 2003; TEIXEIRA et al., 2007; MARTINS, 2013; ESKIN; VESSEY; TIAN, 2014).

As bactérias são uma extraordinária fonte de enzimas devido à sua diversidade bioquímica, sua capacidade de crescimento rápido em espaço muito pequenos tornando esses microrganismos fontes preferenciais para produção de enzimas extracelulares (KARN; KUMAR, 2015; SHARMA et al., 2015). Atualmente cerca de 20 tipos de enzimas de origem microbiana são produzidos em escala industrial. Do total de enzimas utilizadas pela indústria cerca de 75% são enzimas classificadas como hidrolíticas. (ROBINSON, 2015; LI et al., 2012). Entre as principais enzimas exploradas pela indústria biotecnológica encontram-se as proteases, amilases, celulases e lipases utilizadas para a degradação de várias substâncias naturais (LI et al., 2012).

Proteases

As enzimas proteolíticas constituem o maior grupo de enzimas usado na indústria (SUNAR; KUMAR; DESHMUKH, 2016). Classificadas como hidrolases peptídicas ou peptidases (EC 3.4), as proteases podem ser divididas em endopeptidases (EC 3.4.21-24 e EC 3.4.21-99) e exopeptidases (EC 3.4.11-19). Essas enzimas hidrolíticas são capazes de clivar ligações peptídicas em proteínas e fragmentos de proteínas (RAO et al., 1998; SOUZA et al., 2015). Com ampla variedade de aplicações, as proteases representam mais de 60% do mercado global de enzimas (ADRIO; DEMAINE, 2015; KARN; KUMAR, 2015).

Dentre as principais aplicações industriais, nas quais é empregado o uso de proteases, podem ser citados a indústria de alimentos, participando do processamento de carne e fabricação de queijos; a indústria têxtil, em que são empregadas no tratamento do couro; a fabricação de seda; e de produtos agroquímicos (SANTIAGO; MOTTA, 2008; ADRIO; DEMAINE, 2015). As proteases podem também apresentar grande aplicabilidade relacionada ao biocontrole de patógenos de plantas, uma vez que essa enzima pode promover a degradação de parede celular de fungos fitopatogênicos (KIM; CHUNG, 2004).

Amilases

Já as amilases (E.C: 3.2.1.0) são enzimas classificadas como hidrolases glicosídicas e representam o segundo maior grupo com 25 a 30% do mercado de enzimas (DEB et al., 2013; AMID; MANAP, 2014). As amilases podem se apresentar em três tipos principais: α -amilase (E.C.3.2.1.1), β -amilase (EC 3.2.1.2) e γ -amilase (EC 3.2.1.3), definidas de acordo com seus papéis nas reações enzimáticas (SUNDARRAM; MURTHY, 2014). Essas enzimas quando

extracelulares são capazes de hidrolisar ligações α -1,4-glicosídicas em polissacáridos contendo três ou mais unidades de glicose, como o amido (DEB et al., 2013; AMID; MANAP, 2014).

Em comparação às amilases obtidas a partir de plantas e de animais, as amilases microbianas apresentam maior estabilidade e possibilidade de produção em massa de forma econômica e de fácil manipulação (OLIVEIRA et al., 2007; GURUNG et al., 2013). As amilases de maior aplicação comercial são produzidas majoritariamente por bactérias do gênero *Bacillus*, tais como: *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus* e *B. amyloliquefaciens*. Essas enzimas possuem diferentes empregabilidades, atuando na hidrólise de amido para fabricação de papel, na indústria têxtil e alimentícia; na preparação de tintas; na produção de xaropes de açúcar a partir de amido, bem como em setores da agroindústria e engenharia ambiental (ENSHASY, 2007; BOŽIĆ et al., 2011; ABD-ELHALEM et al., 2015). Amilases, por catalisarem a hidrólise de grandes moléculas de carboidratos em moléculas menores que posteriormente podem ser absorvidas pela célula, podem ser utilizadas ainda na transformação de poluentes e remediação de águas residuais (GIANFREDA; RAO, 2004; ALI et al., 2014)

Lipases

As lipases ou éster hidrolases de triacilglicerol (EC 3.1.1.3) são uma classe de enzimas hidrolíticas com capacidade de catalisar a hidrólise de triacilglicerol em glicerol e ácidos graxos livres. As lipases catalisam ainda a hidrólise, a transesterificação e a síntese de ésteres e exibem propriedades enantiosseletivas (TREICHEL et al., 2010; SALIHU; ALAM, 2015). As lipases são consideradas enzimas-chave devido suas propriedades multifacetadas, como a elevada estabilidade em solventes orgânicos.

Geralmente essas enzimas não dependem de cofatores para catalise, e por isso podem ser amplamente utilizadas em diferentes reações de hidrólise que é determinada pelo tipo de solvente (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004; AKOH et al., 2007; SALIHU; ALAM, 2015). Processos catalisados por lipases oferecem uma boa relação custo-eficácia, em comparação a processos tradicionais que podem frequentemente apresentar problemas como grande consumo de energia e resultar em subprodutos tóxicos (SPERB et al., 2015).

Encontradas em uma ampla gama de organismos as lipases produzidas por bactérias possuem propriedades únicas. As estruturas químicas assim como as características cinéticas da enzima podem variar dependendo do microrganismo, gênero, espécie e da cepa que a produz. Isso permitem que as lipases microbianas tenham potencial para aplicações biotecnológicas distintas (MESSIAS et al., 2011; SALIHU; ALAM, 2015).

Os avanços na biotecnologia associados à clonagem, expressão e mutagênese, as técnicas de evolução dirigida, bem como as particularidades fisiológicas dos microrganismos podem conferir as lipases aspectos importantes como pH e termoestabilidade específicos necessários a cada tipo de aplicação biotecnológica (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; GOSWAMI; BASU; DE, 2013; SALIHU; ALAM, 2015).

Uma diversidade de setores da indústria emprega o uso de lipases, tais com: indústrias de alimentos, detergentes, produtos químicos finos, cosméticos, biodiesel e produtos farmacêuticos e agroquímicos (SIMONE; HOESL; BUDISA 2016). Existem várias bactérias produtoras de lipase, mas apenas algumas são comercialmente exploradas como estirpes selvagens ou recombinantes. Dentre os gêneros bacterianos produtores de lipase mais utilizados estão: *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Burkholderia* (GURUNG et al., 2013). Segundo Khoo e Ibrahim (2009) e Salihu e Alam (2012) lipases alcalinas produzidas pelas bactérias *Bacillus* sp. B207 e *Pseudomonas paucimobilis* podem ser utilizadas como aditivos na formulação de detergente por apresentarem excelente estabilidade em pH entre 7,0 e 9,0 e temperatura variando entre 30 a 50 °C. Outro uso para as lipases pode ser no tratamento de efluentes com alto teor de gordura, como evidenciado por Durli, (2007) que observou eficiência na remoção de óleos e gorduras entre 70 e 90% promovida por lipases de *Burkholderia cepacia* LTEB11 no tratamento de efluente da indústria de laticínios.

Celulases

As celulases são enzimas que constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise (CASTRO; PEREIRA JÚNIOR, 2010). Celulases pertencem às enzimas carboidratos-ativo (CAZymes), que são enzimas com módulos catalíticos e de ligação a hidratos de carbono (ou domínios funcionais) que degradam, modificam ou criam ligações glicosídicas (LÓPEZ-MONDÉJAR et al., 2016). Uma celulase por si só não é capaz de despolimerizar completamente a celulose. A hidrólise dessa substância requer o emprego de um sistema de celulases (BROWN; BROWN, 2013). São necessários três tipos de celulases principais que sinergicamente conferem a hidrólise completa da celulose. (JUTURU; WU, 2014). A endoglucanase (EC 3.2.1.4) ataca as regiões de baixa cristalinidade da fibra de celulose, nas regiões internas do polímero, enquanto a exoglucanase (EC 3.2.1.91) remove as unidades de celobiose da região livre nas extremidades de cadeia de celulose e finalmente a β -glucosidase (EC 3.2.1.21) hidrolisa as unidades de celobiose em glicose (GUPTA; VERMA, 2015).

Amplamente utilizadas em várias aplicações industriais, a celulase tem despertado o interesse não só da indústria de bioetanol, mas também na indústria de celulose e papel, têxtil, detergente, alimentos e rações, cervejeira e agrícola no controle de doenças e patógeno de plantas e na germinação melhorada de sementes (KUHAD, GUPTA, SINGH, 2011; FAWZYA et al., 2013). A hidrólise de celulose por enzimas bacterianas é uma estratégia econômica, isso porque as celulases de origem bacteriana apresentam alta atividade enzimática e termoestabilidade (GOYAL et al., 2014; SILVA; CARUSO, 2015; MORRELL-FALVEY; ELKINS; WANG, 2015). Há atualmente um interesse crescente na celulase bacteriana devido ao bom potencial de utilização e produção (FAWZYA et al., 2013). Os avanços nas pesquisas sobre celulases ocorrem em diversas áreas do conhecimento e visam estratégias para otimização do rendimento, as quais variam do isolamento de novas cepas produtoras ao aumento da expressão dessas celulases por meio de manipulação genética (CASTRO; PEREIRA JÚNIOR, 2010).

Dentre as celulases que são produzidas por bactérias sobressaem à celulase (EC 3.2.1.4) alcalina que é expressa pela espécie *Bacillus subtilis*, que apresenta excelentes propriedades para as condições de detergente (JONES; QUAX, 1998). Já as celulases produzidas pela bactéria *Thermomonospora fusca* é utilizado na obtenção do aspecto desgastado do jeans e movimenta aproximadamente US \$ 40 milhões em vendas por ano (IRWIN et al., 1998; QUAX, 2013). As celulases podem ainda serem empregadas na hidrólise de biomassas levando ao aproveitamento integral de resíduos agroindustriais, sendo caracterizada atualmente como uma das mais emergentes aplicações das enzimas do complexo celulolítico (CASTRO; PEREIRA JUNIOR, 2010).

Assim, tendo em vista a grande diversidade microbiológica, o isolamento, seleção e caracterização linhagens bacterianas associadas a plantas de sorgo cultivado no Cerrado é uma ferramenta fundamental, ao possibilitar a identificação de isolados selvagens com potencial para produção de enzimas e bioprodutos de qualidade, que resultem em processos que geram menos prejuízos ambientais.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Realizar a caracterização morfológica, bioquímica e molecular de bactérias endofíticas associadas a raízes de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor*, L. Moench) cultivado no Cerrado goiano.

3.2 Objetivos específicos

- I. Selecionar bactérias endofíticas isoladas de sorgo;
- II. Realizar a caracterização morfológica, bioquímica e genética dos isolados endofíticos de sorgo selecionados;
- III. Identificar a capacidade para produzir enzimas extracelulares e determinar o índice enzimático (IE) dos isolados bacterianos;
- IV. Avaliar a capacidade dos isolados em solubilizar fosfato e determinar o índice de solubilização (IS);
- V. Realizar a análise polifásica com base nos resultados morfofisiológicos e genéticos das bactérias endofíticas isoladas de sorgo.

4. METODOLOGIA

4.1 Material biológico

Foram utilizadas bactérias isoladas de sorgo (*Sorghum bicolor*, L. Moench) cultivado no Cerrado goiano, mantidas pelo Laboratório de Bioquímica de Microrganismos da Universidade Estadual de Goiás (UEG), Campus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas (CCET).

4.2 Seleção e manutenção dos isolados

Inicialmente, 300 bactérias foram obtidas a partir de raízes de sorgo cultivadas em solo de Cerrado, o isolamento foi realizado de acordo com Ferreira, Knupp e Martin-Didonet (2014). A partir destes isolados, a seleção das bactérias que foram utilizadas neste estudo foi realizada com base na capacidade de crescimento em três meios de cultura (Anexo I). Dois meios sem fonte de nitrogênio: NFb-lactato (PEDROSA; YATES, 1984) usado para o isolamento de bactérias do gênero *Azospirillum* (DÖBEREINER; ANDRADE; BALDANI, 1999) e meio LGI-P semisseletivo para purificação e caracterização de *Gluconacetobacter spp.* (DÖBEREINER; ANDRADE; BALDANI, 1999). Também foi utilizado o meio YMA semisseletivo para o isolamento de bactérias da família *Rhizobiaceae* (HUNGRIA; ARAUJO, 1994) (Anexo I).

De cada meio foram selecionados 8 isolados, totalizando 24 isolados bacterianos utilizados neste trabalho. Além disso, foram utilizadas em todos os ensaios as estirpes padrão: *Azospirillum brasilense* (estirpe FP2), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (estirpe Pal5) cedidas pela Universidade Federal do Paraná e *Rhizobium tropici* (estirpe BR 322) cedida pela Embrapa Agrobiologia.

As bactérias selecionadas foram purificadas em meio sólido (NFb-lac., LGI-P e YMA) pela técnica de estriamento e incubadas por 72 h a 32 °C. Após esse período, colônias isoladas foram inoculadas em 5 ml de meio NFb-lac., LGI-P e YMA em frascos de vidro estéreis e mantidas sob agitação de 140 rpm a 28 °C por 48 h. A etapa seguinte consistiu na transferência de 1,5 mL de cultura bacteriana para micro tubos estéreis, os quais foram centrifugados a 13.000 rpm durante 3 minutos. O sobrenadante foi então descartado e a massa de células concentrada foi adicionado 30 µL de glicerol 30%. As amostras foram armazenadas em freezer a -20 °C, sendo todo esse processo realizado com periodicidade de seis meses para a renovação e manutenção dos estoques.

4.3 Caracterização morfológica e bioquímica

4.3.1 Coloração de Gram

Para o teste de coloração de Gram foi adotada a metodologia descrita pelo Ministério da Saúde (2001) com modificações (Anexo I). Para o teste as amostras foram crescidas em diferentes meios sólidos (NFb-lac., LGI-P e YMA) por 48 h. Uma colônia foi então colocada em lâmina de microscopia, sendo realizado o esfregaço da amostra acrescentando 10 µL de solução fisiológica estéril. Após a secagem as lâminas foram fixadas em chama, seguida de coloração por cristal violeta (1 min.); lavagem com água destilada; solução de lugol (1 min.); lavagem com água destilada; lavagem com etanol-acetona por (20 s); lavagem com água destilada; solução de safranina (1 min.) e uma lavagem com água destilada para finalizar (Anexo I).

A análise morfológica foi realizada por meio de microscopia óptica na objetiva de 100x, utilizado o microscópio Leica ICC50 HD. As células foram classificadas quanto a coloração em: bactérias gram-negativas quando apresentaram coloração em tons rosa e gram-positivas para as coradas em violeta (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001) e quanto à forma segundo Cappuccino; Sherman (2014).

4.3.2 Morfologia

Para avaliação morfológica das colônias, as bactérias foram estriadas em placas de Petri contendo os meios sólidos (NFb-lac., LGI-P e YMA) e incubadas a 32 °C por 24 h. Para a análise da morfologia da colônia bacteriana foram adotados os critérios: 1) forma: circular, irregular, filamentosa ou puntiforme; 2) elevação: plana, lenticular, convexa, pulvinada, umbonada, umbilicada; 3) bordas: lisa, ondulada, lobada, denteada ou filamentosa; 4) superfície: lisa, rugosa, papilada; 5) brilho: opaca, translúcida ou transparente; 6) coloração: pigmentada amarela, creme, branca ou incolor e 7) produção de muco: presente abundante, moderado, escasso ou ausente (HUNGRIA; SILVA, 2011)

4.3.3 Teste de sensibilidade a antibióticos

Na avaliação de resistência a antimicrobianos o método ágar-diluição (ANVISA, 2008), que consistiu na preparação dos meios sólido NFb-lactato, LGI-P e YMA, acrescidos das concentrações de: 30 µg mL⁻¹, 50 µg mL⁻¹, 100 µg mL⁻¹ e 200 µg mL⁻¹ dos antibióticos: ácido nalidíxico (NAL), ampicilina (AMP), cloranfenicol (CLO), estreptomicina (EST) e tetraciclina (TET) preparados de acordo com Hungria; Araújo (1994).

O teste foi realizado em triplicatas e o controle negativo consistiu nos meios sólidos utilizados sem adição de antibióticos. Foram inoculadas alíquotas de 10 µL dos pré-inóculos crescidos previamente em caldo batata (DÖBEREINER; ANDRADE; BALDANI, 1999) (Anexo I), por 24 h em agitação de 140 rpm a 28 °C. As placas inoculadas com as 24 bactérias e as estirpes padrão FP2, Pal5 e BR322 foram incubadas em estufa por 7 dias a 32 °C ao abrigo de luz para evitar fotodegradação dos antibióticos (HUNGRIA; ARAÚJO, 1994). Após esse período as amostras foram avaliadas quanto ao seu crescimento ou não em comparação ao controle negativo.

4.3.4 Teste de crescimento em fonte de carbono

Para avaliar a capacidade dos isolados bacterianos para metabolizar diferentes fontes de carbono, os 24 isolados e as estirpes padrão (FP2- *A. brasilense*, Pal5- *G. diazotrophicus* e BR 322- *R. tropici*) foram cultivados em caldo mínimo (HUNGRIA; ARAÚJO, 1994) (Anexo I), acrescido individualmente das fontes de carbono: ácido maleico, ácido málico, ácido nicotínico, ácido succínico, arabinose, glicerol, glicose, frutose, inositol, manitol, manose, sacarose, sorbitol e trealose.

Os ensaios foram realizados em triplicatas e os pré-inóculos utilizados foram crescidos em caldo batata submetidos a agitação de 140 rpm e temperatura de 28 °C por 24 h. Alíquotas de 50 µL de amostra foram inoculada em 1 mL de caldo mínimo utilizando para incubação placas “deep well” de 96 poços sob agitação por 72 h. Após esse período 200 µL das amostras foram transferidas para placas de fundo chato e submetidas a leitura no Espectrofotômetro de Microplacas Epoch® sob o comprimento de onda de 600 nm para verificar o crescimento bacteriano por meio da densidade óptica.

Já para avaliar a utilização da fonte de carbono citrato de sódio foi usado o meio sólido citrato de Simmons de acordo com Teixeira; Ferreira; Santos (2008) (Anexo I). O teste foi realizado em triplicatas e consistiu na distribuição de 5 mL de meio sólido em frascos de vidro estéreis. Após secagem foram inoculados 10 µL de pré-inóculo crescido em caldo batata por 24 h a 28 °C sob agitação a 140 rpm. A avaliação do resultado foi determinada de acordo com padrões de alteração de cor do meio, sendo interpretado como positivo quando houve mudança da coloração de verde para azul, resultante da formação de carbonato de sódio. A permanência da coloração verde do meio foi designada como negativo para uso de citrato como fonte de carbono.

4.3.5 Detecção de sideróforos

Na detecção da presença de compostos com atividade quelante de Fe^{3+} , empregou-se o método universal CAS (Cromo Azul S) (SCHWYN; NEILAND, 1987). Para o ensaio, foi utilizada placa de fundo chato, na qual foram pipetados 100 μL de pré-inóculo crescido por 24 h em caldo batata e adicionado 100 μL do reativo de CAS. O branco consistiu em 100 μL de caldo batata sem inóculo acrescido de 100 μL de solução CAS, o teste foi realizado em triplicata e deixado reagir por 30 minutos protegido da luz. O resultado foi avaliado e determinado como positivo quando houve alteração da cor.

4.3.6 Testes enzimáticos

4.3.6.1 Teste de catalase

A atividade da enzima catalase foi avaliada segundo MacFaddin (1980) em meio sólido semisseletivo (NFb-lac., LGI-P e YMA). O teste, realizado em triplicatas, consistiu na inoculação de 10 μL de pré-inóculo crescidos em caldo batata por 24 h a 28 °C sob agitação a 140 rpm. Após este período, as amostras foram incubadas em estufa a 32 °C por 48 h e então foi adicionado sobre a colônia 50 μL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3%. Após 3 min., foi verificado se houve liberação de O_2 na forma de bolhas sendo constatado como resultado positivo para atividade da catalase (MADIGAN et al., 2012).

4.3.6.2 Teste de urease

Para a atividade da enzima urease, foi utilizado o meio sólido uréia (CHRISTENSEN, 1946), seguindo a metodologia de análise proposta por Teixeira; Ferreira; Santos (2008) (Anexo I). O teste foi feito em triplicatas e para sua realização o volume de 5 mL de meio ureia foi distribuído em frascos de vidro que em seguida foram inoculados com 10 μL de pré-inóculo. As amostras foram mantidas sob incubação a 32 °C durante 72 h. A interpretação da reação positiva ou negativa da ação da urease foi realizada por observação de alteração da cor do meio. A atividade positiva da urease foi detectada pela alteração de amarelo para a cor rosa-pink, sendo interpretado como negativo a permanência da coloração amarela.

4.3.6.3 Teste de redução de nitrato

A atividade da enzima nitrato redutase foi realizado utilizando a metodologia proposta por Neyra et al. (1977). As bactérias foram crescidas por 48 h em diferentes meios sólidos (NFb, LGI-P e YMA) a 32 °C. O teste foi realizado em triplicatas e o procedimento consistiu na

inoculação dessas bactérias em frascos de vidro contendo 4 mL do meio de cultura semissólido NFb-lac. acrescido de nitrato de potássio (KNO_3) 1 g L^{-1} em seguida as amostras foram incubadas a $32 \text{ }^\circ\text{C}$ por 72 h. Após esse período de incubação os tubos foram agitados vigorosamente para verificar a presença de óxido nitroso. Foram consideradas como positivas as culturas onde a formação de bolhas foi constatada, o que indica, a fermentação anaeróbica resultante da conversão de nitrato (NO_3^-) em óxido nitroso (NO_2) (NEYRA et al., 1977). A ausência de bolhas foi considerada como negativo para atividade da enzima nitrato redutase.

4.3.6.4 Avaliação qualitativa da enzima nitrogenase

Para este teste as bactérias isoladas de sorgo e estirpes padrão FP2, BR322 e Pal5, foram inoculadas em 4 mL dos meios de cultura semissólido NFbHP livre de nitrogênio (PEDROSA; YATES, 1984) (Anexo I). A determinação da provável capacidade de fixar nitrogênio se deu de acordo com a formação de uma película aerotóxica típica de aparência leitosa próximo a superfície do meio (DÖBEREINER et al., 1995).

4.3.6.5 Teste de detecção de enzimas extracelulares

A detecção da produção de enzimas extracelulares foi realizada segundo a metodologia descrita por Cappuccino; Sherman (2014). Os isolados bacterianos utilizados no estudo foram testados quanto à capacidade de produção de enzimas extracelulares com base no cultivo em meio de cultura sólido em placas de Petri acrescido do substrato específico para cada enzima extracelular testada, conforme (Tabela 1).

Tabela 1. Relação da atividade enzimática, meios de cultura e período de incubação para o teste de triagem de atividade enzimática dos isolados bacterianos estudados.

Enzima	Substrato	Período de incubação
Amilases	Amido	5 dias
Proteases	Leite	3 dias
Celulases	CMC	7 dias
Lipases	Tween	5 dias

Para avaliação da atividade da celulase em meio CMC, o halo de degradação foi revelado pelo acréscimo de solução de vermelho congo 0,1% seguido de lavagem com solução de $\text{NaCl } 1 \text{ mol L}^{-1}$ (DINESH et al., 2015). Para a avaliação da atividade enzimática foi determinado segundo Hankin e Anagnostakis (1975), o índice enzimático (IE) obtido pela fórmula:

$$IE = \frac{\varnothing h}{\varnothing c}$$

Onde:

IE = índice enzimático;

$\varnothing c$ = diâmetro da colônia (cm);

$\varnothing h$ = diâmetro do halo (cm).

Para determinação da eficiência da produção de enzimas extracelulares os valores de IE $\leq 0,99$ foram considerados negativos para produção de halo de degradação e valores de IE $\geq 1,0$ foram considerados positivos. As bactérias que apresentaram valores de índice enzimático (IE) superior a 1,5 foram consideradas boas produtoras de enzimas extracelulares.

4.3.6.6 Solubilização de fosfato

A fim de verificar a capacidade de solubilização de fosfato foram utilizados os meios: GL (SYLVESTER-BRADLEY et al. 1982), Pikovskaya - PVK (PIKOVSKAYA, 1948), e NBRIP (NAUTIYAL, 1999) (Anexo I). Para avaliar a capacidade de solubilizar fosfato de alumínio (P-Al), foi utilizado o meio GL adaptado de acordo com Hara; Oliveira (2005) o qual foi acrescido de K_2HPO_4 e $AlCl_3$ e o pH ajustado para 4,5. Os testes foram feitos em triplicatas e os pré-inóculos foram crescidos em caldo batata por 48 h mantidos sob agitação a 140 rpm a uma temperatura de 28 °C.

Após este período, uma alíquota de 10 μ L foi inoculada em placa contendo os meios sólidos NBRIP, PVK, GL (P-Ca) e GL (P-Al). As placas foram incubadas a uma temperatura de 32 °C por 7 dias para avaliação em meio PVK e por 15 dias nos meios sólido NBRIP, GL (P-Ca) e GL (P-Al). A avaliação da capacidade de solubilizar fosfato se deu pela determinação do índice de solubilização (IS) segundo Hankin e Anagnostakis (1975).

$$IS = \frac{\varnothing h}{\varnothing c}$$

Onde:

IS = índice enzimático;

$\varnothing c$ = diâmetro da colônia (cm);

$\varnothing h$ = diâmetro do halo (cm).

Os isolados que apresentaram IS igual ou abaixo de 0,99 foram considerados negativos para produção de halo solubilização de fosfato. Os valores de $IS \geq 1,0$ foram considerados positivos e isolados com $IS \geq 1,5$ foram considerados bons solubilizadores de fosfato.

4.4 Caracterização genética

4.4.1 Extração DNA

Para realização de análises moleculares, as 24 bactérias isoladas de sorgo e estirpes padrão FP2, BR322 e Pal5 foram submetidas ao procedimento de extração de DNA adaptado de Reis Júnior et al. (2004). As bactérias foram crescidas em meio NFb-Lactato, LGI-P e YMA acrescidos de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina e $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ácido nalidíxico e incubadas por 24-72 h a 28°C sob agitação a 140 rpm. Após esse período, alíquotas de 4 mL foram centrifugadas por 3 min., e o sobrenadante descartado. A massa de células concentrada foi então lavada com solução salina (NaCl 0,9%) e novamente centrifugado para remoção de resíduos do metabolismo celular e do meio de cultura.

O concentrado de células foi ressuspensionado e delicadamente homogeneizado em $1.000 \mu\text{L}$ da solução de lise e incubado em banho termostaticado por 10 minutos a 80°C . Em seguida as amostras foram submetidas a resfriamento em banho de gelo por 5 minutos, e então acrescidas de $8 \mu\text{L}$ de solução de RNase (10 mg mL^{-1}) e incubados por 1 h a 37°C . Para interrupção da atividade enzimática da RNase as amostras foram novamente levadas ao resfriamento em banho de gelo por 5 minutos. A precipitação do DNA foi obtida pela adição de $200 \mu\text{L}$ de NaCl (0,5 M) as amostras foram incubadas por 30 minutos sob a temperatura de -20°C e então centrifugadas a 13.000 rpm por 30 min.

O sobrenadante foi transferido para um novo tubo já contendo $600 \mu\text{L}$ de isopropanol gelado sendo novamente incubados por 30 minutos sob a temperatura de -20°C , seguido de nova centrifugação a 13.000 rpm por 25 minutos. O sobrenadante então foi descartado e foram adicionados $600 \mu\text{L}$ de solução de etanol 70% com posterior centrifugação a 13.000 rpm por 15 minutos para lavagem do precipitado. Após o descarte do sobrenadante, os tubos foram deixados em posição invertida para secagem por aproximadamente 1 h em temperatura ambiente. O DNA extraído foi então, ressuspensionado em $30 \mu\text{L}$ de tampão T10E1 (10 mM Tris-Cl, pH 7.5 e 1 mM EDTA) a fim de conservar o DNA e prevenir a ação de exonucleases. As amostras foram armazenadas a -20°C em ultra freezer (Q315U-32 Quimis®) para utilização em análises posteriores.

4.4.2 Amplificação em PCR da região espaçadora intergênica 16s-23S rRNA

Os DNAs extraídos dos 24 isolados de sorgo e estirpes padrão FP2, BR322 e Pal5 foram utilizados na caracterização molecular realizada por meio da técnica de PCR. A amplificação em PCR foi realizada para a região espaçadora intergênica 16S-23S rRNA onde foram utilizados os *primers*: pHr (*reverse*) (5'-TGC GGC TGG ATC ACC TCC TT-3') e p23SROI (5'-GGC TGC TTC T AA GCC AAC-3') (MASSOL-DEYA et al.,1995) (Tabela 2).

Tabela 2. Composição da mistura reacional PCR região espaçadora intergênica 16S-23S rRNA.

Mistura reacional para PCR	Volume
H ₂ O estéril	14,6 µL
Tampão PCR - <i>GeneDireX</i> ®	2,0 µL
dNTP	0,2 µL
Primer 1 <i>Sigma-Aldrich</i> ®	0,2 µL
Primer 2 <i>Sigma-Aldrich</i> ®	0,2 µL
Taq polimerase - <i>GeneDireX</i> ®	1,5 U
DNA	1,0 µL
Volume da Reação	20 µL

O protocolo de ciclos para amplificação em PCR da região espaçadora intergênica 16S-23S rDNA foi modificado de Reis Júnior et al. (2004) e consistiu em quatro etapas: primeiro a desnaturação inicial ocorrida a uma temperatura de 94 °C durante 4 min. em apenas um ciclo; a segunda etapa englobou a desnaturação a 94 °C por um min., seguida do anelamento a 62 °C por 45 s e extensão com temperatura de 72 °C também por 45 s com 30 repetições e finalmente a extensão terminal a 75 °C durante 5 min. composta por apenas um ciclo.

Os produtos de PCR obtidos da amplificação da região espaçadora intergênica 16S-23S foram revelados por eletroforese com gel de agarose. Para isso foi utilizada uma amostra de 1µL da reação de PCR, e gel de agarose 1,2% imerso em tampão TBE 1X (Tris-borato-EDTA, pH 8,0), sendo aplicada uma corrente elétrica de 90 volts durante 1 h. Para comparação do padrão eletroforético obtido, foi utilizado o marcador de peso molecular 1Kb-DNA-Ladder da BioLabs®. O gel foi corado em brometo de etídio (1 mg mL⁻¹) (SAMBROOK, FRITSCH, MANIATIS, 1989) e então observado e fotografado por meio do transiluminador UV Multi Doc-It Imaging System® (UVD) com câmera digital acoplada.

4.5 Análise de dados

Os dados morfológicos e bioquímicos assim como os índices enzimáticos e de solubilização foram analisados por estatística descritiva cujos resultados foram expressos em porcentagem usando o software Microsoft Excel® pacote Office 2016.

Os dados bioquímicos e moleculares também foram submetidos separadamente à análise de agrupamento. Os dados foram utilizados para gerar uma matriz binária (presença / ausência) para avaliar a similaridade entre os 24 isolados e as 3 estirpes padrão. Os índices de similaridade foram estimados pelo coeficiente de similaridade de Jaccard (J) e o agrupamento foi realizado pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean*), utilizando o software NTSYSpc 2.02i Applied Biostatistics (Ikeda et al., 2013).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir de 300 bactérias isoladas de sorgo, foram selecionados um total de 24 isolados a partir dos três meios semisseletivos utilizados (NFb-lac., LGI-P e YMA). Oito bactérias foram selecionadas do meio NFb-lac.: NS14, NS15, NS23, NS24, NS32, NS37, NS48, NS77. Em meio LGI-P foram selecionados os isolados: LS2, LS6, LS23, LS28, LS29, LS62, LS80, LS82. No meio YMA foram obtidos os isolados: YS10, YS25, YS26, YS27, YS54, YS59, YS63 e YS66.

5.1 Caracterização morfológica e bioquímica

5.1.1 Coloração de Gram e morfologia celular

Apesar da morfologia celular bacteriana ser uma determinação genética, variações podem ocorrer em decorrência das condições ambientais as quais o microrganismo está submetido (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004). A partir da coloração de Gram, todas as bactérias isoladas de sorgo assim como as estirpes padrão FP2, BR322 e Pal5 foram classificados como bactérias gram-negativas. Entre os 24 isolados de sorgo selecionados 25% apresentaram morfologia de bacilos e 75% de cocos. As estirpes padrão utilizados pertencem aos gêneros: *Azospirillum* (FP2), *Rhizobium* (BR322) e *Gluconacetobacter* (Pal5), e foram classificados como bacilos gram-negativos, estando de acordo com a literatura (HALL; KRIEG, 1984; BODDEY; URQUIAGA; DÖBEREINER, 1991; HUNGRIA; ARAUJO, 1994; GARRITY; HOLT, 2001).

Os resultados obtidos diferem dos observados por Pérez et al. (2010), que verificou entre 37 bactérias isoladas de sorgo produzido em Cuba, apenas 29,7% isolados gram-negativos. De acordo com Moreira e Siqueira (2006) a ampla diversidade morfológica das bactérias está intimamente ligada a grande diversidade existente de espécies associadas a plantas.

5.1.2 Morfologia da colônia

Para as características morfológicas foi verificado que 62,5% das bactérias isoladas de sorgo apresentaram elevação umbilicada, presença de colônias com pigmento creme e borda lobada da colônia (Tabela 3). A produção de muco foi observada em 66,7% dos isolados. Foi identificada forma irregular em 50% dos isolados, enquanto brilho translúcido foi verificado em 41,7% das bactérias (Tabela 3).

Tabela 3. Morfologia da colônia de 24 bactérias isoladas de sorgo (*S. bicolor*, L. Moench) e estirpes padrão FP2 (*A. brasilense*), BR322 (*R. tropici*) e Pal5 (*G. diazotrophicus*).

Bactérias	Morfologia da colônia						
	Forma	Elevação	Bordas	Superfície	Brilho	Cor	Muco
NS14	Circular	Umbilicada	Lisa	Lisa	Opaca	Creme	Escasso
NS15	Circular	Lenticular	Lisa	Rugosa	Opaca	Creme	Ausente
NS23	Circular	Umbilicada	Lisa	Lisa	Opaca	Creme	Ausente
NS24	Circular	Umbilicada	Lisa	Lisa	Opaca	Creme	Ausente
NS32	Circular	Umbilicada	Lisa	Lisa	Opaca	Creme	Escasso
NS37	Circular	Umbilicada	Lisa	Lisa	Opaca	Creme	Escasso
NS48	Puntiforme	Umbonada	Lobada	Papilada	Translúcida	Creme	Ausente
NS77	Puntiforme	Umbonada	Lobada	Papilada	Translúcida	Creme	Ausente
LS2	Irregular	Umbilicada	Lobada	Lisa	Transparente	Incolor	Escasso
LS6	Irregular	Umbilicada	Lobada	Lisa	Transparente	Incolor	Escasso
LS23	Irregular	Umbilicada	Lobada	Lisa	Transparente	Incolor	Ausente
LS28	Irregular	Umbilicada	Lobada	Lisa	Transparente	Incolor	Escasso
LS29	Irregular	Umbilicada	Lobada	Lisa	Transparente	Incolor	Escasso
LS62	Irregular	Umbilicada	Lobada	Lisa	Transparente	Incolor	Escasso
LS80	Irregular	Umbilicada	Lobada	Lisa	Transparente	Incolor	Escasso
LS82	Irregular	Umbilicada	Lobada	Lisa	Transparente	Incolor	Escasso
YS10	Circular	Umbilicada	Lisa	Lisa	Translúcida	Amarelo	Escasso
YS25	Circular	Convexa	Lobada	Lisa	Translúcida	Creme	Ausente
YS26	Irregular	Convexa	Lobada	Lisa	Translúcida	Creme	Escasso
YS27	Irregular	Convexa	Lobada	Lisa	Translúcida	Creme	Escasso
YS54	Filamentosa	Convexa	Filamentosa	Lisa	Translúcida	Creme	Ausente
YS59	Irregular	Umbilicada	Filamentosa	Lisa	Translúcida	Creme	Escasso
YS63	Circular	Convexa	Lobada	Lisa	Translúcida	Creme	Escasso
YS66	Irregular	Convexa	Lobada	Lisa	Translúcida	Creme	Escasso
FP2	Circular	Convexa	Lisa	Lisa	Translúcida	Creme	Ausente
Pal5	Circular	Convexa	Lobada	Lisa	Translúcida	Amarelo	Ausente
BR322	Circular	Convexa	Lisa	Lisa	Translúcida	Creme	Escasso

Pérez et al. (2010) caracterizaram bactérias endofíticas isoladas de raiz de sorgo e 70,3% dos isolados apresentaram colônias de elevação umbilicada e forma irregular (81%), similares aos resultados obtidos para os isolados aqui avaliados. Os resultados foram diferentes para cor e o brilho da colônia, onde 83,8% dos isolados destes autores apresentaram colônias brancas opacas.

Para Neiverth (2012), a caracterização morfológica da colônia pode ser útil como ferramenta para o estudo de um maior número de representantes das populações, tornando possível agrupar indivíduos morfológicamente semelhantes. Segundo Gaiero et al. (2013) a caracterização e análise morfológica das colônias é parte complementar aos testes moleculares atualmente utilizados.

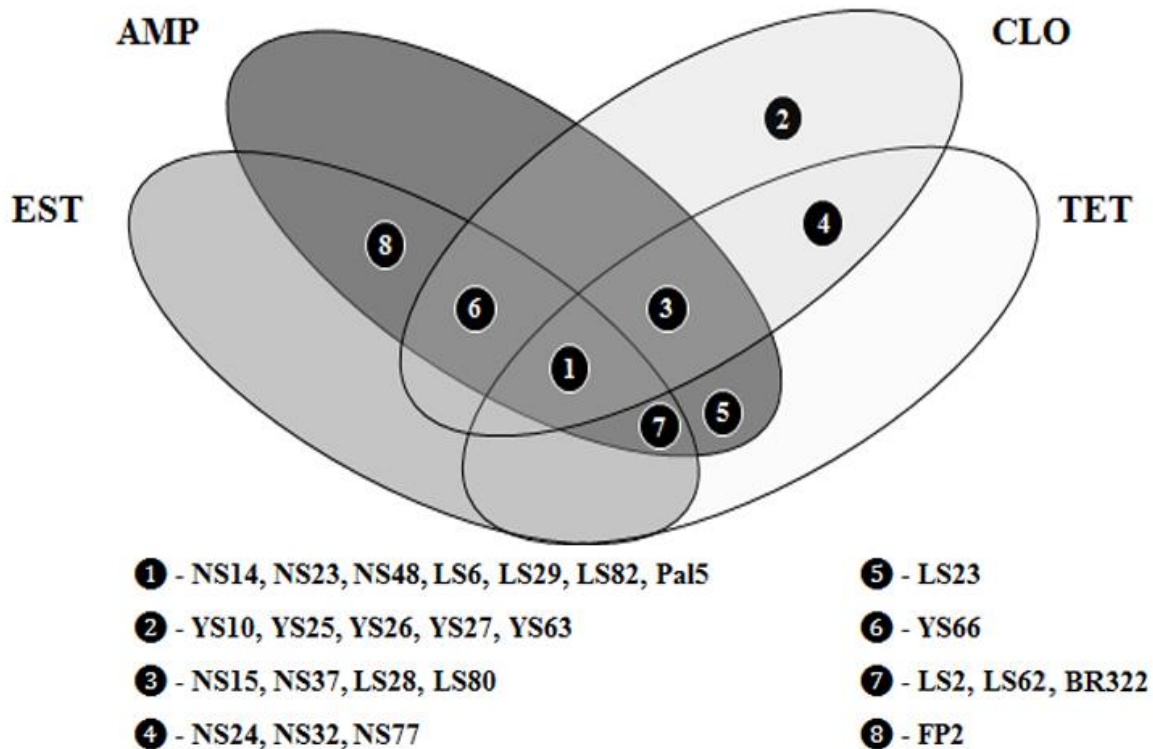
Como resultado foi possível ainda observar que entre as 24 bactérias estudadas houve uma tendência de similaridade das características apresentadas entre os isolados de um mesmo meio semisseletivo (Tabela 3). Moreira et al. (2010) destacam a importância de se conhecer as

características fenotípica de uma população bacteriana associadas a plantas, uma vez que aliada a aspectos genéticos são importantes ferramentas para compreensão dos fatores que influenciam a fisiologia desses microrganismos.

5.1.3 Teste de sensibilidade a antibióticos

Segundo Hawkey (1998) os mecanismos de resistência aos antibióticos podem ocorrer naturalmente como resultante de aspectos biológicos do próprio microrganismo. Nos testes de sensibilidade a antibióticos foi considerado para avaliação dos resultados a concentração máxima testada de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 1).

Figura 1. Isolados bacterianos resistentes a concentração de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos antibióticos EST (estreptomicina), AMP (ampicilina), TET (tetraciclina) e CLO (cloranfenicol).



Dos 24 isolados testados 62,5% apresentaram sensibilidade ao antibiótico estreptomicina (EST) e 41,7% ao antibiótico ampicilina (AMP). Assim como a estirpe padrão FP2 33,3% e 20,8% dos isolados foram sensíveis a tetraciclina (TET) e cloranfenicol (CLO) respectivamente. Todos os isolados e estirpes padrão (FP2, Pal5 e BR322) utilizadas no teste apresentaram resistência ao ácido nalidíxico (NAL) (Tabela 4).

Tabela 4. Resistência de 24 isolados de sorgo (*S. bicolor*, L. Moench) e estirpes padrão para concentrações (30, 50, 100 e 200 µg mL⁻¹) de diferentes antibióticos.

Bactéria	Ampicilina				Cloranfenicol				Estreptomicina				Tetraciclina				Ácido nalidíxico				% CIDAC
	30	50	100	200	30	50	100	200	30	50	100	200	30	50	100	200	30	50	100	200	
NS14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
NS15	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	80
NS23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
NS24	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	60
NS32	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	65
NS37	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	80
NS48	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
NS77	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	60
LS2	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	95
LS6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
LS23	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	85
LS28	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	80
LS29	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
LS62	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	90
LS80	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	85
LS82	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
YS10	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	45
YS25	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	40
YS26	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	45
YS27	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	50
YS54	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	30
YS59	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	40
YS63	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	85
YS66	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	95
FP2	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	65
Pal5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
BR 322	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	95
% CIPAC	81,5	70,4	66,7	63,0	100	92,6	85,2	74,1	59,3	55,6	51,9	44,4	74,1	74,1	74,1	66,7	100	100	100	100	

%CIDAC - Percentual de crescimento dos isolados nos diferentes antibióticos e concentrações.

%CIPAC - Percentual de crescimento dos isolados por antibiótico em cada concentração.

A versatilidade genética e metabólica das bactérias são fatores que influenciam a eficiência adaptativa tornando-as eficientes colonizadores de ambientes ricos em recursos ou de extrema competição. Frente as pressões ambientais, a resistência à antibióticos que as bactérias apresentam é um tipo de estratégia de sobrevivência, adaptação e competitividade por habitat (LEVY, 1997; BRADER et al., 2014).

Ikeda et al. (2013) na caracterização de 217 bactérias endofíticas isoladas de milho verificou que 87% de isolados foram sensíveis a tetraciclina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$). Altos percentuais também foram verificados entre isolados de sorgo no Uruguai em um estudo desenvolvido por Mareque et al. (2015), que observou resistência de 63% a ácido nalidíxico, 89% a estreptomicina e 81% a tetraciclina das 188 bactérias avaliadas na pesquisa. Esses resultados são divergentes ao verificado para os isolados de sorgo aqui testados que foram sensíveis aos antibióticos estreptomicina, tetraciclina, ampicilina e cloranfenicol, e apresentaram resistência a ácido nalidíxico (Tabela 4). Isso sugere que as bactérias isoladas de sorgo apresentam alta capacidade de adaptação e competição, tendo em vista a grande diversidade e o estresse abiótico que o bioma Cerrado proporciona.

5.1.4 Teste de crescimento em fonte de carbono

Os 24 isolados de sorgo avaliados foram capazes de utilizar a maioria das diferentes fontes de carbono utilizadas, demonstrando grande amplitude metabólica quanto ao uso de fontes de carbono (Tabela 5). Entre as fontes testadas a mais restritiva ao crescimento bacteriano foi o ácido nicotínico para o qual não houve crescimento dos isolados bacterianos testados e estirpes padrão FP2, BR322 e Pal5. O ácido maleico foi a segunda fonte mais restritiva, onde 91,7% dos isolados não apresentaram crescimento (Tabela 5).

Os isolados foram mais eficientes na utilização das fontes de sacarose, trealose e citrato (100%), seguido de manitol (96,3%) e ácido succínico, glicose, manose e sorbitol com 92,6% das bactérias testadas (Tabela 5). Os isolados NS32, NS37 e YS10 apresentaram crescimento em 86,7% das fontes testadas e, portanto, foram considerados os mais eficientes no uso das diferentes fontes de carbono fornecidas (Tabela 5).

Tabela 5. Utilização de fontes de carbono para as 24 bactérias isoladas de sorgo e estirpes padrão FP2 (*A. brasilense*), PA15 (*G. diazotrophicus*) e BR322 (*R. tropici*).

Bactéria	¹ MA	MaA	NCA	SCA	ARA	FTS	GCS	GCR	INT	MNT	MNS	SCS	SBT	TLS	CTT	% CIDFC
NS14	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	60
NS15	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	66,7
NS23	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	66,7
NS24	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	80
NS32	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	86,7
NS37	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	86,7
NS48	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	60
NS77	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	66,7
LS2	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	66,7
LS6	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	66,7
LS23	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	53,3
LS28	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	66,7
LS29	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	66,7
LS62	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	66,7
LS80	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	53,3
LS82	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	60
YS10	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	86,7
YS25	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	60
YS26	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	73,3
YS27	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	53,3
YS54	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	73,3
YS59	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	60
YS63	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	66,7
YS66	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	73,3
Pal5	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	73,3
FP2	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	60
BR322	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	73,3
% ICPFC	88,9	7,4	0	92,6	22,2	66,7	92,6	25,9	37	96,3	92,6	100	92,6	100	100	

¹Fontes de carbono: MA= ácido málico, MaA= ácido maleico, NCA= ácido nicotínico, SCA= ácido succínico, ARA= arabinose, FTS= frutose, GCR= glicerol, GCS= glicose, INT= inositol, MNT= manitol, MNS= manose, SCS= sacarose, SBT= sorbitol TLS= trealose e CTT= citrato.

%CIDFC - Percentual de crescimento do isolado nas diferentes fontes de carbono. %ICPFC - Percentual de isolados com crescimento positivo para cada fonte de carbono.

A capacidade de utilizar uma grande variabilidade de fontes de carbono é observada por Ikeda et al. (2013) e Mareque et al. (2015) que também verificaram ampla capacidade no uso de diferentes fontes de carbono por isolados bacterianos de milho e de sorgo respectivamente. Esses dados corroboram com o estudo de Fernandes Júnior et al. (2012), que relatam a eficiência de bactérias endofíticas isoladas de guandu, na utilização de frutose (92%) e glicose (89%), já para a utilização de ácido málico para os isolados de guandu (19%) a percentagem foi bem inferior aos resultados obtidos para os isolados de sorgo estudados (Tabela 5).

A exemplo dos isolados testados, a estirpe padrão BR322 (*R. tropici*) também não foi capaz de crescer quando fornecido ácido nicotínico como fonte de carbono, estando de acordo com os achados de Berge et al. (2009) que evidencia que a baixa capacidade para metabolizar esse tipo de fonte de carbono, é uma característica apresentada por bactérias *Rhizobium*.

A eficiência no uso de citrato também foi observada por Khalifa et al. (2016) na caracterização de bactérias endofíticas isoladas de raízes de espécies de plantas de não-nodulantes. Teixeira; Ferreira; Santos (2008) observaram que isolados de milho foram mais eficientes na utilização de citrato em comparação a isolados de cana-de-açúcar e outras gramíneas que apresentaram resultados negativos.

A variação da capacidade de metabolização de diferentes fontes de carbono estão diretamente relacionados com a maquinaria metabólica, sendo possível supor que os isolados de sorgo estudados possuem uma ampla capacidade metabólica.

5.1.5 Detecção de sideróforos

No teste de detecção de sideróforos foi verificado que os 24 isolados bacterianos testados, assim como as estirpes padrão FP2 e BR322, apresentaram resultado negativo. A estirpe padrão Pal5 foi a única a apresentar alteração de cor sendo, portanto, considerada positiva para a presença de sideróforos.

A capacidade de produção de sideróforo é uma característica de efeito indireto sobre a promoção de crescimento das plantas (GLICK, 2012). Uma vez que sideróforos promovem o sequestro da maioria do Fe^{+3} disponível no ambiente, bactérias que produzem esses compostos apresentam a capacidade de prevenir a proliferação de fitopatógenos no ambiente rizosférico, facilitando assim o crescimento vegetal (OLIVEIRA; URQUIAGA; BALDANI, 2003). Desta forma, não foram detectados atividade de sideróforos para os isolados de sorgo estudados pela metodologia utilizadas, mas novos testes deverão ser realizados para confirmação destes dados.

5.1.6 Testes enzimáticos

5.1.6.1 Catalase

No teste de atividade de catalase 95,8% dos isolados, assim como as estirpes padrão FP2, Br322 e Pal5, apresentaram resultado positivo (Tabela 6), apenas para o isolado NS23 foi considerado negativo para essa enzima. Resultados semelhantes foram observados por Kumar et al. (2012) e Carvalho et al. (2016), na avaliação de bactérias isoladas da rizosfera, onde todos os isolados bacterianos testados no estudo foram capazes de produzir catalase.

Tabela 6. Avaliação da atividade enzimática de catalase, nitrato redutase, urease e nitrogenase para as 24 bactérias isoladas de sorgo (*S. bicolor*, L. Moench) e estirpes padrão FP2, BR322 e Pal5 (*G. diazotrophicus*).

Bactéria	Atividade enzimática				
	CLS	URS	NTT	NTG	% IAE
NS14	+	+	+	+	100
NS15	+	+	+	+	100
NS23	-	+	+	+	75
NS24	+	+	+	+	100
NS32	+	+	+	+	100
NS37	+	+	+	+	100
NS48	+	+	+	+	100
NS77	+	+	+	+	100
LS2	+	+	+	+	100
LS6	+	+	-	+	75
LS23	+	+	+	+	100
LS28	+	+	+	+	100
LS29	+	+	+	+	100
LS62	+	-	+	+	75
LS80	+	+	+	+	100
LS82	+	+	+	+	100
YS10	+	+	+	-	75
YS25	+	+	+	+	100
YS26	+	+	+	+	100
YS27	+	+	+	+	100
YS54	+	+	+	-	75
YS59	+	+	+	+	100
YS63	+	+	+	+	100
YS66	+	+	+	+	100
Pal5	+	-	+	+	75
FP2	+	+	+	+	100
BR322	+	+	+	-	75
% IAEPE	96,3	92,6	96,3	88,9	

+ = atividade positiva ; - = atividade negativa

%IAE - Percentual de isolados com atividade enzimática.

%IAEPE - Percentual de isolados com atividade enzimática positiva por enzima.

A catalase distingue-se mais notavelmente de outras enzimas metabolizadoras de peróxidos por não exigir um redutor ao catalisar uma reação e exibem elevada especificidade para H₂O₂ (MHAMDI et al., 2010). A atividade da catalase pode ser potencialmente vantajosa

para as estirpes bacterianas, pois estas tendem a ser altamente resistentes ao estresse ambiental, mecânico e químico (KUMAR, et al., 2012). Assim, a atividade da enzima catalase identificada em 95,8% dos isolados avaliados pode conferir resistência a essas bactérias tornando-as promissoras, por exemplo, para a pesquisa científicas que necessitem testes em condições de estresse ambientais.

5.1.6.2 Urease

A atividade positiva para urease foi observada em 95,8% dos isolados bacterianos avaliados. Apenas o isolado LS62 e a estirpe padrão Pal5 *G. diazotrophicus* apresentaram resultados negativos para este teste (Tabela 6). Esses resultados diferem dos observados por Gayathri et al. (2010) e Teixeira; Ferreira; Santos (2008), onde obtiveram resultados negativos para urease na maioria das bactérias isoladas de solos de Cerrado e de plantas de algodão, milho cana-de-açúcar e outras gramíneas. A urease, e os fatores que influenciam em sua atividade, tem importância elevada tendo em vista seu papel na ciclagem de nutrientes do solo e atuação no ciclo do nitrogênio apresentando, portanto, grande potencial para aplicação em práticas agrícolas como fertilizante (MOBLEY; HAUSINGER, 1989; SOARES-NETO, 2015). Assim, uma vez que 23 dos 24 isolados bacterianos apresentaram reação positiva para urease, é possível inferir que esses isolados possuem a capacidade de utilizar uréia e, portanto, são promissores para a utilização na formulação de inoculantes e testes a campo.

5.1.6.3 Redução de nitrato

No teste de capacidade de redução do nitrato, apenas o isolado LS6 apresentou resultado negativo, sendo os demais isolados (95,8%) considerados positivos para esse teste (Tabela 6). Esses resultados são similares aos relatados por Braga (2012) com 65% e Ikeda (2010) com 81% dos isolados avaliados com atividade nitrato redutase positiva, a partir da caracterização de bactérias endofíticas isoladas de arroz e milho, respectivamente.

A enzima nitrato redutase atua no primeiro passo da redução do nitrogênio a partir de nitrato. Essa enzima é importante na incorporação de nitrogênio inorgânico em moléculas orgânicas complexas, sendo a atividade da redutase de nitrato pode ser fator determinante desse processo biológico essencial (SILVA et al., 2011). Assim, os isolados de sorgo testados foram considerados como atuantes na ciclagem de nitrogênio inorgânico.

5.1.6.4 Avaliação qualitativa da enzima nitrogenase

Dos 24 isolados de sorgo avaliados 22 (91,7%) assim como as estirpes padrão FP2 e Pal5 apresentaram resultado positivo, evidenciado pela formação de película aerotáxica típica. Os isolados YS10 e YS54 foram negativos para a presença da enzima nitrogenase no teste qualitativo para formação de película de fixação em meio livre de nitrogênio (Tabela 6).

Ikeda (2010) e Braga (2012) obtiveram resultados similares, nos quais foi observada a formação da película em mais de 90% das bactérias associadas a gramínea. Esta técnica é frequentemente utilizada para identificação de bactérias fixadoras de N₂, sendo indicado a realização de testes complementares de caráter quantitativo da ação da nitrogenase, tais como, o teste de redução de acetileno a etileno para confirmação da capacidade de FBN dessas bactérias (IKEDA, 2010; BALDANI et al., 2014).

Apesar de estar presente em abundância na natureza, o nitrogênio é quase totalmente encontrado sob a forma molecular (N₂), essa forma diatômica o torna inacessível às plantas em decorrência da forte ligação tripla que une as duas moléculas (GALLOWAY et al., 2003). Para manter o alto rendimento, na agricultura moderna essa limitação de nitrogênio é contornada com a aplicação de fertilizantes nitrogenados produzidos pelo processo de Haber-Bosch (GALLOWAY et al., 2003; GEDDES et al., 2015). No entanto, o uso de fertilizantes nitrogenados industriais eleva os custos de produção e manutenção da lavoura (WILLIAMSON, 2011). Além disso, a utilização dos fertilizantes nitrogenados pode desencadear problemas ambientais por apresentar perdas elevadas por lixiviação (CRISPINO et al., 2001).

Portanto, o uso de bactérias FBN representa atualmente uma alternativa ao uso de fertilizantes industriais e permite a redução no custo da produção agrícola, com a vantagem de ser uma técnica ecológica e que torna possível a conservação do equilíbrio em sistemas agroambientais (LOPES; MORAES; LANG, 2016). Nessa perspectiva, os isolados aqui avaliados podem ser considerados PGPB com potencial para futuramente serem empregados como inoculantes para sorgo e outras gramíneas.

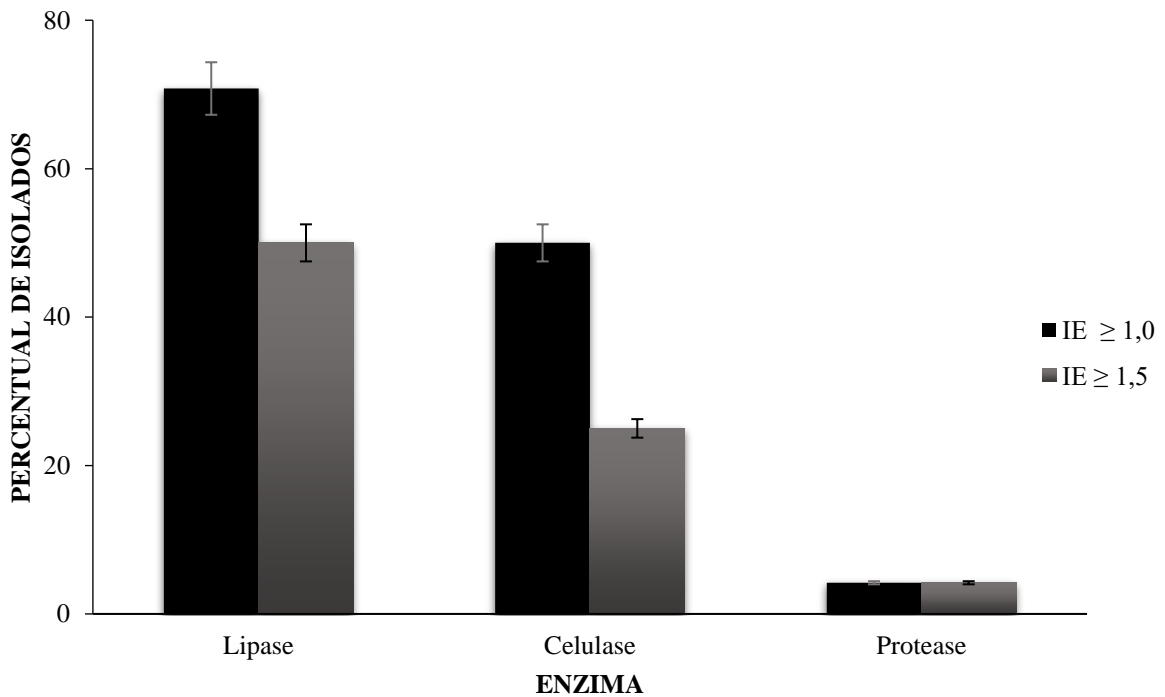
5.1.6.5 Produção de enzimas extracelulares

Para produção de enzimas extracelulares lipase celulase e protease nos isolados apresentaram índices enzimáticos (IE) variando entre 1,0 e 2,2. Em 70,8% dos isolados foi identificada a atividade de lipase, 50% para celulase e 4,2% para protease (Figura 2). Valores

de IE superiores a 1,5 foram observados 50% isolados no teste de lipase e 25% bactérias em meio CMC, e apenas o isolado NS77 no teste de protease representando 4,2% (Figura 2).

Na avaliação de atividade da enzima amilase os resultados obtidos foram negativos para todas as bactérias. Diferentemente Oliveira et al. (2006), utilizando 67 isolados identificaram que 32,8% apresentaram atividade amilolítica para os isolados de rizóbio nativos da Amazônia.

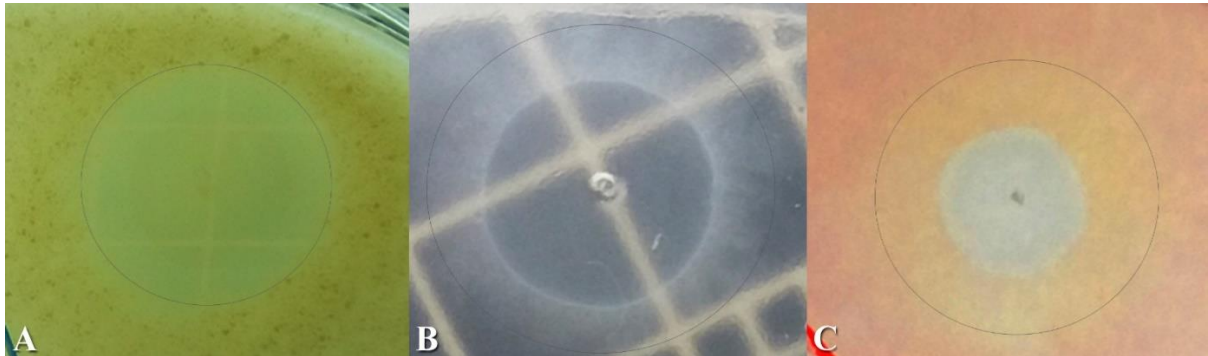
Figura 2. Percentual de isolados de sorgo com índice enzimático igual ou superior a 1,0 (IE \geq 1,0= positivos/ IE \geq 1,5= bons produtores de enzimas extracelulares).



Na triagem para produção de protease, apenas o isolado NS77 (IE 1,7) apresentou halo de degradação em meio leite indicando a atividade proteolítica assim como para a estirpe padrão BR322 com IE de 1,7 (Figura 3). O percentual de bactérias testadas com atividade protease foi negativa em 95,8%, evidenciando baixo desempenho para produção dessa enzima nos isolados.

Esses resultados são divergentes do obtido por Oliveira et al. (2006) cujo percentual de 28,4% dos isolados da rizosfera de plantas de feijão, mandioca, couve, jerimum, pepino, quiabo e gramíneas testados em seu estudo apresentaram atividade proteolítica positiva, com IE entre 1,3 e 6,6. Já Oliveira (2015), obteve valores de IE entre 1,19 e 2,10 e um percentual de 50% das bactérias isoladas de solo do Cerrado avaliadas exibiram produção de protease.

Figura 3: Halos de degradação enzimática para protease, lipase e celulase produzidas pelas bactérias isoladas de sorgo. **A:** Isolado NS77 - halo de hidrólise de proteínas do leite; **B:** Isolado LS6 - halo de degradação de Tween; **C:** Isolado YS54 - halo de hidrólise de carboximetilcelulose.



Fonte: A autora.

Para a atividade lipolítica o IE mais alto foi verificado na amostra NS24 de 2,2 e o menor IE foi apresentado pela bactéria YS26 com 1,0 (Tabela 7). Valores de IE para lipase superior a esses são relatados por Castro (2011) em um estudo sobre comunidade bacteriana endofítica cultivável associada a manguezais de São Paulo, cujo IE variou entre 1,4 e 4,3.

Tabela 7. Índices enzimáticos das 24 bactérias isoladas de sorgo (*S. bicolor*, L. Moench) e estirpes padrão FP2 (*A. brasilense*), BR322 (*R. tropici*) e Pal5 (*G. diazotrophicus*).

Bactéria	IE			
	Lipase	Celulase	Protease	Amilase
NS14	1,5 ± 0,2	1,8 ± 0,1	-	-
NS15	2,0 ± 0,2	-	-	-
NS23	-	-	-	-
NS24	2,2 ± 0,2	1,9 ± 0,2	-	-
NS32	-	-	-	-
NS37	-	-	-	-
NS48	1,4 ± 0,1	-	-	-
NS77	1,4 ± 0,2	-	1,7 ± 0,2	-
LS2	2,1 ± 0,1	-	-	-
LS6	1,4 ± 0,1	-	-	-
LS23	1,9 ± 0,3	1,6 ± 0,1	-	-
LS28	1,5 ± 0,3	-	-	-
LS29	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1	-	-
LS62	1,7 ± 0,3	1,4 ± 0,2	-	-
LS80	1,8 ± 0,3	1,4 ± 0,2	-	-
LS82	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1	-	-
YS10	1,5 ± 0,3	-	-	-
YS25	ND	1,3 ± 0,1	-	-
YS26	1,0 ± 0,2	1,4 ± 0,1	-	-
YS27	1,5 ± 0,3	1,3 ± 0,1	-	-
YS54	-	2,0 ± 0,2	-	-
YS59	-	1,5 ± 0,2	-	-
YS63	1,5 ± 0,3	-	-	-
YS66	-	-	-	-
FP2	-	-	-	-
Pal5	1,3 ± 0,1	-	-	-
BR322	-	-	1,7 ± 0,1	-
Media	1,6	1,56	1,67	-

- IE ≤ 0,99; ND- Não determinado

Oliveira (2015) identificou em bactérias isoladas de solo do Cerrado atividade lipolítica de 17,8% dos isolados, com IE variando entre 1,2 e 2,9, valor maior ao verificado para os isolados de sorgo avaliados. Já no estudo de Silva (2015) na bioprospecção e caracterização de microrganismos endofíticos de isolados de sementes de guaranazeiro, identificou resultado negativo em todos os isolados para atividade da lipase.

Isolados bacterianos que apresentem produção de lipases tem grande potencial para estudos aprofundados visando suas aplicações em processos de biorremediação podendo serem empregados no tratamento de efluentes da indústria de biodiesel (ROCHA et al., 2013). Uma vez que exibem múltiplas aplicações na indústria as lipases bacterianas extracelulares têm sua importância comercial reforçada. A facilidade de produção em massa aliada a grande diversidade, possibilita a identificação novas linhagens bacterianas menos nocivas que representem menor perigo biológico ao ser humano e que possam ser fontes para obtenção dessas enzimas (MESSIAS et al., 2011; GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004). Assim, os isolados NS15, NS24 e LS2 foram considerados promissores para estudos posteriores da atividade lipolítica.

No teste de produção de celulase, 12 dos isolados demonstraram capacidade em degradar carboximetilcelulose (Figura 2 e 3; Tabela 7). A média do IE para celulase foi de 1,5 sendo que o isolado YS54 apresentou maior IE (1,97) e o menor IE (1,3) foi verificado nos isolados YS25 e YS27 (Tabela 7). Na avaliação geral, 20,8% dos isolados testados foram considerados bons produtores de enzima celulase com $IE \geq 1,5$ (Tabela 7). Silva; Martin; Martins (2015) verificaram que 80 isolados de solo do semiárido cearense, previamente identificados como *Streptomyces*, que 75%, apresentavam atividade celulolítica positiva, com IE de até 6,9, valor de IE superior ao observado para os isolados de sorgo.

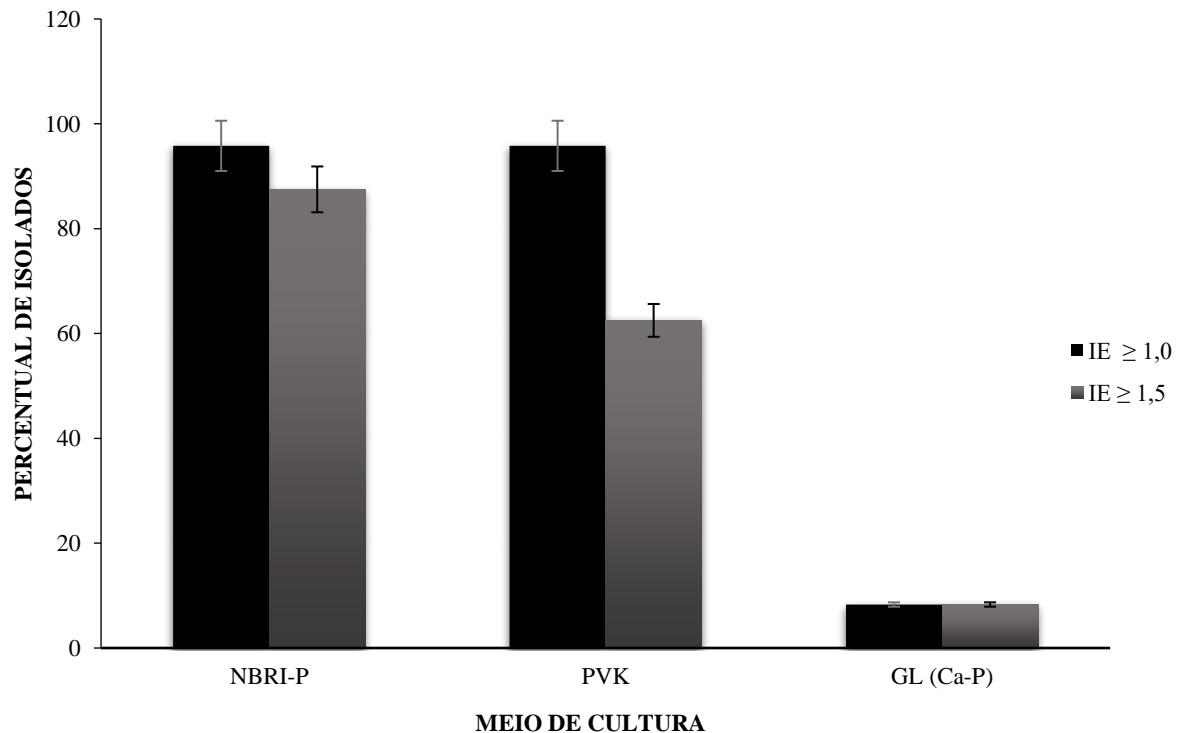
A utilização de bactérias para produção de enzimas celulolíticas tem sido extensivamente estudada devido ao potencial como degradantes de estruturas de biomassa vegetal, como destaca Goyal et al. (2014) ao verificar o potencial de bactérias do gênero *Bacillus* como fonte de produção de enzimas celulases. A capacidade em secretar enzimas celulolíticas confere ao microrganismo função importante no processo de bioconversão, e indica a capacidade de colonizar substratos complexos tais como a parede celular de plantas e de agir na parede celular de fungos fitopatogênicos (Silva Martin e Martins, 2015). Nesse sentido os resultados aqui obtidos revelam o potencial para exploração de seis bactérias isoladas de sorgo (NS14, NS24, LS23, LS29, YS54 e YS59) como promissoras na obtenção de enzimas celulolíticas.

Das estirpes padrão utilizadas neste estudo (FP2, Pal5 e BR322), apenas a *R. tropici* (BR322) apresentou atividade enzimática e somente para enzima protease com IE de 1,7 e *G. diazotrophicus* (Pal5) para lipase com IE 1,3. Assim, é possível verificar que os isolados de sorgo apresentam alta diversidade enzimática quando comparados às estirpes padrão utilizadas no presente estudo. Oliveira et al. (2006) ressaltam que a descoberta de novas fontes microbianas é de interesse estratégico para garantir o suprimento de enzimas em variados processos industriais independentes dos realizados a partir de enzimas vegetais ou animais. Nos testes realizados neste trabalho para identificar a produção de enzimas extracelulares (amilase, protease, lipase e celulase), foi possível constatar que há entre as bactérias avaliadas isolados promissores para obtenção de lipases e celulases.

5.1.6.6 Solubilização de fosfato

A capacidade de solubilizar fosfato foi identificada em 95,8% dos isolados quando utilizado os meios NBRI-P e PVK, desses 87,5% apresentaram $IS \geq 1,5$ em meio NBRI-P e 62,5% em meio PVK (Figura 4). Os IS médio foi de 1,8 em meio NBRI-P e de 1,5 em meio PVK.

Figura 4. Percentual de isolados de sorgo com índice de solubilização igual ou superior a 1,0 ($IS \geq 1,0$ = positivos/ $IS \geq 1,5$ = bons produtores de enzimas extracelulares).



Na avaliação de solubilização de fosfato os maiores valores de IS foram obtidos no meio NBRI-P, quando comparado ao meio PVK. Os isolados com maiores IS foram YS54 e LS80 com IS de 2,1 em meio NBRI-P. Já no meio PVK o isolado YS54 também apresentou o melhor IS (2,1) (Tabela 8). Muthukumarasamy et al. (2017) ao avaliar isolados de rizosférico e não rizosférico de cana-de-açúcar na Índia, também observaram solubilização de P elevada em meio sólido NBRI-P. Para Ordoñez et al. (2016) bactérias que apresentam capacidade de solubilizar fosfato têm grande potencial de melhorar a disponibilidade de P para a planta, tornando-se uma alternativa aos fertilizantes industriais atualmente utilizados.

Tabela 8. Índice de Solubilização (IS) de 24 bactérias isoladas de sorgo (*S. bicolor*, L. Moench) e estirpes padrão FP2 (*A. brasilense*), BR322 (*R. tropici*) e Pal5 (*G. diazotrophicus*).

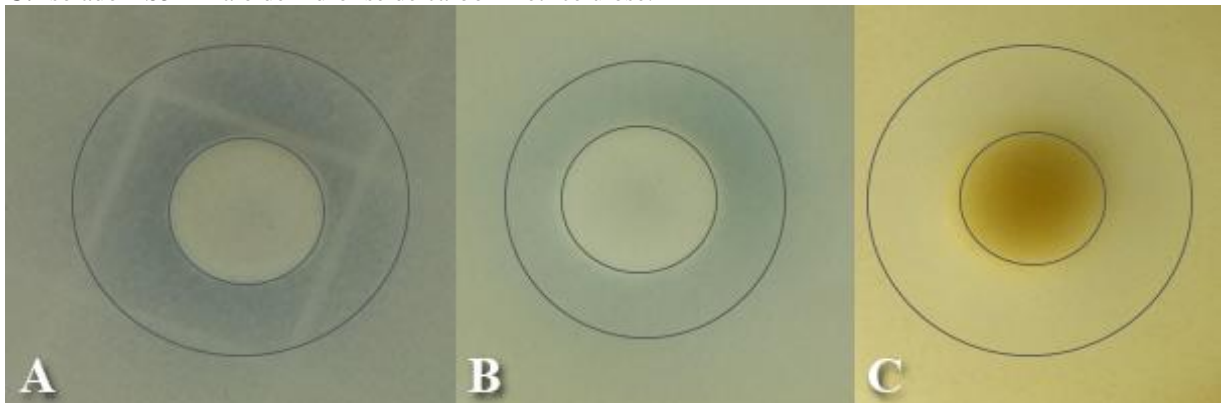
Bactéria	IS			
	NBRI-P	PVK	GL (Ca-P)	GL (Al-P)
NS14	1,8 ± 0,1	1,4 ± 0,1	-	-
NS15	1,8 ± 0,2	1,6 ± 0,2	-	-
NS23	-	-	-	-
NS24	1,7 ± 0,3	1,5 ± 0,2	-	-
NS32	1,4 ± 0,1	1,8 ± 0,2	-	-
NS37	1,3 ± 0,2	1,7 ± 0,2	-	-
NS48	1,6 ± 0,1	1,3 ± 0,1	-	-
NS77	1,7 ± 0,1	1,4 ± 0,2	-	-
LS2	1,8 ± 0,2	1,4 ± 0,1	-	-
LS6	2,0 ± 0,2	1,8 ± 0,2	-	-
LS23	2,0 ± 0,1	1,4 ± 0,1	-	-
LS28	2,0 ± 0,1	1,4 ± 0,1	-	-
LS29	2,0 ± 0,2	1,5 ± 0,1	-	-
LS62	1,8 ± 0,3	1,6 ± 0,2	-	-
LS80	2,1 ± 0,3	1,7 ± 0,1	-	-
LS82	1,9 ± 0,1	1,6 ± 0,1	-	-
YS10	1,6 ± 0,1	1,3 ± 0,1	-	-
YS25	1,9 ± 0,1	1,6 ± 0,1	-	-
YS26	1,8 ± 0,2	1,6 ± 0,2	-	-
YS27	1,7 ± 0,1	1,4 ± 0,2	-	-
YS54	2,1 ± 0,1	2,1 ± 0,3	1,9 ± 0,3	-
YS59	1,7 ± 0,2	1,8 ± 0,2	2,2 ± 0,2	-
YS63	1,8 ± 0,2	1,5 ± 0,1	-	-
YS66	1,9 ± 0,1	1,5 ± 0,2	-	-
FP2	-	-	-	-
Pal5	1,6 ± 0,1	1,4 ± 0,2	2,3 ± 0,2	-
BR322	1,3 ± 0,1	1,7 ± 0,1	-	-
Media	1,8	1,5	2,1	-

- IE ≤ 0,99

Nenhum dos isolados testados apresentou capacidade de solubilizar fosfato de alumínio (Al-P) (Tabela 8). No meio GL modificado para detecção da solubilização de fosfato de cálcio apenas os isolados YS54 (IS de 1,89) e YS59 (IS de 2,17) apresentaram halos de solubilização (figura 5). Entre as estirpes padrão utilizadas apenas a bactéria FP2 (*A. brasilense*) não

apresentou atividade positiva para solubilização de fosfato. Já a estirpe padrão Pal5 (*G. diazotrophicus*) apresentou bons índices de solubilização de fosfatos, principalmente em meio GL-CaP com IS superior a 2. Diferentemente, Hara; Oliveira (2005) identificaram que entre os 30 isolados bacterianos (rizóbios) de plantas avaliados, 60% apresentaram capacidade de solubilizar o fosfato de alumínio e cálcio, com valores de IS variando entre 1,0 e 1,6.

Figura 5. Halos de degradação enzimática para protease, lipase e celulase produzidas pelas bactérias isoladas de sorgo. **A:** Isolado NS77 - halo de hidrólise de proteínas do leite; **B:** Isolado LS6 - halo de degradação de Tween; **C:** Isolado YS54 - halo de hidrólise de carboximetilcelulose.



Fonte: A autora.

Qureshi et al. (2012) utiliza o termo “*eco friendly*” em referência a microrganismos solubilizadores de fosfato. Os autores destacam as vantagens econômicas e ambientais resultantes da utilização de bactérias solubilizantes de fosfato (PSB) em detrimento de caras fontes inorgânicas de fertilizantes P, de alto custo e que são largamente utilizados pelo setor agrícola.

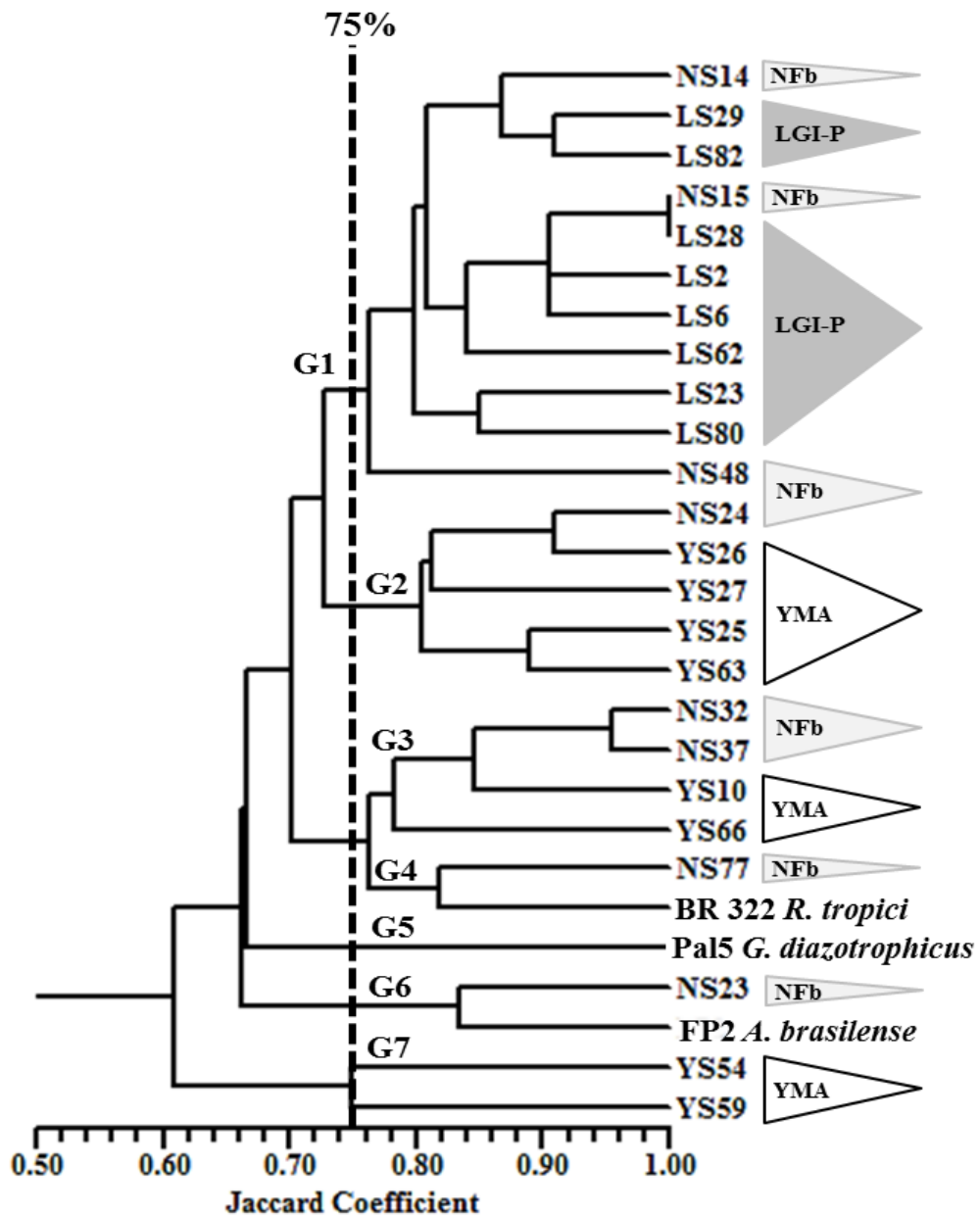
O percentual de isolados com IE e IS superiores a 1,5 observados permitiu constatar que as bactérias estudadas foram mais eficientes para solubilizar fosfato do que para produção de enzimas extracelulares. Assim, os resultados sugerem que os isolados testados têm potencial para uso no setor biotecnológico podendo ser empregados como biofertilizantes.

5.2 Análise de similaridade para características morfológicas e bioquímicas

Para análise conjunta dos dados fenotípicos foi construída uma matriz de similaridade e obtido um dendrograma (Figura 6) onde foi possível identificar a formação de sete grupos com similaridade $\geq 75\%$. Os grupos com maior quantidade de isolados agrupados foram G1, G2 e G3 com 11, cinco e quatro isolados, respectivamente. No grupo G1 houve similaridade de 100% entre os isolados NS15 e LS28. (Figura 6).

A partir do dendrograma é possível observar uma tendência do agrupamento de isolados de sorgo em função do meio de isolamento, fato evidenciado em G1 formado pelo agrupamento de 11 bactérias, das quais oito foram isoladas em meio LGI-P (Figura 6). Essa característica também é verificada no grupo G2, onde quatro das cinco bactérias componentes do grupo foram isoladas em meio YMA (Figura 6).

Figura 6. Dendrograma gerado no software NTSYSpc (versão 2.02i) definido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando o coeficiente de Jaccard com base na comparação entre os testes morfofisiológicos e bioquímicos realizados para 24 bactérias isoladas de sorgo (*S. bicolor*, L. Moench) e estirpes padrão FP2 (*A. brasilense*), BR322 (*R. tropici*) e Pal5 (*G. diazotrophicus*). Testes inseridos na análise: morfológico (coloração de Gram); bioquímicos (antibiograma, teste de crescimento em fonte de carbono e teste de citrato); enzimáticos (catalase, urease, redução de nitrato, avaliação qualitativa da enzima nitrogenase, produção de enzimas extracelulares e solubilização de fosfato).



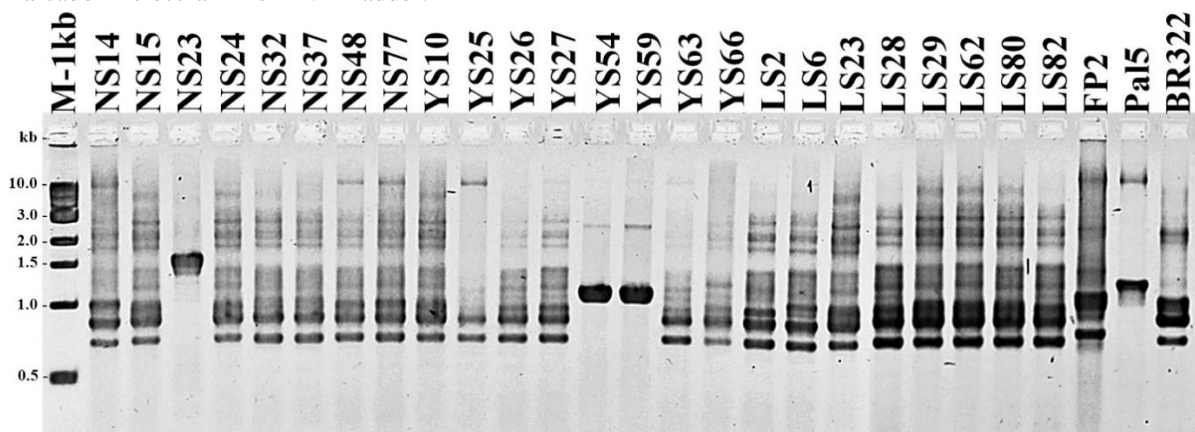
Foi observada a formação de grupos com apenas dois componentes em G4, G6 e G7. O grupo G4 foi composto pelo isolado NS77 e estirpe padrão BR322, com aproximadamente 82% de similaridade. Em G6 o isolado NS23 agrupou com a estirpe padrão FP2 com índice de similaridade próximo a 84%. Já em G7 foi observada o agrupamento dos isolados YS54 e Ys59, ambos obtidos em meio YMA. A baixa ocorrência de agrupamentos com 100% de similaridade evidencia uma variabilidade fenotípica entre as bactérias testadas isoladas de sorgo. A partir deste dado é possível inferir que os isolados de sorgo apresentam uma variabilidade fenotípica que pode representar uma comunidade de bactérias endofíticas com capacidade de tolerar as variações do ambiente de Cerrado e serem competitivas no estabelecimento dentro da planta.

5.3 Caracterização genética

Na avaliação de aspectos genotípicos por meio da amplificação em PCR da região espaçadora intergênica 16S-23S rRNA foi possível verificar que entre 0,7 e 3 kpb (kilo pares de bases) houve a formação de até 12 produtos de para os 24 isolados avaliados, com variação na ocorrência de 1 a 9 fragmentos por isolado (Figura 7). Esses resultados diferem dos observados por Oliveira (2016) que obteve 1 a 3 fragmentos de produtos de PCR da região IRS 16-23S distribuídas entre 0,7 e 1,5 kpb, obtidas de bactérias isoladas de raízes de arroz. A maior variação no tamanho e quantidade dos fragmentos observadas para os isolados de sorgo inferem que esses possuem um maior grau de polimorfismo em comparação a isolado de arroz.

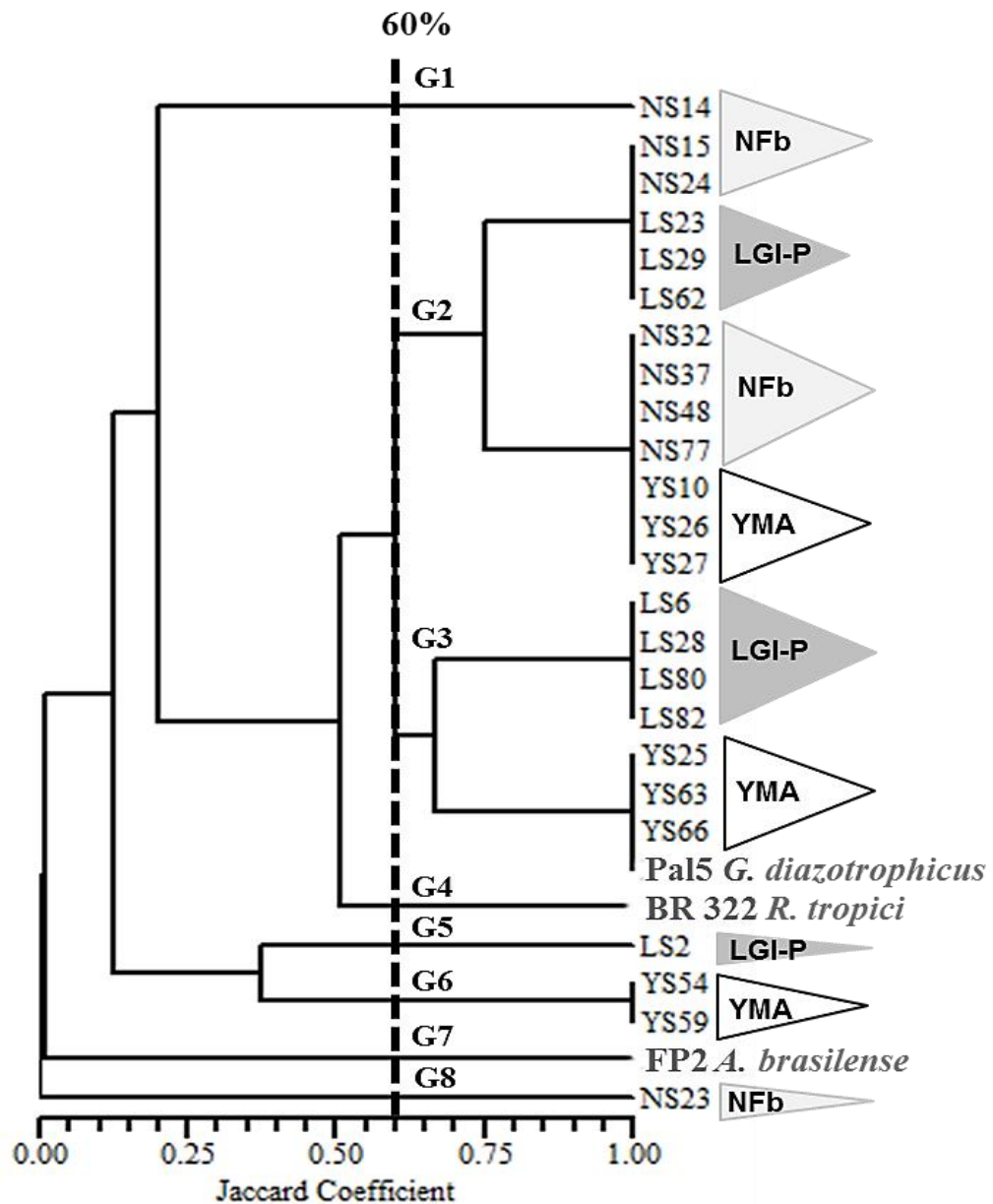
Foi possível observar que a estirpe padrão FP2 apresentou a formação de dois fragmentos localizado entre 1,0 e 0,8 kpb (Figura 7). Essa característica está de acordo com o verificado por Reis Junior et al. (2006) para a espécie *A. brasilense*.

Figura 7. Perfil eletroforético da amplificação em PCR da região espaçadora intergênica (16S-23S rRNA) para 24 isolados de sorgo (*S. bicolor*, L. Moench) e estirpes padrão FP2, BR322 e Pal5 em gel de agarose (1,2%) com marcador molecular 1 kb-DNA-Ladder.



Os produtos da PCR da região intergênica 16S-23S rRNA verificados para os isolados de sorgo aqui estudados, se apresentaram de maneira diversa, assim como constatado por Reis Junior et al. (2006) para amplificação da região intergênica 16S-23S rRNA de *A. amazonense* isolados de gramíneas. Uma vez que, a região intergênica 16S-23S rRNA varia significativamente no comprimento e na sequência de nucleotídeos entre espécies bacterianas, a utilização da análise da região intergênica 16S-23S rRNA se torna uma ferramenta poderosa na pesquisa de várias investigações bacterianas (DINGMAN, 2012).

Figura 8. Dendrograma gerado no software NTSYSpc (versão 2.02i) definido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando o coeficiente de Jaccard com base nos fragmentos amplificados da região intergênica 16S-23S rRNA por PCR de realizado para 24 bactérias isoladas de sorgo (*S. bicolor*, L. Moench) e estirpes padrão FP2 (*A. brasilense*), BR322 (*R. tropici*) e Pal5 (*G. diazotrophicus*).



A partir dos fragmentos obtidos foi elaborada uma matriz de dados e gerado um dendrograma de similaridade, onde houve a formação de oito grupos com similaridade $\geq 60\%$ entre as bactérias avaliadas (Figura 8). De acordo com o aspecto genotípico avaliado G2 foi o grupo mais numeroso com 12 componentes distribuídos em dois subgrupos com cinco e sete isolados, apresentando 100% de similaridade entre si.

O segundo maior grupo é o G3, composto por dois subgrupos com agrupamentos de quatro isolados similares em 100% e três isolados com similaridade de 100% com a estirpe padrão Pal5 (Figura 8). Os grupos G1, G4, G5, G7 e G8 apresentaram apenas um componente e o G6 foi composto por dois isolados, YS54 e YS59, com similaridade de 100% (Figura 8).

A amplificação de genes entre a sequência do rRNAs 16S-23S pode proporcionar uma discriminação à nível intra-específico (LAGUERRE, et al., 1996). Isso porque, além do comprimento e / ou a sequência da região intergênica do rRNA 16S-23S varia dentro de uma espécie, representando diferentes tipos de *operons*, os segmentos da sequência de DNA variável localizam-se entre os genes de rRNA altamente conservados (DINGMAN, 2012).

A formação de grupos que agregam mais de um isolado (G2, G3 e G6) e grupos com isolados de similaridade abaixo de 60% (G1, G4, G5, G7 e G8) sugere variabilidade genotípica entre os 24 isolados de sorgo estudados. É possível observar que assim como na análise de similaridade para aspectos fenotípicos a mesma avaliação feita para características genotípica também apresentou uma tendência de agrupamento entre as bactérias isoladas em um mesmo meio semisseletivo, evidenciado em G3 cujos subgrupos foram compostos por isolados obtidos em meio LGI-P e YMA (Figura 8).

De acordo com Messias et al. (2011), é importante priorizar isolamento e seleção de novas cepas microbianas selvagens, tendo em vista a biodiversidade de microrganismos existentes nos diferentes habitats e ambientes. Neste trabalho foi possível observar que há diversidade fenotípica e genética entre os isolados de raiz de plantas de sorgo. Verificando a existências isolados promissores para estudos mais aprofundados direcionados à aplicação biotecnológica e elaboração de bioprodutos com características diversas.

6. CONCLUSÃO

- Foram selecionadas de 24 bactérias endofíticas isoladas de sorgo, sendo 8 utilizando o meio semisseletivo NFb, oito isolados em meio LGI-P; e oito em meio YMA, que foram utilizados em todos os testes.
- As avaliações de aspectos morfológicos e bioquímicos permitiram verificar que os isolados obtidos a partir de raízes de sorgo apresentaram variabilidade morfológica e ampla flexibilidade metabólica. Os isolados apresentaram ainda diversidade na atividade de enzimas com destaque para lipase e celulase, e eficiência na capacidade para solubilizar o fosfato.
- Os produtos da PCR da região espaçadora intergênica 16S-23S rRNA permitiram a observação do polimorfismo genético entre os 24 isolados de sorgo avaliados indicando que a maioria possui mais de um operon para os genes ribossomais.
- Foram detectados isolados de sorgo que poderão ser utilizados para o uso relacionado a exploração de enzimas extracelulares hidrolíticas como os isolados NS15 e LS2 para lipase e os isolados NS14 e YS54 para celulase, com destaque para o isolado NS24 que apresentou índice enzimático alto para ambas as enzimas.
- Nos testes de solubilização de fosfato dos 24 isolados de sorgo os que foram considerados promissores foram: LS6, LS80 e YS54, que deverão ser testados in vitro para observar a eficiência na promoção do crescimento vegetal.
- Os isolados de sorgo NS24, NS32, NS37 e YS54 foram considerados os mais promissores como promotores de crescimento vegetal, indicando seu potencial para aplicação biotecnológica na área agrícola.

7. REFERÊNCIAS

ABD-ELHALEM, B. T.; EL-SAWY, M.; GAMAL, R. F.; ABOU-TALEB, K. A. Production of amylases from *Bacillus amyloliquefaciens* under submerged fermentation using some agro-industrial by-products. **Annals of Agricultural Science**, v. 60, n. 2, p. 193–202, 2015.

ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. **Biomolecules**, v.4, p. 117–139, 2014.

AKOH, C. C.; CHANG, S.; LEE, G.; SHAW, J. Enzymatic approach to biodiesel production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 22, p. 8995-9005, 2007.

ALI, I.; AKBAR, A.; YANWISSETPAKDEE, B.; PRASONGSUK, S.; LOTRAKUL, P.; PUNNAPAYAK, H. Purification, characterization, and potential of saline waste water remediation of a polyextremophilic α -amylase from an obligate halophilic *Aspergillus gracilis*. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

AMID, M.; MANAP, M. Y. A. Purification and characterization of a novel amylase enzyme from red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) peel. **Food Chemistry**, v. 165, p. 412–418, 2014.

ANVISA. **Interpretação de dados microbiológicos - III. Métodos para o TSA-Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos**, 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo2/metodos3.htm>. Acesso em: 30, ago. 2016.

ARAÚJO-NETO, R. A.; ARAÚJO FILHO, J. T.; SILVA, F. J.; ROCHA, A. E. Q.; FARIAS, J. J. A. Desenvolvimento do sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) forrageiro submetido a diferentes tipos e doses de adubação orgânica. **Ciência Agrícola**, v. 12, n. 1, p. 31-40, 2014.

BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; VIDEIRA, S. S.; BODDEY, L. H.; BALDANI, V. L. D. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. **Plant and Soil**, v. 384, n. 1-2, p. 413-431, 2014.

BALDO C.; BAGGIO, L. M.; MORENO, T. G.; MAGRI, A.; MELO, M. R.; GASPARIN, F. G. M.; CELLIGOI, M. A. P. C. Estudo da produção de lipase por bactérias isoladas de efluente de abatedouro avícola. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 3, p. 347-350, 2013.

BANDARA, W. M. M. S.; SENEVIRATNE, G.; KULASOORIYA, S. A. Interactions among endophytic bacteria and fungi: effects and potentials. **Journal Biosciences**, Bangalore, v. 31, n. 5, p. 645-650, 2006.

BAPTISTA, M. G. F. M. **Mecanismos de Resistência aos Antibióticos**. 2013. 51 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa, 2013.

BARRETTI, P. B.; SOUZA, R. M.; POZZA, E. A. Bactérias endofíticas como agentes promotores do crescimento de plantas de tomateiro e de inibição *in vitro* de *Ralstonia solanacearum*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 3, p. 731-739, 2008.

BARRY, T.; COLLERAN, G.; GLENNON, M.; DUNICAN, L. K.; GANNON, F. The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. **Genome Research**, v. 1, n. 1, p. 51-56, 1991.

BBC Research. **Global Markets for Enzymes in Industrial Applications**. Disponível em: <<http://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/enzymes-industrial-applications-report-bio030j.html>>. Acesso em: 28, fev. 2017.

BERGAMASCHI, C.; ROESCH, L. F. W.; QUADROS, P. D.; CAMARGO, F. A. O. Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas a cultivares de sorgo forrageiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.3, p.727-733, 2007.

BERGE, O.; LODHI, A.; BRANDELET, G.; SANTAELLA, C.; RONCATO, M. A.; CHRISTEN, R.; HEULIN, T.; ACHOUAK, W. *Rhizobium alamii* sp. nov., an exopolysaccharide-producing species isolated from legume and non-legume rhizospheres. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.59, p.367-372, 2009.

BITTENCOURT, C. I. L. **Diversidade molecular e fisiológica de *chromobacterium* sp. e outras bactérias isoladas de diferentes ecossistemas tropicais**. 2005. 85 f. Dissertação. (Mestrado em Genética) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

BODDEY, R.M.; URQUAIA, S.; REIS, V.; DOBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. **Plant and Soil**, v.137, p.111-117, 1991.

BOŽIĆ, N.; RUIZ, J.; LÓPEZ-SANTÍN, J.; VUJČIĆ, Z. Production and properties of the highly efficient raw starch digesting α -amylase from a *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a. **Biochemical Engineering Journal**, v.53, n. 2, p. 203–209, 2011.

BRADER, G.; COMPANT, S.; MITTER, B.; TROGNITZ, F.; SESSITSCH, A. Metabolic potential of endophytic bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 30-37, 2014.

BRAGA, L. F. **Caracterização morfofisiológica e genética de bactérias endofíticas isoladas de arroz (*Oryza sativa*)** 2012. 94 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Universidade Estadual de Goiás, Anápolis. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Classificação de risco dos agentes biológicos**. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento do Complexo Industrial e Inovação em Saúde, 2. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010.

BROWN, T. R.; BROWN, R. C. A review of cellulosic biofuel commercial-scale projects in the United States. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 7, p.235–245, 2013.

CAPPUCCINO, J. G.; SHERMAN, N. **Microbiology: a laboratory manual**. 10 th ed., Boston, MA: Pearson/Benjamin Cummings, 2014. 567p.

CARVALHO, G. **Estudo da resposta antioxidativa de linhagens bacterianas na presença do herbicida Acetochlor**. 2007. 68f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

CARVALHO, R. M. M.; SILVA, M. R.; CARVALHO, F. C. T.; REBOUÇAS, R. H.; SOUSA, O. D. S. V. Bactérias solubilizadoras de fosfato em solo rizosférico da caatinga. **Revista Geonorte**, v. 7, n. 26, p. 48-60, 2016.

CASSINI, S.T. **Ciclo do nitrogênio**. Disponível em: <http://www.inf.ufes.br/~neyval/Gestao_ambiental/Tecnologias_Ambientais2005/Ecologia/CicloNPS.doc>. Acesso em: 08, nov. 2015.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JÚNIOR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CASTRO, R. A. **Estudo da comunidade bacteriana endofítica cultivável associada aos manguezais de Cananéia e Bertioga – SP**. 2011, 91 f. Dissertação (Mestrado em Genética e melhoramento de plantas) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N. Caracterização fenotípica de rizóbio nativos isolados de solos da Amazônia e eficiência simbiótica em feijão caupi. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, n. 1, p. 161-169, 2010.

CHELIUS, M.K.; TRIPLETT, E.W. The Diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. **Microbial Ecology**, v. 41, p. 252–263, 2001.

CHRISTENSEN, W. B. Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. **Journal of Bacteriology**, v. 52, n. 4, p. 461, 1946.

COELHO, A. M. Fertilidade do solo, exigências nutricionais e adubação do sorgo sacarino. **Agroenergia em Revista**, Embrapa Agroenergia, v. 2, n. 3, p. 18-19, 2011.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Monitoramento agrícola – Safra 2016/17 - Segundo levantamento SAFRA 2016/17**, V. 4, N. 2, p. 1-156, Brasília, dez, 2016.

COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLÉMENT, C.; BARKA, E. A. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 4951-4959, 2005.

CRISPINO, C. C.; FRANCHINI, J. C.; MORAES, J. Z.; SIBALDELLE, R. N. R.; LOUREIRO, M. F.; SANTOS, E. N.; CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. **Adubação nitrogenada na cultura da soja**. Comunicado Técnico 75, Londrina: EMBRAPA, 2001. 6 p.

CRUZ, L.M.; SOUZA, E.M.; WEBER, O.B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. 16 S Ribossomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa spp.*) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill.), **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n.5, p.2375-2379, 2001.

DEB, P.; TALUKDAR, S. A.; MOHSINA, K.; SARKER, P. K.; SAYEM, S. M. A. Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P-001. **SpringerPlus**, v. 2, p. 154, 2013.

DIAS, M. **Diversidade e produção de celulases por bactérias epifíticas de frutos típicos do Cerrado mineiro**. 2012. 110 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

DINESH, R.; ANANDARAJ, M.; KUMAR, A.; BINI, Y. K.; SUBILA, K. P., ARAVIND, R. Isolation, characterization, and evaluation of multi-trait plant growth promoting rhizobacteria for their growth promoting and disease suppressing effects on ginger. **Microbiological Research**, v. 173, p. 34-43, 2015.

DINGMAN, D. W. *Paenibacillus larvae* 16S–23S rDNA intergenic transcribed spacer (ITS) regions: DNA fingerprinting and characterization. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, n. 3, p. 352-358, 2012.

DÖBEREINER, J.; ANDRADE, V. de O.; BALDANI, V.L.D. Protocolos para preparo de meios de cultura da Embrapa Agrobiologia. Embrapa-CNPAB. Documentos, 110, Seropédica: **Embrapa Agrobiologia**, p.38, 1999.

DÖBEREINER, J., BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília: EMBRAPA – SPI, Itaguaí, RJ: EMBRAPA-CNPAB, 1995, 60 p.

DURLI, E. **Tratamento de efluente de indústria de laticínios utilizando lipases de *Burkholderia cepacia* LTEB11**. 2007. 111 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

ENSHASY, H. A. E. Bioprocess Development for the Production of CC-amylase by *Bacillus amyloliquefadens* in Batch and Fed-Batch Cultures. **Research Journal of Microbiology**, v. 2, n. 7, p. 560-568, 2007.

ERMAWAR, R. A.; COLLINS, H. M.; BYRT, C. S.; BETTS, N. S.; HENDERSON, M.; SHIRLEY, N. J.; SCHWERDT, J.; LAHNSTEIN, J.; FINCHER, G. B.; BURTON, R. A. Distribution, structure and biosynthetic gene families of (1,3;1,4) -b-glucan in *Sorghum bicolor*. **Journal of Integrative Plant Biology**. v. 57 p. 429-445, 2015.

ESKIN, N.; VESSEY, K.; TIAN, L. Research progress and perspectives of nitrogen fixing bacterium, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, in monocot plants. **International Journal of Agronomy**, v. 2014, 2014.

FAWZYA, Y. N.; PUTRI, S.; NORIKO, N.; PATANTIS, G. Identification of sgs 1609 cellulolytic bacteria isolated from *Sargassum spec.* and characterization of the cellulase produced. **Squalen Bulletin of Marine & Fisheries Postharvest & Biotechnology**, v.8, n. 2, p. 57-68, 2013.

FERNANDES JÚNIOR, P. I.; LIMA, A. A. D.; PASSOS, S. R.; GAVA, C. A. T.; OLIVEIRA, P. J. D.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R. Phenotypic diversity and amyolytic activity of fast growing rhizobia from pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1604-1612, 2012.

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M. HUNGRIA, M. H. Caracterização genética de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros eficientes em culturas do guandu e caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 8, p. 911-920, 2003.

FERREIRA, E. D. B.; KNUPP, A. M.; MARTIN-DIDONET, C. C. G. Crescimento de cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) influenciado pela inoculação com bactérias promotoras de crescimento de plantas. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 3, 2014.

FIALHO, E. T.; LIMA, J. A. F.; OLIVEIRA, V.; SILVA, H. O. Substituição do milho pelo sorgo sem tanino em rações de leitões: digestibilidade dos nutrientes e desempenho animal. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 1, p. 105-111, 2002.

GAIERO, J. R.; MCCALL, C. A.; THOMPSON, K. A.; DAY, N. J.; BEST, A. S.; DUNFIELD, K. E. Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion. **American Journal of Botany**, v. 100, n. 9, p. 1738-1750, 2013.

GALLOWAY, J. N.; ABER, J. D.; ERISMAN, J. W.; SEITZINGER, S. P.; HOWARTH, R. W.; COWLING, E. B.; COSBY, B. J. The nitrogen cascade. **BioScience**, vol. 53, no. 4, pp. 341–356, 2003.

GARCIA, T. V. **Bactérias endofíticas associadas a duas variedades de *Oryza sativa* L. cultivadas na Estação Experimental do Arroz-IRGA, RS.** 2014.57f. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo, 2014.

GARCÍA-MARTÍNEZ, J.; ACINAS, S. G.; ANTÓN, A. I.; RODRÍGUEZ-VALERA, F. Use of the 16S–23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 36, p. 55-64, 1999.

GARRITY, G. M.; HOLT, J. G. The road map to the manual. In: GARRITY, G. BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W. (Eds.). **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. 9. ed. New York: The Williams & Wilkins, Springer, 2001. 119 p.

GAYATHRI, S.; SARAVANAN, D.; RADHAKRISHNAN, M.; BALAGURUNATHAN, R.; KATHIRESAN, K. Bioprospecting potential of fast growing endophytic bacteria from leaves

of mangrove and salt-marsh plant species. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 9, p 397-402, 2010.

GEDDES, B. A.; RYU, M. H.; MUS, F.; COSTAS, A. G.; PETERS, J. W.; VOIGT, C. A.; POOLE, P. Use of plant colonizing bacteria as chassis for transfer of N₂-fixation to cereals. **Current opinion in biotechnology**, v. 32, p. 216-222, 2015.

GIANFREDA, L.; RAO, M. A. Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 4, p. 339-354, 2004.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, 2012.

GOPALAN, N.; NAMPOOTHIRI K.M. Biotechnological production of enzymes using agro-industrial wastes: economic considerations, commercialization potential, and future prospects. In: DHILLON, G.S.; KAUR, S. (Eds.). **Enzymes - Agro-industrial wastes as feedstock for enzyme production: apply and exploit the emerging and valuable use options of waste biomass**. 1 ed. Canada: Elsevier, 2016. 350 p.

GOSWAMI, D.; BASU, J. K.; DE, S. Lipase applications in oil hydrolysis with a case study on castor oil: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 33, n. 1, p. 81–96, 2013.

GOVINDASAMY, V.; FRANCO, C. M. M; GUPTA, V. V. S. R. Endophytic actinobacteria: diversity and ecology. In: VERMA, V. C.; GANGE, A. C. (Eds.). **Advances in Endophytic Research**. Springer India, 2014. 460 p.

GOYAL, V.; MITTAL, A.; BHUWAL, A. K.; SINGH, G.; YADAV, A.; AGGARWAL, N. K. Parametric optimization of cultural conditions for carboxymethyl cellulase production using pretreated rice straw by *Bacillus* sp. 313SI under stationary and shaking conditions. **Biotechnology Research International**, v. 2014, p. 1-7, 2014.

GRIEBELER, N. E.; BORTOLI, V.; ASTOLFI, A. L.; DARONCH, N. A.; SCHUMANN, A. C.; SALAZAR, L. N.; CANSIAN, R. L.; BACKES, G. T.; ZENI, J. Seleção de fungos filamentosos produtores de amilases, proteases, celulasas e pectinases. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, n.13, p.15-24, 2015.

GUPTA, A.; VERMA, J. P. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 550–567, 2015.

- GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64 p. 763–781, 2004.
- GURUNG, N.; RAY, S.; BOSE, S.; RAI, V. A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.
- GURTLER, V.; STANISICH, V. A. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. **Microbiology**, v.142, p. 3-16, 1996.
- HALL, P.G.; KRIEG N. R. Application of the indirect immunoperoxidase stain technique to the flagella of *Azospirillum brasiliense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.47, n.2, p.433-435, 1984.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia**, v.67, n.3, p.597-607, 1975.
- HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, A. L. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 7, p. 667-672, 2005.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 39, p. 235-251, 2006.
- HAWKEY, P. M. The origins and molecular basis of antibiotic resistance, **British Medical Journal**, v. 317, n. 7159, p.657–660, 1998.
- HERBERT, D.; PINSENT, J. Crystalline bacterial catalase. **Biochemical Journal**, v. 43, n. 2, p. 193, 1948.
- HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, A.; RIVES-RODRÍGUEZ, N.; ACEBO-GUERRERO, Y.; DÍAZ-DE LA OSA, A.; HEYDRICH-PÉREZ, M.; BALDANI, V. L. D. Potencialidades de las bacterias diazotróficas asociativas en la promoción del crecimiento vegetal y el control de *Pyricularia oryzae* (Sacc.) en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). **Revista Protección Vegetal**, v. 29, n. 1, p.1-10, 2014.

HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. 1 ed. Brasília: Editora Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão. EMBRAPA, 1994. 519p.

HUNGRIA, M.; SILVA, K. **Manual de curadores de germoplasma-microorganismos: rizóbios e bactérias promotoras do crescimento vegetal**. Documentos 332-333. Distrito Federal: Embrapa, 2011. 21 p.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; CAMPO, R. J.; GALERANI, P. R. **Adubação nitrogenada na soja?** Comunicado Técnico 57, Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1997. 4 p.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R.; PERES, J. R. R. Fixação biológica do nitrogênio na soja. In: ARAÚJO, R. S.; HUNGRIA, M. **Microorganismos de Importância Agrícola**, 1. ed. Brasília, Editora Embrapa-SPI, 1994. 1-236 p.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola: Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil, **Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, Rio de Janeiro, v.29, n.10, p.1-83, 2016.

IKEDA, A. C. **Caracterização morfofisiológica e genética de bactérias endofíticas isoladas de raízes de diferentes genótipos de milho (*Zea mays L.*)**. 2010. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

IKEDA, A. C.; BASSANI, L. L.; ADAMOSKI, D.; STRINGARI, D.; CORDEIRO, V. K.; GLIENKE, C.; STEFFENS, M. B. R.; HUNGRIA, M.; GALLI-TERASAWA, L. V. Morphological and genetic characterization of endophytic bacteria isolated from roots of different maize genotypes. **Microbial Ecology**, v. 65, n. 1, p. 154-160, 2013.

IRWIN, D.; SHIN, D. H.; ZHANG, S.; BARR, B. K.; SAKON, J.; KARPLUS, P. A.; WILSON, D. B. Roles of the catalytic domain and two cellulose binding domains of *Thermomonospora fusca* E4 in cellulose hydrolysis. **Journal of Bacteriology**, v.180, p. 1709–1714, 1998.

JONES, B.; QUAX, W. Alzheimer tau test and detergent cellulose made by genetic engineering (No. 9 in a series of articles to promote a better understanding of the use of genetic engineering). **Journal of Biotechnology**, v. 66, p. 229–233, 1998.

JUTURU, V.; WU, J. C.; Microbial cellulases: engineering, production and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 33, p. 188–203, 2014.

KARN, S. K.; KUMAR, A. Hydrolytic enzyme protease in sludge: recovery and its application, **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.20, p.652-661, 2015.

KAUR, G.; REDDY, M. S. Effects of phosphate-solubilizing bacteria, rock phosphate and chemical fertilizers on maize-wheat cropping cycle and economics. **Pedosphere**, v. 25, n. 3, p. 428-437, 2015.

KHALIFA, A. Y.; ALSYEEH, A. M.; ALMALKI, M. A.; SALEH, F. A. Characterization of the plant growth promoting bacterium, *Enterobacter cloacae* MSR1, isolated from roots of non-nodulating *Medicago sativa*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 1, p. 79-86, 2016.

KHAN, A. A.; JILANI, G.; AKHTAR, M. S.; NAQVI, S. M. S.; RASHEED, M. Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. **Journal of Agricultural and Biological Science**, v. 1, n. 1, p. 48–58, 2009.

KHOO, M. L.; IBRAHIM, C. O. Lipase from thermoalkalophilic *Pseudomonas* species as an additive in potential laundry detergent formulations. **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 5, n.1, p. 1-5, 2009.

KIM, I. L. P.; CHUNG, K.C. Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. **FEMS Microbiology Letters**, v. 234, n. 1, p. 177-183, 2004.

KOZUSNY-ANDREANI, D. I.; ANDREANI JUNIOR, R. Colonização rizosférica e promoção do crescimento por rizóbios em mudas de alface. **Nucleus**, v.11, n.2, p. 443-452, 2014.

KRISHNAN, N.; GANDHI, K.; PEERAN, M. F.; KUPPUSAMI, P.; THIRUVENGADAM, R. Molecular characterization and in vitro evaluation of endophytic bacteria against major pathogens of rice. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 11, p. 800-813, 2015.

KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; SINGH, A. Microbial cellulases and their industrial applications. **Enzyme Research**, v. 2011, 2011.

KUMAR, A.; KUMAR, A.; DEVI, S.; PATIL, S.; PAYAL, C.; NEGI, S. Isolation, screening and characterization of bacteria from rhizospheric soils for different plant growth promotion (PGP) activities: an in vitro study. **Recent Research in Science and Technology**, v. 4, n. 1, 2012.

LAGUERRE, G.; ALLARD, M. R.; REVOY, F.; AMARGER, N. Rapid identification of rhizobia by restriction fragments length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.58-63, 1994.

LARA CABEZAS, W. A. R.; TRIVELIN, P. C. O.; KORNODÔRF, G. H.; PEREIRA, S. Balanço da adubação nitrogenada sólida e fluida de cobertura na cultura do milho em sistema plantio direto no Triângulo Mineiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 14, p. 363-376, 2000.

LEITE, J. **Caracterização de bactérias nativas de solos do semiárido brasileiro isoladas de nódulos de feijão-caupi**. 2011. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ, Rio de Janeiro, 2011.

LEVY, S. B. Antibiotic resistance: an ecological imbalance. **Antibiotic resistance: origins, evolution, selection and spread**, v. 207, p. 1-14, 1997.

LI, S.; YANG, X.; YANG, S.; ZHU, M.; WANG, X. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v.2, p. 1-11, 2012.

LIU, F. P.; LIU, H. Q.; ZHOU, H. L.; DONG, Z. G.; BAI, X. H.; BAI, P.; QIAO, J. J. Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from betel nut (*Areca catechu*) and their effects on plant growth and phosphorus mobilization in tropical soils. **Biology and Fertility of Soils**, v. 50, n. 6, p. 927-937, 2014.

LIU, L. H.; LUDEWIG, U.; FROMMER, W. B.; VON WIRÉN, N. AtDUR3 Encodes a New type of high-affinity urea/h symporter in arabidopsis. **The Plant Cell**, Vol. 15, 790–800, March 2003.

LLEDIAS, F.; RANGEL, P.; HANSBERG, W. Oxidation of catalase by singlet oxygen. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 273, n. 17, p. 10630-10637, 1998.

LOPES, E. C. P.; MORAES, A.; LANG, C. R. Estudo do fracionamento isotópico de nitrogênio aplicado a gramíneas e leguminosas forrageiras. **Brazilian Journal of Applied Technology for Agricultural Science**, v. 9, n. 1, 2016.

LÓPEZ-MONDÉJAR, R.; ZÜHLKE, D.; BECHER, D.; RIEDEL, K.; BALDRIAN, P. Cellulose and hemicellulose decomposition by forest soil bacteria proceeds by the action of structurally variable enzymatic systems. **Scientific Reports**, v.6, p.1-12, 2016.

MACFADDIN, J.F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. 2a ed. Willians & Wilkins, Baltimore, 1980. 527p.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Brock biology of microorganisms**. 13th ed. New Jersey: Prentice Hall, 2012. 1155 p.

MAGNÚSSON, S. H.; GUNNLAUGSDÓTTIR, H.; LOVEREN, H. V.; HOLM, F.; KALOGERAS, N.; LEINO, O.; LUTEIJN, J. M.; ODEKERKEN, G.; POHJOLA, M. V.; TIJHUIS, M. J.; TUOMISTO, J. T.; UELAND, Ø.; WHITE, B. C.; VERHAGEN, H. State of the art in benefit-risk analysis: food microbiology. **Food and Chemical Toxicology**, v.50, p.33-39, 2012.

MAREQUE, C.; TAULÉ, C.; BERACOCHEA, M.; BATTISTONI, F. Isolation, characterization and plant growth promotion effects of putative bacterial endophytes associated with sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench). **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 1057-1067, 2015.

MARTINS, R. C. R. **Respostas de calos de cana-de-açúcar na interação com bactérias diazotróficas endofíticas**. 2013. 100 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

MASSOL-DEYA, A. A., ODELSON, D. A., HICKEY, R. F., & TIEDJE, J. M. Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). In: KOWALCHUK, G. A.; DE BRUIJN, F.; HEAD, I. M.; VAN DER ZIJPP, A. J.; VAN ELSAS, J. D. (EDS.) **Molecular Microbial Ecology Manual**. Springer Netherlands, 1995. 289-296 p.

MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; MELO BARBOSA, A. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, n. 2, p. 213-234, 2011.

MHAMDI, A., QUEVAL, G., CHAOUCH, S., VANDERAUWERA, S., VAN BREUSEGEM, F., & NOCTOR, G. Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. **Journal of Experimental Botany**, p.282, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Brasília. **Técnica de Coloração de Gram**. Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS, Brasília: Ministério da Saúde, 2001. 1- 67p.

MOBLEY, H.L; HAUSINGER, R.P. Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. **Microbiological Reviews**, v. 53, n.1, p.85-108, 1989.

MOLINA, L. R.; GONÇALVES, L. C.; RODRIGUEZ, N. M.; RODRIGUES, J. A. S.; FERREIRA, J. J.; FERREIRA, V. C. P., Avaliação agronômica de seis híbridos de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, p.385-390, 2000.

MOREIRA, F. M. M.; SIQUEIRA, J. O. Os organismos do solo. In: **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2. ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729p.

MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 2, p. 74, 2010.

MOREIRA, F. T. A.; SANTOS, D. R.; SILVA, G. H.; ALENCAR, L. S. Ocorrência de bactérias do gênero *Azospirillum* spp. associadas a gramíneas forrageiras no semiárido nordestino, **HOLOS**, v. 3, n. 29, 2013.

MORRELL-FALVEY, J. L.; ELKINS, J. G.; WANG, Z. W. Determination of the cellulase activity distribution in *Clostridium thermocellum* and *Caldicellulosiruptor obsidiansis* cultures using a fluorescent substrate. **Journal of Environmental Sciences**, v.34, p. 212-218, 2015.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; VADIVELU, M.; ARUN, K. Isolation of bacterial strains possessing nitrogen-fixation, phosphate and potassium-solubilization and their inoculation effects on sugarcane. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 55, p. 161-170. 2017.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 170, n. 1, p. 265-270, 1999.

NEIVERTH, W. **Diversidade morfológica e genética de rizobactérias endofíticas obtidas de solos de diferentes classes e manejos de cultivo**. 2012. 107 f. Dissertação (Mestrado em agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon, 2012.

NEYRA, C. A.; DÖBEREINER, J.; LALANDE, R.; KNOWLES, R. Denitrification by N₂-fixing *Spirillum lipoferum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 23, p. 300-305, 1977.

NOGUEIRA, J. M. R.; MIGUEL, L. F.S. Bacteriologia. In: MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**, Rio de Janeiro: EPSJV, v. 4, 2009. 496 p.

NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Oportunidades e ameaças à contribuição da fixação biológica de nitrogênio em leguminosas no Brasil. **Microorganisms for Future Agriculture**. Sevilla: Universidad de Sevilla, 2013. 433-436 p.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I. **Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal**. Documentos 161, Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2003. 40p.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS-JÚNIOR, A. F. Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 61-66, 2007.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; JÚNIOR, A. F. C. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 853-860, 2006.

OLIVEIRA, F. A. **Morfo-fisiologia de bactérias isoladas de solo da reserva ecológica da Universidade Estadual de Goiás - Anápolis**. 2015. 113 f. Dissertação (Mestrado Ciências Moleculares) - Universidade Estadual de Goiás, Anápolis. 2015.

OLIVEIRA, M. S. **Caracterização bioquímica de bactérias isoladas das raízes de arroz de sequeiro quanto a produção de biocompostos e promoção do crescimento vegetal**. 2016. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Moleculares) Universidade Estadual de Goiás, Anápolis. 2016.

OLIVEIRA, T. F.; FERREIRA, J. S.; BOA SORTE, P. M. F.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; SCHWAB, S. **Concentração Mínima Inibitória (CMI) de antibióticos para oito estirpes de bactérias diazotróficas da coleção de culturas da Embrapa Agrobiologia**, Boletim de pesquisa e desenvolvimento 49, Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2009. 16 p.

ORDOÑEZ, Y. M.; FERNANDEZ, B. R.; LARA, L. S.; RODRIGUEZ, A.; URIBE-VÉLEZ, D.; SANDERS, I. R. Bacteria with phosphate solubilizing capacity alter mycorrhizal fungal growth both inside and outside the root and in the presence of native microbial communities. **PloS One**, v. 11, n. 6, p. e0154438, 2016.

PEDROSA, F. O.; YATES, M. G. G. Regulation of nitrogen fixation (nif) genes of *Azospirillum brasilense* by nifA and ntrC (glnG) type genes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 55, p. 95-101, 1984.

PEREIRA FILHO, I. A.; RODRIGUES, J. A. S. **Sorgo: O produtor pergunta, a Embrapa responde**. Coleção 500 perguntas, 500 respostas. Brasília: Embrapa, 2015. 327p.

PÉREZ, Y. F.; DÍAZ DE LA OSA, A.; RESTREPO-FRANCO, G. M.; DIVÁN-BALDANIC, V. L.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZA, A. Diversidad de bacterias diazotróficas asociativas potencialmente eficientes en cultivos de importancia económica. **Revista Cubana de Ciências Biológicas**, v. 4, n. 1, p.17-26, 2015.

PIKOVSKAYA, R. I. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. **Mikrobiologiya**, v. 17, p. 362-370, 1948.

PURCINO, A. Á. C. Sorgo sacarino na Embrapa: histórico, importância e usos. **Revista Embrapa Agroenergia**, v. 2, n. 3, 2011.

QUAX, W. J. Bacterial Enzymes. In: ROSENBERG, E.; DELONG, E.F.; STACKEBRANDT, E.; LORY, S.; THOMPSON, F. (Eds.). **The Prokaryotes: applied bacteriology and biotechnology**, 4 ed. 2013, 393p.

QURESHI, M. A.; AHMAD, Z. A.; AKHTAR, N.; IQBAL, A.; MUJEEB, F.; SHAKIR, M. A. Role of phosphate solubilizing bacteria (PSB) in enhancing P availability and promoting cotton growth, **Journal of Animal and Plant Sciences**, v. 22, n. 1, p. 204-210, 2012.

RAJKUMAR, M.; AE, N.; PRASAD, M. N. V.; FREITAS, H. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 142-149, 2010.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

REIS JÚNIOR, F. B., TEIXEIRA, K. D. S., REIS, V. M. Análises de restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA) em estudos de diversidade intra-específica de *Azospirillum amazonense* isolado de diferentes espécies de brachiaria. **Documentos117, Planaltina: Embrapa Cerrados**, 2004. 41p.

REIS JUNIOR, F. B.; REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. S. Restrição do 16S-23S DNAr intergênico para avaliação da diversidade de *Azospirillum amazonense* isolado de *Brachiaria* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 3, p. 431-438, 2006.

REIS, A. R.; FURLANI-JUNIOR, E.; HAGA, K. I. Atividade da redutase do nitrato em folhas de cafeeiro em função da adubação nitrogenada da adubação nitrogenada **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 29, n. 2, p. 269-276, 2007.

ROBINSON, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications, **Essays in Biochemistry**, v. 59, p. 1-41, 2015.

RODRIGUES, P. H. M.; SENATORE, A. L.; ANDRADE, S. T. D.; RUZANTE, J. M.; LUCCI, C. D. S.; LIMA, F. R. D. Efeitos da adição de inoculantes microbianos sobre a composição bromatológica e perfil fermentativo da silagem de sorgo produzida em silos experimentais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 6, p. 2373-2379, 2002.

ROESCH, L. F. W.; PASSAGLIA, L. M. P.; BENTO, F. M.; TRIPLETT, E. W.; CAMARGO, F. A. D. O. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a plantas de milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, n. 6, p. 1367-1380, 2007.

ROMEIRO, R. S. **Organismos procariotas e promoção de crescimento em plantas**. 2012. Disponível em: < [http://www.seres.iciag.ufu.br/Siciac-Romeiro\[1\].pdf](http://www.seres.iciag.ufu.br/Siciac-Romeiro[1].pdf) >. Acesso em: 07, dez. 2016.

SAIKI, R. K.; SCARF, F.; FALOONA, F. A.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, p. 1350-1354, 1985.

SALIHU, A.; ALAM, Z. Production and applications of microbial lipases: A review. **Scientific Research and Essays**, v. 7, n. 30, p. 2667-2677, 2012.

SALIHU, A.; ALAM, Z. Solvent tolerant lipases: A review. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 86-96, 2015.,

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold spring harbor laboratory press, 1989.

SANTIAGO, A. L. C. M. A.; MOTTA, C. M. S. Isolation of mucorales from processed maize (*Zea mays* L.) and screening for protease activity, **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.698-700, 2008.

SANTOS, R. F.; PLACIDO, H. F.; GARCIA, E. B.; CANTÚ, C.; ALBRECHT, A. J. P.; ALBRECHT, L. P.; FRIGO, K. D. A. Sorgo sacarino na produção de agroenergia, **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v.4, p. 01- 12, 2015.

SANTOS, T. M. A. **Diversidade genética de bactérias endofíticas associadas a frutos de café (*Coffea arabica* L.)**. 2008. 112 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical biochemistry**, v. 160, n. 1, p. 47-56, 1987.

SHARMA, A. K.; SHARMA, V.; SAXENA, J.; YADAV, B.; ALAM, A.; PRAKASH, A. Isolation and screening of extracellular protease enzyme from bacterial and fungal isolates of soil, **International Journal of Scientific Research in Environmental Sciences**, v. 3, n. 9, p. 0334-0340, 2015.

SHARMA, S. B.; SAYYED, R. Z.; TRIVEDI, M. H.; GOBI, T. A. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 1, 2013.

SILVA, L. P.; CARUSO, C. S. A metagenômica na busca de enzimas hidrolíticas bacterianas. **Revista Eletrônica Estácio Saúde**, v. 4, n. 2, p. 193-210, 2015.

SILVA, M. C. S. **Bioprospecção e caracterização de microrganismos endofíticos de isolados de sementes de guaranazeiro e o controle da antracnose (*Colletotrichum spp.*)**. 2015. 76 f. Dissertação (Mestrado em Biologia na Agricultura e no Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

SILVA, M. D.; KUKLISNKY-SOBRAI, J.; FREIRE, F. J.; SILVA, M.O.; CADETE, L. L.; FARIAS, A. R. B. Bioprospecção de bactérias produtoras de amilase em feijão caupi e cana-de-açúcar. In: Jornada de ensino, pesquisa e extensão, 9, 2009, Universidade Federal Rural de Pernambuco UFRPE, Recife, 2009. **Anais Eletrônicos**. Disponível em: <<http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/listaresumos.htm>>. Acesso em: 23, out 2015.

SILVA, S. M.; OLIVEIRA, L. J.; FARIA, F. P.; REIS, E. F.; CARNEIRO, M. A. C.; SILVA, S. M. Atividade da enzima nitrato redutase em milho cultivado sob diferentes níveis de adubação nitrogenada e potássica. **Ciência Rural**, v. 41, n. 11, p. 1931-1937, 2011.

SILVA, V. M. A.; MARTINS, C. M.; MARTINS, S. C. S. Atividade celulolítica de actinobactérias de região semiárida do Ceará. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, n. 21, p 2026-2036, 2015.

SILVA, V. N.; SILVA, L. E. S. F.; FIGUEIREDO, M.V. B.; CARVALHO, F. G.; SILVA, M. L. R. B.; SILVA, A. J. N. Caracterização e seleção de populações nativas de rizóbios de solo da região semi-árida de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.37, n. 1, p. 16-21, 2007.

SIMONE, A.; HOESL, M. G.; BUDISA, N. Engineering lipases with an expanded genetic code. In: HILTERHAUS, L.; LIESE, A.; KETTLING, U.; ANTRANIKIAN, G. (Eds.). **Applied Biocatalysis: From Fundamental Science to Industrial Applications: From Fundamental Science to Industrial Applications**, Weinheim, Germany: WILEY-VHC. 2016. 3-12p.

SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, P. K. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v. 6, p. 173-188, 2016.

SIRKO, A.; BRODZIK, R. Review Plant ureases: Roles and regulation. **Acta Biochimica Polonica**, v. 47, n. 4, p. 1189-1195, 2000.

SOARES-NETO C. B. **Ocorrência, caracterização e identificação de bactérias diazotróficas em simbiose com *Mimosa spp.* em áreas de solo ultramáfico**. 2015. 127 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Microbiana) - Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

SOUZA, A. D.; SOUZA, A. D.; ASTOLFI-FILHO, S.; BELÉM PINHEIRO, M. L.; SARQUIS, M. I. D. M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta amazônica**, v. 34, n. 2, p. 185-195, 2004.

SOUZA, P. M.; BITTENCOURT, M. L. A.; CAPRARA, C. C.; FREITAS, M.; ALMEIDA, R.P. C.; SILVEIRA, D.; FONSECA, Y. M.; FERREIRA-FILHO, E. X.; PESSOA-JUNIOR, A.; MAGALHÃES, P. O. Biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.46, n. 2, p. 337-346, 2015.

SPERB, J. G. C.; COSTA, T. M.; VAZ, D. A.; VALLE, J. A. B.; VALLE, R. D. C. S. C.; TAVARES, L. B. B. Análise qualitativa da produção de lipases e biossurfactantes por fungos isolados de resíduos oleosos. **Engevista**, v. 17, n. 3, p. 385-397, 2015.

STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N. G. **Aplicação e evolução dos métodos moleculares para o estudo da biodiversidade do rizóbio**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, n. 93, 1999. 58p.

SUNAR, K.; KUMAR, U.; DESHMUKH, S.K. Recent applications of enzymes in personal care products. In: DHILLON, G.S.; KAUR, S. (Eds.). **Enzymes - Agro-industrial wastes as feedstock for enzyme production: apply and exploit the emerging and valuable use options of waste biomass**. 1 ed. Canada: Elsevier, 2016. 350 p.

SUNDARRAM, A.; MURTHY, T. P. K. α -amylase production and applications: a review. **Journal of Applied & Environmental Microbiology**, v. 2, n. 4, p. 166-175, 2014.

SYLVESTER-BRADLEY, R., ASAKAWA, N., TORRACA, S. L., MAGALHÃES, F. M. M., OLIVEIRA, L. A., PEREIRA, R. M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazonica**, v. 12, p. 15-22, 1982.

TEIXEIRA FILHO, M.C.M.; BUZETTI, S.; ANDREOTTI, M.; ARF, O.; BENETT, C. G. S et al. Doses, fontes e épocas de aplicação de nitrogênio em trigo irrigado em plantio direto **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.45, n.8, p.797-804, 2010.

TEIXEIRA, J. R.; FERREIRA, A. S.; SANTOS, M. A. Isolamento de bactérias diazotróficas do solo e de raízes de *Gossypium hirsutum*, *Saccharum officinarum* e *Zea mays* cultivados em solos do Cerrado. **Horizonte Científico**, v. 2, n. 1, p. 1-20, 2008.

TEIXEIRA, M. A.; MELO, I. S.; VIEIRA, R. F.; COSTA, F. E. C.; HAKAKAVA, R. Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovarietades em três estados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.1, p.43-49, 2007.

TOLENTINO D. C. **Qualidade de silagens de genótipos de sorgo**. 2014. 83f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Montes Claros, Minas Gerais, 2014.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. p. 664.

- TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V. A review on microbial lipases production. **Food and bioprocess technology**, v. 3, n. 2, p. 182-196, 2010.
- URQUIAGA, S.; JANTALIA, C. P.; RESENDE, A. S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Contribuição da Fixação Biológica de Nitrogênio na Produtividade dos Sistemas Agrícolas na América Latina In: AQUINO, A. M.; ASSIS, R. L. (Eds.). **Conhecimentos e técnicas avançadas para o estudo dos processos da biota no sistema solo-planta**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. 181-200 p.
- VANDENBERGHE, L.P. S.; CARVALHO, J.C.; LIBARDI, N.; RODRIGUES, C.; SOCCOL, C. R. Microbial enzyme factories: current trends in production processes and commercial aspects. In: DHILLON, G.S.; KAUR, S. (Eds.). **Enzymes - Agro-industrial wastes as feedstock for enzyme production: apply and exploit the emerging and valuable use options of waste biomass**. 1 ed. Canada: Elsevier, 2016. 350 p.
- VERMA, V. C.; GANGE, A. C. **Advances in Endophytic Research**. Springer India, 2014. 460 p.
- VERMELHO, A. B.; NORONHA, E. F.; FERREIRA FILHO, E. X.; FERRARA, M. A.; BOM, E. P. S. Diversity and biotechnological applications of prokaryotic enzymes, In: ROSENBERG, E.; DELONG, E. F.; LORY, S.; STACKEBRANDT, E.; THOMPSON, F. (Eds.). **The Prokaryotes**. 4. ed.: Springer Berlin Heidelberg, 2013. 413p.
- VIDEIRA, S. S. **Taxonomia polifásica de bactérias diazotróficas do gênero *Sphingomonas spp.* e efeito da inoculação em plantas de Arroz**. 2008. 140 f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ, Seropédica, 2008.
- VIDEIRA, S. S.; ARAÚJO, J. L. S.; BALDANI, V. L. D., **Metodologia para isolamento e posicionamento taxonômico de bactérias diazotróficas oriundas de plantas não-leguminosas**, Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. 74p.
- WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.
- WILLIAMSON, J. M. The role of information and prices in the nitrogen fertilizer management decision: new evidence from the agricultural resource management survey. **Journal of Agricultural and Resource Economics**, v. 36, n. 3, p. 552-572, 2011.

WILSON, D. Fungal endophytes: out of sight but should not be out of mind? **Oikos**, v. 68, n. 2, p. 379-384, 1993.

ANEXO I

Meios de Cultura, Reagentes e Soluções.**Meio NFb – Lactato *modificado* (PEDROSA; YATES, 1984)**

Lactato 50%	10 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02 g
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	20 mg
Solução de micronutrientes	10 mL
Biotina	0,1 mg
Ágar	18g.L ⁻¹
Água	q.s.p 1L
pH	6,8

Fonte de Nitrogênio

NH ₄ Cl (1M)	20 mL
-------------------------------	-------

Solução de Fosfatos

K ₂ HPO ₄	120 g.L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	80 g.L ⁻¹

Meio NFbHP semi-sólido (PEDROSA; YATES, 1984) – (*para teste de fixação de nitrogênio*)

NFb - Lactato (Líquido)	89 mL
NFb - Lactato (Sólido)	16 mL
Glutamato (1M)	50 µL

Solução de Fosfatos

K ₂ HPO ₄	120 g.L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	80 g.L ⁻¹

Os meios foram misturados com temperatura superior a 50 °C.

Meio YMA (HUNGRIA, ARAUJO, 1994)

Manitol	10,0 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
Extrato de levedura	0,5 g
pH	6,5

Meio LGI-P (DÖBEREINER; ANDRADE; BALDANI, 1999)

Sacarose	100,0 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
K ₂ HPO ₄	0,6 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
CaCl ₂	0,02 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,002 g
FeEDTA	0,066 g
Azul de bromotimol sol. 0,5 % em 0,2 N de KOH	2 mL
Biotina	0,1 mg
Ágar	2 g.L ⁻¹
Água	q.s.p. 1L
pH	5,4

Caldo Batata (DOBEREINER, ANDRADE, BALDANI, 1999)

Batata inglesa cozida	200 g
<i>Foi utilizado o caldo filtrado</i>	
Ácido málico	2,5 g.L ⁻¹
Açúcar cristal comercial	2,5 g.L ⁻¹
Biotina	0,1 mg
Solução de micronutrientes	2 mL
pH	6,8

Solução de Micronutrientes (DÖBEREINER; ANDRADE; BALDANI, 1999)

Na ₂ MoO ₄	0,2 g
MnSO ₄	0,235 g
H ₃ BO ₃	0,28 g
CuSO ₄	0,008 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,024 g
Água	q.s.p. 1L
pH	6,8

Meio Mínimo (HUNGRIA et al., 1994)***Solução 1***

(NH ₄) ₂ HPO ₄	30 g
KH ₂ PO ₄	15 g
K ₂ HPO ₄	2,5 g
NaCl.....	2,5 g
Água q.s.p.	1L

Solução 2

MgSO ₄ .7H ₂ O (1M).....	20 mL
--	-------

Solução 3

Ágar	22,5 g
Água q.s.p.	1L

Meio Citrato Simmons (TEIXEIRA; FERREIRA; SANTOS, 2012)

Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1g
K ₂ HPO ₄	1g
NaCl.....	5g
Azul de Bromotimol 0,5% em 0,2N de KOH	15 mL
Ágar	20 g
Água q.s.p.....	1L
pH	6,8

Meio Uréia (CHRISTENSEN, 2012)

Peptona	1g
Glicose	1g
NaCl.....	5g
KH ₂ PO ₄	2g
Vermelho de Fenol	0,012g
Ágar	14 g
Água q.s.p.....	1L
pH	6,8

Solução de Ágar

Ágar	18,0 g
Água q.s.p.	800,0 mL

Solução de Sais

Na ₂ HPO ₄	30,0 g
KH ₂ PO ₄	15,0 g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	2,5 g
NaCl.....	2,5g
Água q.s.p.	1 L

Meio Leite Sólido

Solução MgSO ₄ .7H ₂ O (1M).....	1,0 mL
Solução de Sais.....	200,0 mL
Solução de Leite (20%)	200,0 mL
Solução de Ágar	800,0 mL
pH	7,0

Meio Carboximetilcelulose (CMC) Sólido

MgSO ₄ .7H ₂ O 1M	1,0 mL
Solução de Sais.....	200,0 mL
Solução de CMC (6%).....	200,0 mL
Solução de Ágar	800,0 mL

pH 7,0

Meio Tween Sólido

MgSO₄.7H₂O 1M 1,0 mL
 Solução de Sais 200,0 mL
 Tween 80 10,0 mL
 Solução de Ágar 800,0 mL
 pH 7,0

Meio Pikovskaya's - PVK (PIKOVSKAYA, 1948)

Extrato de levedura 0,5 g
 Glicose 10,0 g
 Ca₃(PO)₄ 5,0 g
 (NH₄)₂SO₄ 0,5 g
 KCl 0,2 g
 MgSO₄.7H₂O 0,1 g
 MnSO₄.H₂O 0,0001 g
 FeSO₄.7H₂O 0,0001 g
 Água q.s.p. 1L
 Ágar 15,0 g
 pH 7,0

Meio NBRIP (NAUTIYAL, 1999)

Glicose 10,0 g
 Ca₃(PO₄)₂ 5,0 g
 MgCl₂.6H₂O 5,0 g
 KCl 0,2 g
 MgSO₄.7H₂O 0,25 g
 (NH₄)₂SO₄ 0,1 g
 Água q.s.p. 1L
 Ágar 15,0 g
 pH 7,0

Meio GL (P-Ca) *Modificado* (SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982)

Glicose 10g
 Extrato de levedura 2g
 Ca₃(PO)₄ 5,0 g
 Ágar 18,0
 Água q.s.p. 1L
 pH 6,8

Meio GL (P-Al) (Hara; Oliveira, 2004)

K₂HPO₄ 6g
 AlCl₃ 5,34g

Ágar	25,0 g
Água	q.s.p. 1L
pH	4,5

Reagente para a coloração de Gram (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001)

Solução cristal de Violeta

Violeta de metila	4g
$C_2H_8N_2O_4$	4g
$CH_3 CH_2OH$	100 mL
CH_3OH	100 mL
Água q.s.p.	600 mL

Solução de lugol

Iodeto de potássio (KI)	4,5g
Iodo metálico	3g
Água q.s.p.	450 mL

Solução de safranina

Safranina	2,5g
-----------------	------

Reagente CAS (SCHWYN; NEILAND, 1987)

Solução A

Cromo Azul S	12,2 mg
H_2O	10 mL

Esterilizado por filtração

Solução B

HCl (concentrado)	84 μ L
H_2O (deionizada)	100 mL
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (1mM)	27mg

Solução C

HDTMA	21,9 mg
H_2O (deionizada)	25 mL

Solução D

Piperazina anidra (PIPE)	4,307 g
H_2O (deionizada)	40 mL