



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

LUCAS BRILHANTE FELICIANO BATISTA

**SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO
VEGETAL ISOLADOS DA RIZOSFERA DO TAMBORIL (*Enterolobium
contorsiliquum*)**

JOÃO PESSOA – PB

2023

LUCAS BRILHANTE FELICIANO BATISTA

**SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO
VEGETAL ISOLADOS DA RIZOSFERA DO TAMBORIL (*Enterolobium
contorsiliquum*)**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado a Coordenação do curso
Engenharia Química da Universidade
Federal da Paraíba, como requisito parcial
para obtenção do título de Bacharel em
Engenharia Química.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Sharline
Florentino de Melo Santos

JOÃO PESSOA – PB

2023

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

B333s Batista, Lucas Brilhante Feliciano.

SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO
VEGETAL ISOLADOS DA RIZOSFERA DO TAMBORIL (*Enterolobium*
contorsiliquum) / Lucas Brilhante Feliciano Batista. -
João Pessoa, 2023.
39 f.

Orientação: SHARLINE FLORENTINO DE MELO SANTOS.
TCC (Graduação) - UFPB/CT.

1. microrganismos rizosféricos. 2. solo. 3.
crescimento vegetal. 4. seleção. I. SANTOS, SHARLINE
FLORENTINO DE MELO. II. Título.

UFPB/CT/BSCT

CDU 66.01(043.2)

LUCAS BRILHANTE FELICIANO BATISTA

**SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO
VEGETAL ISOLADOS DA RIZOSFERA DO TAMBORIL (*Enterolobium
contorsiliquum*)**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado a Coordenação do curso
Engenharia Química da Universidade
Federal da Paraíba, como requisito parcial
para obtenção do título de Bacharel em
Engenharia Química.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Sharline
Florentino de Melo Santos

Aprovado em 25 de outubro de 2023.

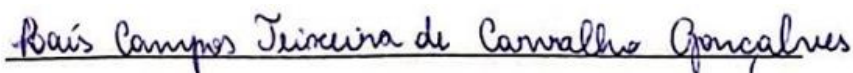
BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dr.^a Sharline Florentino de Melo Santos - Orientadora
DEQ - Centro de Tecnologia - Universidade Federal da Paraíba



Prof.^a Dr.^a Andréa Farias de Almeida - Examinadora
DBiotec - Centro de Biotecnologia - Universidade Federal da Paraíba



Prof.^a Dr.^a Laís Campos Teixeira de Carvalho Gonçalves - Examinadora
DTS - Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional - Universidade Federal da Paraíba

*Pelo carinho, amor, dedicação e cuidado que meus pais me deram durante toda a
minha existência, dedico este trabalho a eles.*

Com muita alegria e gratidão.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, agradeço por me concederes força nos momentos de dificuldade, paciência nas horas de espera e inspiração nos momentos de desafio. Tu, que és a fonte de todo conhecimento, foste meu farol durante toda essa jornada acadêmica. Cada descoberta, cada obstáculo superado e cada página escrita foram possíveis graças à Tua presença divina.

Aos meus pais, José Carlos Feliciano Batista e Edna Brilhante da Silva que não só me apoiaram financeiramente, mas com suas palavras, amor, incentivo, atenção, carinho. Agradeço pela educação que me deram e porque tudo que sou hoje é graças a eles. Por todo o esforço e por fazerem mais do que o possível para criar eu e a minha irmã e nos proporcionar o melhor que poderiam ofertar.

Aos professores e colegas do curso de Engenharia Química, pelos momentos compartilhados ao longo da graduação, que enriqueceram minha formação acadêmica.

A Professora Sharline Florentino! É difícil expressar em palavras a minha gratidão por sua orientação e apoio ao longo deste processo. Sua paciência, sabedoria e incentivo foram fundamentais para que eu pudesse concluir este trabalho. Obrigado por sua dedicação incansável, por acreditar em mim e por me guiar com tanto carinho e profissionalismo.

Aos órgãos de fomento à pesquisa juntamente à Universidade Federal da Paraíba, agradeço de coração por tornarem realidade este projeto, contribuindo não apenas para o meu crescimento acadêmico, mas também para o progresso da ciência e do conhecimento em nossa sociedade.

Por fim, agradeço a todos os amigos e familiares por terem me dado força e motivação para nunca desistir dos meus objetivos, sendo pilares importantes no meu caminho até a conclusão deste curso.

Um cientista no seu laboratório não é apenas um técnico: é, também, uma criança colocada à frente de fenômenos naturais que impressionam como se fossem um conto de fadas.

Marie Curie

RESUMO

A Caatinga é um bioma brasileiro que apresenta clima semiárido, ocupando cerca de 11% do território brasileiro e 70% da região Nordeste. Apresenta uma grande biodiversidade de fauna, flora e microrganismos, muitas das suas espécies são adaptadas ao estresse hídrico e às altas temperaturas. A *Enterolobium contortisiliquum*, popularmente conhecida por tamboril, é uma árvore pertencente à família das leguminosas e que se adaptou ao Nordeste brasileiro, onde é facilmente encontrada. O tamboril possui crescimento rápido e grande porte, características que demonstram tanto sua atividade microbiana eficiente quanto seu largo emprego no reflorestamento de áreas degradadas. Dessa forma, o objetivo do trabalho é isolar microrganismos da rizosfera do tamboril coletados na caatinga paraibana e, com isso, selecionar os promissores à promoção do crescimento vegetal. Para esse estudo, as amostras de solo rizosférico foram coletadas na cidade de Bananeiras-PB. Foram isoladas bactérias e fungos nos meios ágar batata dextrose e ágar nutriente, respectivamente. Seguidamente, já com as colônias isoladas foi avaliado a produção de ácido indol-3-acético e a fixação do nitrogênio atmosférico. Os testes de fixação do Nitrogênio atmosférico obtiveram resultados positivos, com algumas ressalvas; os testes de produção de ácido indol-3-acético se mostraram muito promissores, com alguns microrganismos apresentando altos índices de produção dessa auxina. Dessa forma, de acordo com o que foi desenvolvido neste trabalho, tendo em vista a complexidade destas análises para a determinação de microrganismos promotores de crescimento vegetal, é importante destacar que pesquisas como estas devem continuar sendo incentivadas a fim de que haja mais conhecimento sobre este tema.

Palavras chave: microrganismos rizosféricos; solo; crescimento vegetal; seleção.

ABSTRACT

The Caatinga is a Brazilian biome that has a semi-arid climate, occupying around 11% of the Brazilian territory and 70% of the Northeast region. It has a great biodiversity of fauna, flora and microorganisms, many of its species are adapted to water stress and high temperatures. *Enterolobium contortisiliquum*, popularly known as monkfish, is a tree belonging to the legume family and which has adapted to the Brazilian Northeast, where it is easily found. The monkfish has rapid growth and large size, characteristics that demonstrate both its efficient microbial activity and its wide use in the reforestation of degraded areas. Therefore, the objective of the work is to isolate microorganisms from the rhizosphere of monkfish collected in the Paraíba caatinga and, therefore, select those that are promising for promoting plant growth. For this study, rhizospheric soil samples were collected in the city of Bananeiras-PB. Bacteria and fungi were isolated on potato dextrose agar and nutrient agar, respectively. Then, with the isolated colonies, the production of indole-3-acetic acid and the fixation of atmospheric nitrogen were evaluated. Atmospheric nitrogen fixation tests obtained positive results, with some caveats; tests for the production of indole-3-acetic acid proved to be very promising, with some microorganisms showing high levels of production of this auxin. Therefore, in accordance with what was developed in this work, in view of the complexity of these analyzes for determining plant growth-promoting microorganisms, it is important to highlight that research such as these should continue to be encouraged so that there is more knowledge about this theme.

Key words: rhizospheric microorganism; ground; plantgrowth; selection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Tamboril (<i>Enterolobium contorsiliquum</i>).....	12
Figura 2	A Caatinga.....	14
Figura 3	Ilustração do ciclo do nitrogênio.....	16
Figura 4	Influência da presença de AIA no desenvolvimento de raízes.....	19
Figura 5	Esquema do método da diluição seriada.....	20
Figura 6	Bactérias isoladas em meio AN (Ágar, Nutriente).....	29
Figura 7	Fungos isolados em meio BDA (Ágar, batata, dextrose).....	29
Figura 8	Primeiro repique de fungos em meio sólido NFb.....	33
Figura 9	Segundo repique de fungos em meio sólido NFb.....	33
Figura 10	Primeiro repique de bactérias em meio líquido NFb.....	34
Figura 11	Segundo repique de bactérias em meio líquido NFb.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Formulação do meio ágar, batata, dextrose (BDA).....	22
Tabela 2	Formulação do meio ágar, nutriente (AN).....	22
Tabela 3	Composição do Meio FAN.....	25
Tabela 4	Composição do meio NFb para fungos.	26
Tabela 5	Composição da solução de micronutrientes.....	26
Tabela 6	Composição da solução de vitaminas.	27
Tabela 7	Composição do meio NFb para bactérias.....	27
Tabela 8	Lista de Microrganismos isolados.....	28
Tabela 9	Crescimento dos fungos em meio NFb.....	34
Tabela 12	Crescimento das bactérias no meio NFb.....	34

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Concentração de AIA sintético Vs Absorbância.....	30
Gráfico 2	Produção média de AIA das bactérias isoladas do Tamboril.....	30
Gráfico 3	Produção média de AIA dos fungos isolados do Tamboril.....	32

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	13
2.1. Objetivo geral.....	13
2.2. Objetivos específicos.....	13
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	14
3.1. A Caatinga.....	14
3.2. Microrganismos rizosféricos	15
3.3. Fixação biológica do nitrogênio	16
3.3.1. Fixação simbiótica do nitrogênio em leguminosas.....	18
3.4. Ácido indol-3-acético (AIA)	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1. coleta e preparação das amostras	20
4.2. Análises de solo.....	21
4.2.1. Análise de pH	21
4.2.2. Análise de umidade.....	21
4.3. Isolamento	21
4.3.1. Plaqueamento.....	22
4.3.2. Manutenção dos microrganismos isolados	23
4.4. Seleção	23
4.4.1. Produção de ácido indol-3-acético (AIA).....	24
4.4.1.1. Produção de AIA por bactérias.....	24
4.4.1.2. Produção de AIA por fungos	24
4.4.2. Fixação do nitrogênio atmosférico	25
4.4.2.1. Fixação do nitrogênio atmosférico por fungos	25
4.4.2.2. Fixação de Nitrogênio atmosférico por bactérias.	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28

5.1.	Análise do solo	28
5.2.	Isolamento	28
5.2.1.	Isolamento de bactérias.....	28
5.2.2.	Isolamento dos fungos.....	29
5.3.	Produção de Ácido indol-3-acético	30
5.3.1.	Produção de AIA por bactérias.....	30
5.3.2.	Produção de AIA por fungos	31
5.4.	Fixação de nitrogênio atmosférico	32
5.4.1.	Fixação do nitrogênio atmosférico por fungos	32
5.4.2.	Fixação do nitrogênio atmosférico por bactérias.....	34
6.	CONCLUSÕES.....	35
	REFERÊNCIAS	36

1. INTRODUÇÃO

A Caatinga é o único bioma exclusivamente brasileiro e ocupa 800.000 km². O nome “caatinga” tem origem Tupi-Guarani, significa "mata branca", e refere-se à paisagem esbranquiçada da vegetação, adaptada à seca e aos ciclos climáticos (FILIZOLA e SAMPAIO, 2015), compreendendo os estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Piauí, Sergipe e o norte de Minas Gerais (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2016).

As condições naturais de estresse hídrico e temperaturas elevadas, caracteriza a caatinga como um bioma bastante seletivo, tendo sua flora bem adaptada a tais condições. Desse modo, quando comparada a outras regiões semiáridas pelo mundo, a caatinga é a área mais biodiversa, que tem o maior conjunto de espécies de fauna e flora (FERNANDES, 2022).

O *Enterolobium contortisiliquum*, popularmente conhecida como tamboril, timbaúba ou orelha-de-negro, é uma espécie nativa da caatinga pertencente à família Fabaceae-Mimosoideae. É uma espécie decídua, heliófita, seletiva e higrófito, dispersa em várias formações florestais. Possui altura de 20 a 35m, com tronco de 80 a 160 cm de diâmetro; formando uma copa ampla e frondosa com folhas compostas bipinadas com 2-7 jugas (LORENZI, 1998).

Figura 1.1 - Tamboril (*Enterolobium contortisiliquum*)



Fonte: VIVEIRO AMBIENTAL (2023)

O uso de microrganismos promotores de crescimento vegetal em solos construídos combinado com algumas espécies de plantas, pode contribuir na recuperação de áreas degradadas, como demonstrado por Gervazio et al. (2015), além de ser considerado um

parâmetro indicador de recuperação de áreas degradadas através de sua quantidade e diversidade encontrados ao longo dos monitoramentos (SILVEIRA; MELLONI; PEREIRA, 2004).

Apesar de alguns microrganismos se mostraram prejudiciais às plantas, como os patogênicos, muitos são benéficos, promovendo a manutenção e sobrevivência da vida vegetal, com efeitos no crescimento e no desenvolvimento das plantas (VRIEZE, 2015; GEORGE; DOU; WANG, 2016).

O conhecimento da biodiversidade e bioprospecção de novos microrganismos tornaram-se um dos focos principais da era biotecnológica, visto que a utilização de microrganismos na busca de soluções nas áreas de meio ambiente e indústria vêm crescendo de forma acelerada no atual cenário mundial (COELHO, 2018).

Segundo Kavamura (2013), os microrganismos associados às plantas da caatinga se encontram bem adaptados às condições impostas pelo clima, desenvolvendo mecanismos de proteção celular contra o estresse hídrico, assim como proteção vegetal contra a dessecação. Desse modo, uma das alternativas de recuperação a ser considerada é a de utilização da atividade microbiana como biorremediador e biofertilizante.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Isolar Microrganismos do solo rizosférico do Tamboril.

Selecionar entre os microrganismos rizosféricos isolados os que sejam promotores de crescimento vegetal.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar a capacidade dos microrganismos isolados com base nos resultados das análises experimentais dos testes de produção de Ácido Indol-3-acético e fixação do nitrogênio atmosférico.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1.A Caatinga

A caatinga, bioma nativo brasileiro possui em seu extenso território uma grande biodiversidade de plantas, animais e um grande potencial microbiológico ainda inexplorado. As condições naturais de estresse hídrico e temperaturas elevadas, caracteriza a caatinga como um bioma bastante seletivo, tendo sua flora bem adaptada a tais condições. Desse modo, quando comparada a outras regiões semiáridas pelo mundo, a caatinga é a área mais biodiversa, que tem o maior conjunto de espécies de fauna e flora (FERNANDES, 2022).

A região se caracteriza por apresentar terrenos cristalinos praticamente impermeáveis e terrenos sedimentares que se apresentam com boa reserva de água subterrânea. Os solos, com raras exceções, são pouco desenvolvidos, mineralmente ricos, pedregosos e pouco espessos e com fraca capacidade de retenção da água, fator limitante a produção primária nessa região

O relevo é representado pelo Escudo Nordestino aplainado e seu núcleo arqueado e falhado - a Borborema - com restos de cobertura sedimentar; pelas bacias sedimentares Paleomesozóicas do Piauí-Maranhão com os alinhamentos de cuestas da Serra Grande-Ibiapaba e Chapadas do Sudeste do Piauí; a dorsal Baiana com a cobertura sedimentar da Chapada da Diamantina; as bacias mesozóicas do Araripe, Apodi, Jatobá, Tucano, Recôncavo e outras; e os Tabuleiros elaborados nos sedimentos Plio-pleistocênicos da Formação Barreiras, em suas grandes linhas.

Figura 3.2 - A caatinga



Fonte: O eco (2023)

A cobertura vegetal é representada por formações xerófilas - as caatingas - muito diversificadas por razões climáticas, edáficas, topográficas e antrópicas. Ao lado destas formações vegetais dominantes, ocorrem também as florestas dos relevos (florestas perenifólias e sub-perenifólias dos brejos de altitude e encostas expostas aos fluxos úmidos de ar e de florestas semi-decíduas) e as florestas ripárias e os cerrados.

Apesar de sua grande extensão, a desertificação da caatinga vem avançando muito nos últimos tempos, 13% do seu território já se encontra em estágio avançado de desertificação. O crescente estresse hídrico na região, é um dos fatores que mais acelera a degradação da caatinga, somado às consequências do desmatamento, cerca de 50% do seu território já foi desmatado (ANTONGIOVANNI et al., 2022).

Atualmente a caatinga possui 8,8% de áreas protegidas, ainda assim, menos de 2% da caatinga é área de proteção integral da biodiversidade. Portanto, faz-se necessário ações de restauração desse bioma que carrega consigo inúmeros potenciais desvalorizados e ainda inexplorados.

3.2. Microrganismos rizosféricos

A rizosfera é a região de solo que circundas as raízes das plantas (JUNIOR et al., 1996). É na rizosfera que vários micro-organismos encontram ambiente e substrato ideal para sua proliferação, sendo denominados micro-organismos rizosféricos. De acordo com Kanchiswamy et al. (2015), a interação entre microrganismos endofíticos e rizosféricos, e plantas, confere vantagens importantes, como produção de fito hormônios, proteção contra herbívora, proteção contra patógenos, além de tolerância a estresse hídrico e produção de metabolitos importantes.

Kozusny-Andreani, Agiado e Andreani Junior (2014), descreve em seu trabalho, que a utilização de Rizobactérias no cultivo de cenoura, apresentaram efeitos benéficos em seu desenvolvimento, o resultado pode ser observado, na produção de fitomassa da parte aérea, já nas raízes, ocorreu uma maior acumulação de N e P. Santos, Santana e Lara (2018), descrevem que a inoculação com os fungos micorrizicos, nativos da rizosfera do ipê amarelo, aumenta a massa seca das plantas de milho, tornando-se, um inoculante promissor para o cultivo.

3.3.Fixação biológica do nitrogênio

O nitrogênio, dentre os macronutrientes, é o mais exigido pelas plantas. É componente de aminoácidos, proteínas e material genético (DNA e RNA). Está associado também ao crescimento e desenvolvimento dos vegetais, por estar envolvido no processo de síntese de clorofilas, responsáveis pelo processo fotossintético.

Figura 3.3 – Ilustração do ciclo do nitrogênio



Fonte: ILSA (2020)

Na atmosfera, o nitrogênio está presente na forma de gás nitrogênio, representado pela fórmula molecular N₂ (N≡N), e constitui 78 % do ar atmosférico. Apesar de ser encontrado em grande quantidade na atmosfera, o gás nitrogênio não é utilizado pela maioria dos organismos vivos, os quais são incapazes de fixar e incorporar à matéria viva o nitrogênio atmosférico. Entre os organismos capazes de utilizar esse nitrogênio, estão alguns tipos de bactérias (SANTOS, 2020).

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) é um processo enzimático em que o N₂ é reduzido a NH₃ pela ação de microrganismos de vida livre, associados às plantas ou simbioses. Evolutivamente, acredita-se que a FBN tenha se desenvolvido quando as reservas geoquímicas de nitrogênio se tornaram escassas na biosfera. O esgotamento dos óxidos de nitrogênio (nitratos e nitritos) pelos organismos teria, provavelmente, limitado seus crescimentos e ocasionado uma pressão seletiva, que favoreceu o aparecimento da diazotrofia

(LEMOS, 2011). Este termo refere-se a microrganismos diazotróficos, ou seja, organismos com capacidade de fixar o N_2 .

Apesar de a atmosfera ser composta de 78 % de gás dinitrogênio (N_2) organismos eucariotos, como plantas e animais, não conseguem utilizar este elemento diretamente. O problema básico para a fixação do nitrogênio é a presença da ligação tripla ($N\equiv N$), que torna este gás extremamente estável à temperatura ambiente. O rompimento desta tripla ligação por microrganismos requer a enzima nitrogenase. Os genes que codificam para esta enzima são amplamente encontrados no Domínio Bacteria e mesmo no Domínio Archaea MARTINEZ-ROMERO (2006).

São conhecidos três tipos de nitrogenase: uma que possui molibdênio (Mo, nitrogenase-1) e ferro (Fe), outro em que o vanádio (V) substitui o Mo (nitrogenase-2), em condições onde a concentração desse elemento é baixa, e, uma terceira, que não parece conter nem molibdênio nem vanádio. A enzima nitrogenase é extremamente sensível ao oxigênio, uma vez que esta molécula pode reagir com o componente Fe das proteínas. As bactérias *Azotobacter* spp., um diazotrófico aeróbio do solo (MARTINEZ-ROMERO, 2006) e *Rhodopseudomonas palustris*, uma bactéria fotossintetizante (LARIMER et al., 2004) apresentam os três tipos de nitrogenase, o que é uma vantagem quando o Mo é limitante nos solos (BELLENGER et al., 2011).

A proteção da nitrogenase da molécula de O_2 não é um problema para as bactérias anaeróbias, mas poderia se tornar um grande obstáculo para espécies aeróbias, tais como cianobactérias, bactérias aeróbicas de vida livre (*Azotobacter* e *Beijerinckia*) e para as bactérias que fixam o N_2 em simbiose com leguminosas. Entretanto, estes microrganismos possuem formas de evitar o contato do O_2 com a enzima nitrogenase. Nas espécies de *Azotobacter*, o seu elevado metabolismo respiratório mantém baixos os níveis de O_2 nas células. Outras bactérias são capazes de produzir polissacarídeos extracelulares, que limitam a difusão de O_2 para o interior das células. Nas cianobactérias, a fixação do nitrogênio ocorre em células especiais denominadas heterocistos, que possuem somente o fotossistema I (usado para gerar ATP pelas reações mediadas pela luz) e não geram oxigênio. Na associação simbiótica com leguminosas, a fixação do N_2 ocorre em estruturas denominadas nódulos. Após a formação destes, diversas proteínas são sintetizadas e uma delas, a leghemoglobina, controla o suprimento de oxigênio para os tecidos nodulares.

Os microrganismos fixadores de N_2 podem existir como organismos de vida livre e em associações com diferentes graus de complexidade com as plantas. Estes microrganismos podem ser divididos em:

1. Fixadores não-simbióticos ou de vida livre;
2. Fixadores associativos, que formam uma relação casual e pobremente estruturada com raízes ou porções aéreas das plantas;
3. Fixadores simbióticos que fixam o N_2 em associações organizadas com plantas superiores.

3.3.1. Fixação simbiótica do nitrogênio em leguminosas

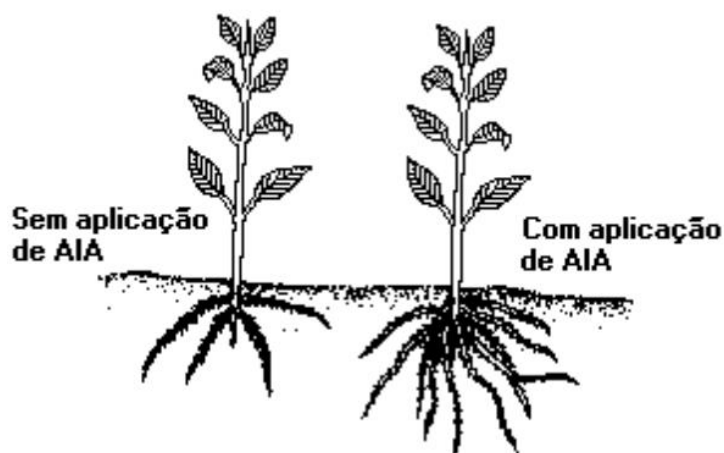
A fixação biológica do N_2 (FBN) em leguminosas é um processo chave para a sustentabilidade agrícola devido ao seu reduzido impacto no ambiente, em relação à utilização de fertilizantes nitrogenados. Estes fertilizantes são produzidos por meio da síntese química da amônia, que gera grandes quantidades de CO_2 , que é um gás de efeito estufa. A fixação biológica do nitrogênio em plantas da família Leguminosae ocorre pela associação simbiótica com bactérias coletivamente conhecidas como rizóbios, que interagem com as raízes para formar estruturas especializadas denominadas nódulos. Nos nódulos, o rizóbio na forma pleiomórfica (bacteróide) fixa o N_2 atmosférico e o converte para uma forma combinada, a amônia, que pode ser utilizada pela planta hospedeira. Essa reação é endergônica e para que ela ocorra é necessário o fornecimento de energia armazenada na forma de ATP (HOFFMANN, 2007). A planta fornece aos rizóbios fontes de carbono e ambiente favorável à fixação do N_2 . As taxas de fixação de N_2 variam com o hospedeiro, com o microssimbionte e com as condições ambientais. Leguminosas de grãos fixam de 25 a 200 kg N ha⁻¹ por ciclo de crescimento e suprem de 40 a 100 % das necessidades de N da planta.

3.4. Ácido indol-3-acético (AIA)

Os hormônios vegetais, conhecidos como fitormônios, são substâncias orgânicas importantes para o desenvolvimento da planta. Destaca entre os fitormônios as auxinas, Citocininas, Etilenos, Giberelinas e Ácido Abscísico (RAVEN et al., 2001). Stroschein et al, (2011) diz que os rizóbios são capazes de promover o crescimento de plantas não leguminosas

por produção de fitormônios. O Ácido Indol-3-acético (AIA), encontra se no grupo das auxinas, e por isso é o fitormônio mais estudado atualmente (CASSÁN; VANDERLEYDEN; SPAEPEN, 2013).

Figura 3.4 - Influência da presença de AIA no desenvolvimento de raízes



Fonte: Oda (2023)

O AIA tem grande influência na taxa de crescimento dos meristemas apicais, flores e frutos, (TAIZ; ZEIGER, 2004). É responsável pelo alongamento e síntese de células, promovendo a formação de raízes adventícias no caule e a expansão radicular e consequentemente o crescimento da planta.

Ainda de acordo com Thaiz; Zeiger (2004), o principal precursor para síntese do AIA é o aminoácido Triptofano (Trp). A produção de AIA por parte das bactérias, já está sendo estudada a muito tempo. Patten e Glick (1996) estimam em seus trabalhos que 80% de bactérias rizosféricas sintetizam esse fitormônio na presença de Trp. Existe estudos que destacam a produção de AIA por bactérias *A. brasilense* independentes de Trp (PRINSEN et al. 1993).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

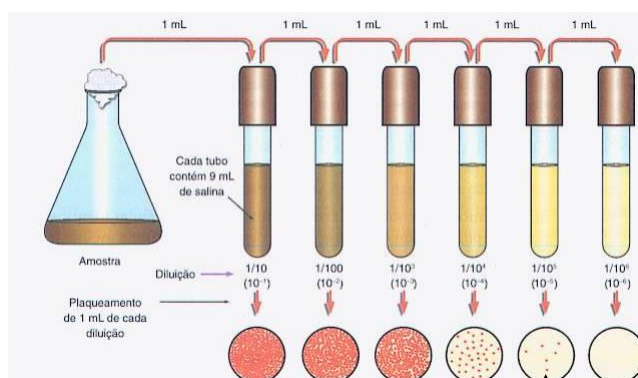
4.1. coleta e preparação das amostras

A coleta do solo foi realizada no dia 10 de janeiro de 2022 no município de Bananeiras/PB (6° 45' 4" S 35° 38' 0" W), A temperatura ambiente no local da coleta estava em 26°C e a temperatura do solo estava em torno dos 32°C.

A coleta foi executada conforme a metodologia descrita por MASSENSINI et al., 2016. Cinco amostras contendo solo rizosférico foram coletadas, definido como aquele que permanece aderido às raízes, na camada de 0-20 cm de profundidade e a uma distância máxima de 1,0 m do caule. Após a coleta, as amostras foram levadas para o Laboratório de Bioengenharia em caixa térmica e processadas no mesmo dia.

No laboratório, foi feita a separação de algumas raízes que estavam presentes nas amostras de solo coletadas. Também foi realizada a mistura dos pontos de coleta da amostra, para se obter uma maior representatividade do solo rizosférico. Todos os materiais utilizados para o isolamento como a solução salina, frascos, foram autoclavados por cerca de 15 minutos a 121°C. Foi pesado 10g da amostra, após a mistura das amostras de solo, e adicionou-se 90 mL de solução salina 0,85% (m/m), sob agitação periódica. Após 30 minutos da preparação da solução de extração, na capela foi realizada a diluição em série, onde foi retirada uma alíquota de 1,0 mL do sobrenadante da extração da amostra, inserido no erlenmeyer contendo 9,0 mL de solução salina 0,85% (m/m) e, posteriormente, agitado, realizando a diluição até 10^{-6} (CAVALCANTI, 2016). No esquema representado na Figura 4.5, pode-se observar melhor como esse processo foi executado.

Figura 4.5 – Esquema do método da diluição seriada



Fonte: GERALDO; FILHO (2017)

4.2. Análises de solo

A medida do potencial hidrogeniônico (pH) das amostras foi determinada através de medidas diretas em um potenciômetro digital, previamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0 (IAL, 2008). Para análise da umidade, primeiramente os pesos secos das placas de Petri foram determinados. As placas foram colocadas para secagem a 105°C em uma estufa, e 24 horas depois as mesmas foram retiradas e colocadas para resfriamento em dessecador durante 20 minutos. Após isso, as mesmas foram pesadas em balança analítica. Em seguida, as amostras foram pesadas nas placas de Petri. Posteriormente, as placas contendo as amostras de solo foram colocadas em estufa a 105°C durante 24 horas. Após isto, foram retiradas, deixadas em dessecador para resfriamento durante 20 minutos e, logo após, às placas contendo as amostras de solo seco foram pesadas para determinação do peso seco da amostra (IAL, 2008).

4.2.1. Análise de pH

Foram medidos o pH das amostras com o auxílio de um pHmetro digital, presente no laboratório de bioengenharia. Para realizar a análise foi pesado 10g de solo e adicionou 40 mL de água destilada, a análise foi realizada em triplicata após a calibração do equipamento.

4.2.2. Análise de umidade

Essa análise foi realizada em triplicata, primeiramente pesou-se e identificou três placas de petri vazias na balança analítica, após isso foi pesado 3g de solo e levado à estufa sob uma temperatura média de 100°C. Após 24h, as amostras foram levadas para o dessecador de sílica gel até atingir temperatura ambiente e pesadas em seguida. O procedimento seguiu a metodologia retratada pelo Instituto Adolf Lutz (2008).

A humidade foi determinada pela diferença entre a massa de solo pesada antes e depois do processo de secagem.

4.3. Isolamento

Esta etapa consiste em isolar os microrganismos presentes no solo rizosférico através do plaqueamento usando as soluções, oriundas da diluição seriada, como fonte de microrganismos.

4.3.1. Plaqueamento

Para este procedimento foram preparados os meios de cultivo de ágar nutriente (AN) e ágar batata-dextrose (BDA) para o crescimento de bactérias e fungos, respectivamente. O meio AN foi preparado de acordo com as instruções presentes no seu rótulo, 28g para 1 L de água destilada; o meio de BDA foi preparado a partir da extração do caldo da batata de acordo com as instruções da literatura: Foi descascada uma batata inglesa (*Solanum tuberosum*) e a cortou em cubos, após lavá-las pesou 200g. Em um béquer de plástico, a batata foi cozida no microondas por um tempo médio de 15 minutos, em seguida foi extraído o caldo da batata cozida e filtrado duas vezes, garantindo assim que não haja nenhuma parte sólida, em uma peneira. Em uma balança analítica pesou-se a dextrose e o ágar que, conseqüentemente, foram adicionados ao caldo, a mistura foi aquecida no microondas para homogeneização.

Tabela 4.1 – Formulação do meio ágar, batata, dextrose (BDA)

COMPOSTOS	QUANTIDADES
Ágar	15 g
Caldo de batata (200g de batata para 1L de água destilada)	1L
Dextrose (glicose)	15g

Fonte: Protocolo da EMBRAPA (1999)

Tabela 4.2 – Formulação do meio ágar, nutriente (AN)

COMPOSTOS	QUANTIDADES
Ágar	15 g/L
Cloreto de sódio (NaCl)	5 g/L
Extrato de carne	1 g/L
Extrato de levedura	2 g/L
Peptona	5 g/L

Fonte: KASVI (2020)

Após esterilização, aquecimento e meios em estado líquido, estes foram distribuídos em placas de petri 20 mL em cada. Depois que o meio solidificou, foram tomadas alíquotas de 0,1 mL de cada diluição para realizar o plaqueamento, em triplicata. Foi utilizada a técnica semeadura em superfície, onde espalha-se a amostra em movimentos na forma de oito, somente após a solidificação do meio.

Enfim, às placas foram identificadas e incubadas por cerca de 24h para bactérias (meio de cultivo AN) e 5 dias para fungos e leveduras (meio de cultivo BDA) em estufa a uma temperatura ambiente de 31°C.

Após o período de incubação, observou-se as placas admitindo para o isolamento todas as colônias que apresentaram morfologias diferentes. Foi realizado repique dos isolados, em triplicata, nos mesmos meios de cultivo utilizados anteriormente.

O processo de repique, para as bactérias, foi realizado pelo método do esgotamento que se dá pela transferência de uma alçada da colônia a ser isolada para uma nova placa. Neste mesmo processo, para os fungos, foram feitos toques distribuídos nas placas de isolamento.

Após o repique, os microrganismos foram incubados nas mesmas condições anteriormente citadas.

4.3.2. Manutenção dos microrganismos isolados

Após o isolamento, as placas de petri contendo colônias isoladas de microrganismos foram hermeticamente fechadas e armazenadas nos refrigeradores do laboratório em uma temperatura aproximada de $5\pm 1^{\circ}\text{C}$, sendo repicados a cada 45 dias para um novo meio de cultura.

Mesmo tomando todos os cuidados no manuseio dos microrganismos, as bactérias TB1 e TB2 e o fungo TF2 não foram capazes de sobreviver em laboratório.

4.4. Seleção

A seleção dos microrganismos aconteceu diante dos resultados de 2 testes experimentais. Os microrganismos foram submetidos a testes e avaliados quanto a produção

de ácido indol-3-acético; também foram avaliados quando à capacidade fixar o nitrogênio atmosférico.

4.4.1. Produção de ácido indol-3-acético (AIA)

4.4.1.1. Produção de AIA por bactérias

Para a avaliação das bactérias isoladas em relação a produção de ácido indol-3-acético (AIA) in vitro foi utilizada uma metodologia adaptada de Cavalcanti (2016) e Braga (2016).

Foi feita a inoculação de cada bactéria em 5 mL de meio líquido de caldo nutriente e foram incubadas sob agitação constante para a produção de um pré-inóculo. Após um período de 24h, alíquotas de 1 mL foram inoculadas em meio líquido de caldo nutriente, suplementado com e sem triptofano, em triplicata, e incubadas sob agitação constante de 140 rpm a 30°C durante 7 dias.

Após os 7 dias, a densidade óptica das culturas foi avaliada em espectrofotômetro a 540 nm, ajustando-se a sua concentração para $DO_{540} = 0,5$. Após o ajuste da DO_{540} , alíquotas de 3 mL foram centrifugadas durante 3 min a 6000 rpm.

Uma alíquota de 1 mL do sobrenadante, obtido da incubação, foi adicionada à 0,5 mL de reagente de Salkowski [2% de cloreto férrico $FeCl_3$ 0,5 mol/L em 35% de ácido perclórico $HClO_4$] e esta mistura foi incubada no escuro durante 30 minutos. Posteriormente foi efetuada a leitura óptica das amostras no espectrofotômetro a 540 nm para a avaliação da concentração de AIA produzido.

4.4.1.2. Produção de AIA por fungos

Os fungos isolados foram previamente cultivados em placas de Petri contendo o meio BDA (Ágar, Batata e Dextrose) por 7 dias a 31 °C aproximadamente. Para a avaliação quantitativa da produção de AIA foram retirados do meio BDA, quadrados de aproximadamente 0,5 cm de lado contendo o micélio e os esporos do fungo, e transferidos para um Erlenmeyer de 250 mL contendo 10 mL do meio líquido FAN (FAN, 2002) com o pH entre 5,9 – 6,1.

Tabela 4.3 - Composição do Meio FAN

COMPONENTE	FRAÇÃO
Extrato de levedura	3 g/L
Fosfato dipotássico K_2HPO_4	0,6 g/L
Glicose	20 g/L
Sulfato de magnésio $MgSO_4$ 0.3g/L	0,3 g/L

Fonte: FAN, 2002.

O teste foi realizado na ausência e na presença de triptofano no meio líquido. A concentração de triptofano utilizado foi de 100 mg/L.

Após sete dias de crescimento sob um agitador rotatório (140 rpm) a 31 ± 2 °C, uma alíquota de 2 mL do meio foi centrifugada a 12.000 rpm por durante 15 minutos.

Para a análise colorimétrica de AIA (GORDON & WEBER, 1951), uma alíquota de 1 mL do sobrenadante foi retirada e misturada a 0,5mL do reagente de Salkowski [2% de cloreto férrico $FeCl_3$ 0,5 mol/L em 35% de ácido perclórico $HClO_4$]. Esta mistura foi incubada no escuro durante 30 minutos, e após esse período, foi realizada a leitura óptica das amostras no espectrofotômetro a 540 nm para que se avalie a concentração de ácido indol-3-acético sintetizado.

As concentrações, em $\mu g/mL$ foram calculadas a partir de uma curva padrão com concentrações conhecidas do ácido indol-3-acético.

4.4.2. Fixação do nitrogênio atmosférico

4.4.2.1. Fixação do nitrogênio atmosférico por fungos

Os fungos isolados no meio ágar batata dextrose foram submetidos ao teste de fixação de nitrogênio atmosférico através do repique no meio semi seletivo NFb, método adaptado de Döbereiner et al., 1995. Livre de compostos nitrogenados, o meio deve selecionar somente os microrganismos que possuem a capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico.

Os microrganismos foram repicados no meio NFb, formulação na tabela 4.4, incubados a 31°C, por sete dias. Os experimentos foram realizados em triplicata, o resultado positivo é caracterizado pelo halo de crescimento do microrganismo. As culturas que apresentaram crescimento foram submetidas ao segundo repique de confirmação, desse modo,

é eliminado a possibilidade de haver o aproveitamento residual de nitrogênio contidos nas células, provenientes de cultivos anteriores. Assim, aqueles que apresentarem crescimento no segundo repique no meio livre de compostos nitrogenados possuem a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico.

Tabela 4.4 - Composição do meio NFb para fungos.

COMPOSTO	PROPORÇÃO
Ácido Málico	5 g/L
Ágar	20 g/L
Azul de Bromotimol, 0,5 % em 0,2 M de KOH	2 ml/L
Cloreto de Cálcio Dihidratado, 1% P/V	2 ml/L
Cloreto de Sódio, 10% P/V	1 ml/L
EDTA de Ferro, 1,64% P/V	4 ml/L
Fosfato de sódio dibásico, 10% P/V	5 ml/L
Hidróxido de Potássio, 10% P/V	4,5 g/L
Solução de Micronutrientes para Meio de Cultura	1 ml/L
Solução de Vitamina para Meio de Cultura	1 ml/L
Sulfato de magnésio hepta hidratado, 10% P/V	2 ml/L

Fonte: Adaptado de Döbereiner et al. (1995)

Tabela 4.5 - Composição da solução de micronutrientes.

COMPOSTO	PROPORÇÃO para 200 mL
Ácido bórico	0,28 g
Molibdato de sódio	0,2 g
Sulfato de cobre	0,008 g
Sulfato de manganês	0,235 g
Sulfato de zinco	0,024 g

Fonte: Protocolo da EMBRAPA (1999)

Tabela 4.6 - Composição da solução de vitaminas.

COMPOSTO	PROPORÇÃO PARA 100 mL
Biotina	10 mg
Piridoxina	20 mg

Fonte: Protocolo da EMBRAPA (1999)

4.4.2.2. Fixação de Nitrogênio atmosférico por bactérias.

As bactérias isoladas no meio ágar nutriente foram submetidas ao teste de fixação de nitrogênio atmosférico através do repique no meio semi seletivo NFb, método adaptado de Döbereiner et al., 1995.

Os microrganismos foram repicados no meio líquido NFb, formulação na tabela 4.7, incubados a 28°C e agitação de 140 rpm, por 8 dias.

Os experimentos foram realizados em triplicata, o resultado positivo é caracterizado pela turvação do meio de cultura indicando o crescimento do microrganismo.

Tabela 4.7 - Composição do meio NFb para bactérias.

COMPOSTO	PROPORÇÃO
Ácido Málico	5 g/L
Azul de bromotimol, 0,5%	2 ml/L
Cloreto de Cálcio Dihidratado	0,01 g/L
Cloreto de sódio	0,1 g/L
EDTA de Ferro, 1,64% P/V	4 ml/L
Fosfato de potássio	0,5 g/L
Solução de Micronutrientes para Meio de Cultura	1 ml/L
Sulfato de magnésio	0,2 g/L

Fonte: Adaptado de Döbereiner et al., 1995.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise do solo

Para a análise do pH foi obtido o valor de 6,6 sendo a média das medições analisadas, demonstrando assim, que o solo está numa faixa de pH neutro, sendo ideal para o crescimento e desenvolvimento de bactérias.

Foram obtidos os percentuais de umidade do solo, observou-se uma baixa umidade, a média dos percentuais foi de 3,44%. Esses resultados demonstram que os microrganismos isolados conseguem se desenvolver em solos secos, com baixa umidade e estresses hídricos.

5.2. Isolamento

No total foram isolados 13 microrganismos, sendo 5 bactérias e 8 fungos. Na tabela 5.8 abaixo estão listados os microrganismos isolados do solo rizosférico do tamboril.

Tabela 5.8 - Lista de Microrganismos isolados

FUNGOS ISOLADOS							
TF1	TF2	TF3	TF4	TF5	TF7	TF8	TF9
BACTÉRIAS ISOLADAS							
TB1	TB2	TB3	TB4	TB5			

Os microrganismos isolados receberam um nome genérico. Para os fungos a nomenclatura adotada foi o prefixo TF e um sufixo numérico, para as bactérias o prefixo usado foi o TB mais o sufixo numérico.

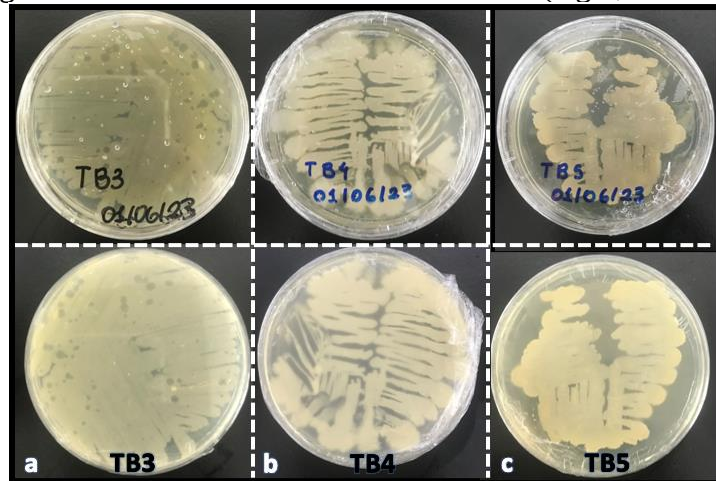
5.2.1. Isolamento de bactérias

Foram escolhidas para o isolamento às placas contendo as diluições 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} , pois observou-se algumas repetições na morfologia nestas diluições. Por manifestar uma diversidade de colônias estas diluições foram escolhidas, não correndo o risco, assim, de

contaminação. Foram isoladas em meio líquido de ágar nutriente 5 bactérias, todas apresentaram morfologias diferentes.

Abaixo na Figura 5.6 estão as fotografias das bactérias TB3, TB4 e TB5.

Figura 5.6 - Bactérias isoladas em meio AN (Ágar, Nutriente)



5.2.2. Isolamento dos fungos

Para o isolamento foram escolhidas as placas contendo as diluições 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} , foram encontradas morfologias diferentes nestas diluições. Por manifestar uma diversidade de colônias e uma distância significativa entre elas para que não houvesse risco de contaminação. Com o meio BDA, foi possível isolar 8 fungos, foram isoladas todas as colônias que apresentaram morfologias diferentes. A Figura 5.7 apresenta a fotografia das colônias dos fungos isolados.

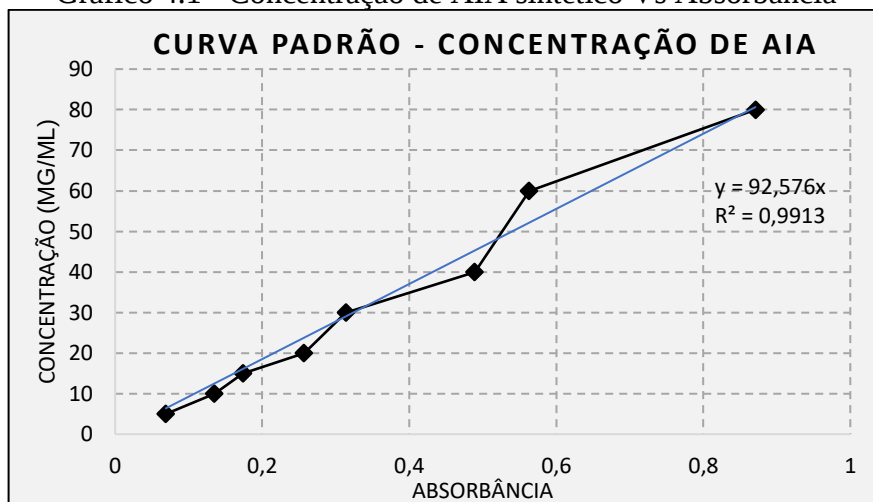
Figura 5.7 - Fungos isolados em meio BDA (Ágar, batata, dextrose)



5.3. Produção de Ácido indol-3-acético

Foi construída uma curva a partir da mistura de AIA sintético e água destilada, as concentrações utilizadas foram: 80, 60, 40, 30, 20, 15, 10 e 5 microgramas de ácido indol-3-acético por mililitros de água.

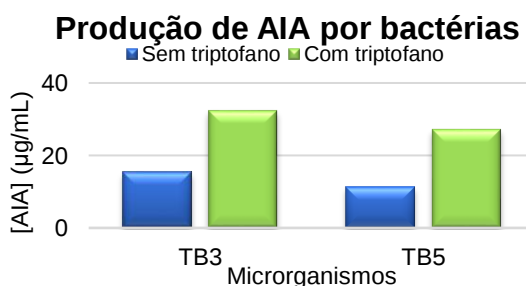
Gráfico 4.1 - Concentração de AIA sintético Vs Absorbância



5.3.1. Produção de AIA por bactérias

Das 5 bactérias isoladas, 2 apresentaram a produção de AIA. Os resultados apresentados abaixo são os valores médios obtidos nos testes realizados em triplicata. A concentração de AIA menor que 1 µg/mL é considerado baixa produção, 1- 10µg/mL média produção, 11-50 µg/mL alta produção e maior que 51 µg/mL elevada produção (KAVAMURA et al, 2013), desse modo, temos que as bactérias TB3 e TB5 apresentaram uma alta produção de AIA, conforme mostrado no gráfico 5.2 abaixo.

Gráfico 5.2 - Produção média de AIA das bactérias isoladas do Tamboril



Os resultados obtidos nestes testes em relação a produção de ácido indol-3- acético (AIA) são similares aos apresentados por Albdaawi (2019) onde produziram os níveis mais elevados de concentrações de AIA, através de bactérias isoladas do solo retirado de plantas de trigo duro, cultivados em solos com altas concentrações de sais. Dessa forma, pode-se observar que as bactérias isoladas apresentaram um alto potencial na produção de AIA e a promoção de crescimento vegetal.

A síntese desta auxina pode ser influenciada pelas condições de cultura, estágio de crescimento e disponibilidade de substrato (MIRZA et al, 2001). Assim podemos observar que as bactérias intituladas TB3 e TB5 expressaram uma alta produção de ácido indol-3- acético. A bactéria TB3 apresentou uma produção aproximada de 15,36 µg/mL de AIA sem a suplementação do triptofano e 32,31 µg/mL de AIA com a suplementação do triptofano; a bactéria TB5, nos meios sem suplementação e com suplementação de triptofano respectivamente, apresentou uma produção aproximada de 11,28µg/mL e 27,18µg/mL. As demais bactérias isoladas e avaliadas obtiveram uma produção de AIA quase insignificante.

No seu estudo de bactérias endofíticas e rizosféricas associada ao *Paspalum atratum*, Paula et al. (2022), isolou bactérias rizosféricas do gênero *Pseudomonas* onde a produção de AIA variou entre 24,39 e 65,12 g/mL.

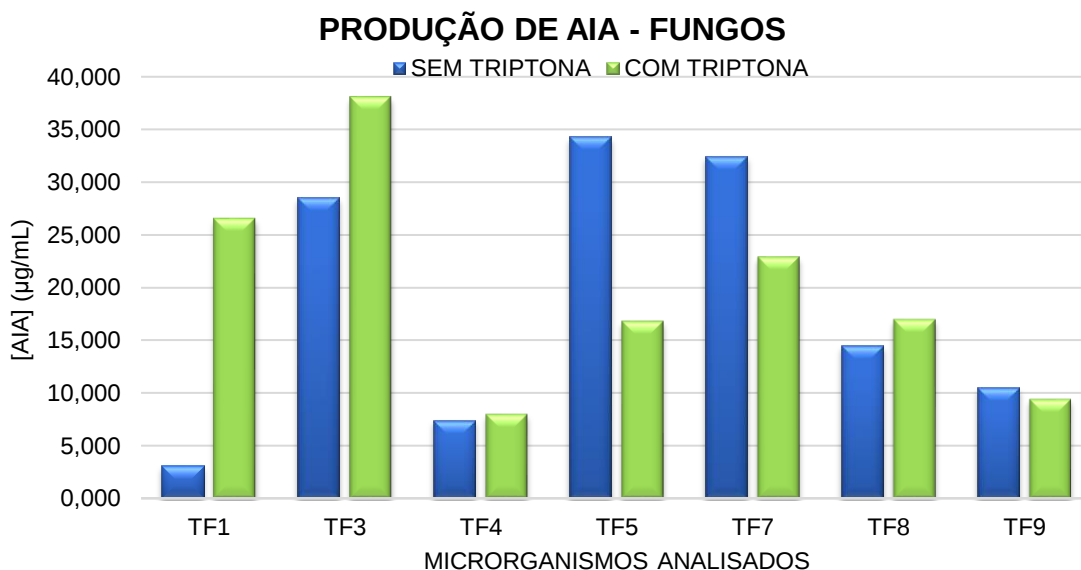
Foram detectadas concentrações de AIA, em inoculantes comerciais, de 6,62 e 13,16 µg/mL para *Bradyrhizobium japonicum* E109 e *Azospirillum brasilense* Az39, respectivamente, as bactérias isoladas no presente estudo apresentaram síntese semelhante e superior aos identificados por CASSAN (2009) e PAULA (2022).

5.3.2. Produção de AIA por fungos

Os fungos isolados foram submetidos aos testes de produção de AIA e todos eles apresentaram resultados promissores nos testes. Os resultados apresentados abaixo são os valores médios obtidos nos testes realizados em triplicata. Para os testes realizados sem a presença da triptofano, a produção de AIA, pelos fungos, variou significativamente entre 3,086µg/mL para os testes com o fungo TF1 e 34,253µg/mL para o fungo TF5. Para os testes realizados na presença da triptona, a produção de AIA, variou consideravelmente entre 8,054µg/mL para os testes com o fungo TF4 e 38,049µg/mL para o fungo TF3. Todas as

produções de AIA se caracterizaram com sendo produções elevadas. O gráfico 5.3 abaixo ilustra os resultados obtidos nos testes experimentais.

Gráfico 5.3 - Produção média de AIA dos fungos isolados do Tamboril



5.4. Fixação de nitrogênio atmosférico

A avaliação foi feita visualmente e, como resultado positivo, a formação de uma película aerotáxica típica próxima à superfície do meio, indicando que a fixação de nitrogênio ocorreu, uma vez que há redução do nitrogênio atmosférico em amônia (Dobereiner, Baldani e Baldani, 1995)

Durante o período de 8 dias incubação notou-se um crescimento lento e atípico, quando comparado ao crescimento desses mesmos microrganismos em meio ágar nutriente (bactérias) e em meio ágar-batata-dextrose (fungos). Os resultados dos experimentos são apresentados nas tabelas 10 e 11, onde o sinal positivo (+) representa o crescimento e o sinal negativo (-) representa o não crescimento do microrganismo repicado.

5.4.1. Fixação do nitrogênio atmosférico por fungos

Dos 7 fungos isolados, apenas o fungo TF7 não foi submetido ao teste pois, durante o período de realização dos testes, a placa contendo este fungo apresentou contaminação externa advinda, provavelmente, do contato com outros microrganismos mantidos sob

refrigeração no mesmo refrigerador. Só foi possível realizar novamente o isolamento do fungo TF7 após o período de realização dos testes de fixação do nitrogênio atmosférico. As figuras 5.8 e 5.9 são fotografias dos meios de cultura NFb sólido após o período de incubação. Os círculos brancos tracejados indicam o local do meio de cultura em que ocorreu o repique e o crescimento do microrganismo.

Figura 5.8 - Primeiro repique de fungos em meio sólido NFb

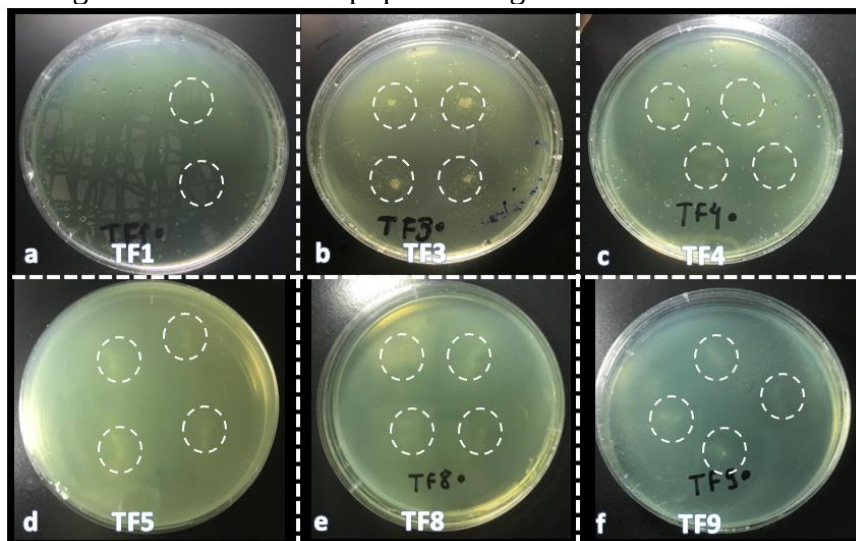
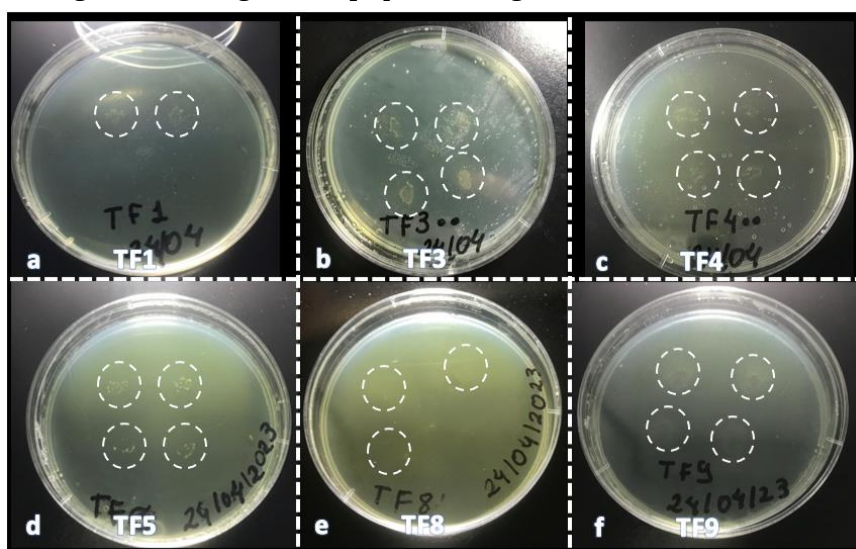


Figura 5.9 - Segundo repique de fungos em meio sólido NFb



Em alguns casos o crescimento dos fungos foi tão pequeno que fica praticamente imperceptível na fotografia.

Tabela 5.9 - Crescimento dos fungos em meio NFb

	ISOLADOS						
	TF1	TF3	TF4	TF5	TF7	TF8	TF9
1° REPIQUE	+	+	+	+	XXX	+	+
2° REPIQUE	+	+	+	+	XXX	+	+

5.4.2. Fixação do nitrogênio atmosférico por bactérias

Durante o período de incubação observou-se que, mesmo sob agitação constante de 140 rpm, o crescimento bacteriano ocorreu de forma sedimentada no fundo do tubo de ensaio. O indicativo do crescimento bacteriano no meio líquido é caracterizado pela turvação do meio de cultura, o que só pôde ser constatado após agitação do meio.

Figura 5.10 - Primeiro repique de bactérias em meio líquido NFb

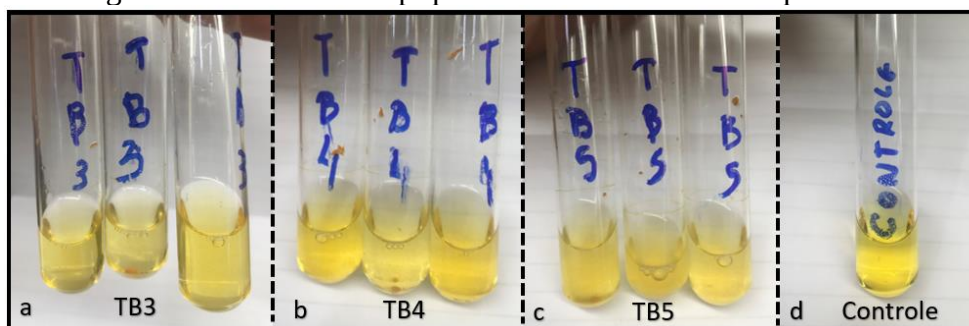


Figura 5.11 - Segundo repique de bactérias em meio líquido NFb

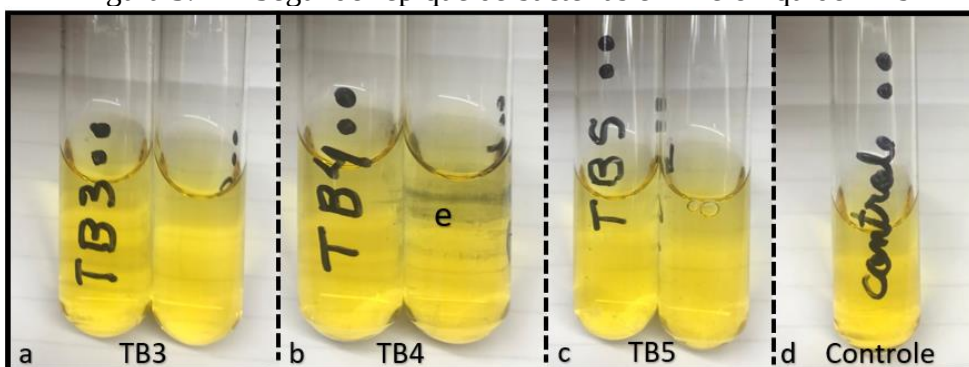


Tabela 5.10- Crescimento das bactérias no meio NFb.

	ISOLADOS		
	TB3	TB4	TB5
1° REPIQUE	+	+	+
2° REPIQUE	+	+	+

6. CONCLUSÕES

A metodologia utilizada na etapa de isolamento dos microrganismos se mostrou bastante eficaz, considerando que foi possível o isolamento de 5 bactérias e 8 fungos rizosféricos.

Em relação a manutenção dos meios de cultura contendo os fungos e bactérias isolados, nota-se que o repique a cada 60 dias é eficaz na manutenção desses microrganismos em laboratório; nota-se também que podem ocorrer contaminações microbiológicas nos meios de cultura caso não sejam armazenados com uma vedação adequada das placas.

Para a produção de ácido indol-3-acético as bactérias TB3 e TB5 apresentaram um alto nível de produção, tanto na presença quanto na ausência de triptofano. Quanto aos fungos, 100% deles apresentaram resultados promissores na produção dessa auxina. Os fungos TF3, TF5, TF7 e TF8 apresentaram uma alta produção de AIA em meio suplementado e não suplementado por triptofano; o fungo TF1 apresentou uma alta produção de AIA apenas no meio com suplementação de triptofano.

Em relação aos testes de fixação do nitrogênio atmosférico, todos os fungos e bactérias foram capazes de crescer no meio NFb. O crescimento lento desmedrado desses microrganismos neste meio de cultura indicam que eles conseguem fixar o N₂ presente na atmosfera terrestre.

Diante do exposto e com base nos resultados dos testes experimentais, pode-se inferir que diversos microrganismos isolados da rizosfera do Tamboril, podendo ser citados os fungos TF3, TF5, TF7 e TF8 e as bactérias TB33 e TB5, apresentam características de microrganismos promotores de crescimento vegetal.

REFERÊNCIAS

AMBIENTAL, V. Mudanças de Tamboril (UND). Disponível em: <<https://www.viveiroambiental.com.br/produto/mudas-de-tamboril-und>>. Acesso em: 21 out. 2023.

ANTONGIOVANNI, Manina. Conservação da Biodiversidade da Caatinga: desafios e oportunidades. Disponível em: <<https://www2.camara.leg.br/atividade-legislativa/comissoes/comissoes-permanentes/cmads/apresentacoes-em-eventos/apresentacoes-de-convidados-em-eventos-de-2023-1/26-04-2023-situacao-atual-e-perspectivas-do-bioma-caatinga/carlos-fonseca-universidade-federal-do-rio-grande-do-norte-ufrn/view>>. Acesso em out. 2023.

BANDEIRA, A.; ODA, R.; ELIS, S. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://d3uyk7qgi7fgpo.cloudfront.net/lms/modules/materials/maratona-biologia-Fitorm%C3%B4nios-25-09-2017-c7c1ee8217b92e83af4b99e9720210ac.pdf>>.

BELLENGER, J. P.; WICHARD, T.; XU, Y.; KRAEPIEL, A. M. L. Essential metals for nitrogen fixation in a free-living N₂ bacterium: chelation, homeostasis and high use efficiency. *Environmental Microbiology*, v. 13, n. 6, p. 1395-1411, 2011.

BRASIL – Ministério do Meio Ambiente. Caatinga. Disponível em: Acesso em: Abril. 2023.

CASSÁN, Fabricio; VANDERLEYDEN, Jos; SPAEPEN, Stijn. Physiological and Agronomical Aspects of Phytohormone Production by Model Plant-GrowthPromoting Rhizobacteria (PGPR) Belonging to the Genus *Azospirillum*. *Journal Of Plant Growth Regulation*, [s.l.], v. 33, n. 2, p.440-459, 10 ago. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00344-013-9362-4>.

CAVALCANTI M I P, Seleção de bactérias promotoras de crescimento em milho cultivado no semiárido obtidas por diferentes estratégias de isolamento. 2016. 109p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal da Paraíba. Campina Grande – PB. 2016 C

Ciclo do nitrogênio e suas reações – ILSA. Disponível em: <<https://ilsabrasil.com.br/ciclo-do-nitrogenio-e-suas-reacoes/>>.

COELHO et al. Potencial de Fungos da Caatinga para Produção de Enzimas Amilolíticas. *Revista Saúde e Ciência online*, v. 7, n. 2, (maio a agosto de 2018). 502 p.

Döbereiner, J., Baldani, V.L.D. and Baldani, J.I. (1995) Como Isolar e Identificar Bactérias Diazotróficas de Plantas não-Leguminosas. Embrapa-SPI, Itaguaí.

EMBRAPA. Inoculantes: o que são e qual é a utilidade na agricultura. Canal agro, 2019. Disponível em: . Acesso em: 23 ago. 2023.

FERNANDES IK L, Riqueza de espécies e facilitação influenciando o aporte de serrapilheira em uma área restaurada da Caatinga. 2022. 33f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ecologia), Departamento de Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2022.

GERALDO, R.; FILHO, S. Disciplina de Microbiologia Ensino Remoto Curso de Nutrição -Integral Professor Ministrante: Aula: Métodos de Contagem de Bactérias. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.unirio.br/ccbs/dmp/nutricao-integral/aulas-teoricas-pdf/Aula%2017%20Metodos%20de%20Contagem%20Bacteriana.pdf>>.

GORDON SA, WEBER RP, Colorimetric estimation of indoleacetic acid. Plant Physiology. Lancaster, v.26 p. 192-195, 1951.

HOFFMANN, L. Biologia molecular da fixação biológica do nitrogênio. In: SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. (Ed.). Microbiota do solo e qualidade ambiental. Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas, 2007. p. 153-164

IAL, Instituto Adolfo Lutz (São Paulo). Métodos físico-químicos para análise de alimentos/ coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea -- São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008 p. 1020

Isolamento e Potencial Uso de Bactérias do Gênero Bacillus na Promoção de Crescimento de Plantas em Condições de Défi cit Hídrico. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1114738/1/bol192.pdf>>. Acesso em: 21 out. 2023.

JUNIOR, Michael J. Pelczar et al. Microbiologia - Conceito e Aplicações. 2. ed. atual. [S. l.]: Makron Books, 1996. 517 p. v. 2. ISBN 9788534604543.

KANCHISWAMY, C. N. et al. Bioprospecting bacterial and fungal volatiles for sustainable agriculture. Trends in Plant Science, v. 20, n. 4, p. 206-211, 2015.

KAVAMURA, Vanessa Nessner et al. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. Microbiological Research, v. 168, n. 4, p. 183-220, 2013 Tradução . . Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.12.002>. Acesso em: 20 out. 2023.

KOZUSNY-ANDREANI, Dora Inés; AGIADO, Julio César; ANDREANI JUNIOR, Andreani Junior. EFEITO DE BACTÉRIAS RIZOSFÉRICAS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DA CENOURA. Revista da Universidade Vale do Rio Verde, [s.l.], p.211-220, 2014. Universidade Vale do Rio Verde (UninCor). <http://dx.doi.org/10.5892/ruvrd.v12i1.1368>.

LARIMER, F. W.; CHAIN, P.; HAUSER, L.; LAMERDIN, J.; Malfatti, S.; DO, L.; LAND, M. L.; PELLETIER, A. D.; BEATTY, J. T.; LANG, A. S.; TABITA, F. R.; GIBSON, J. L.; HANSON, T. E.; BOBST, C.; TORRES, J. L.; PERES, C.; HARRISON, F.

H.; GIBSON, J.; HARWOOD, C. S. Complete genome sequence of the metabolically versatile photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Nature Biotechnology*, v. 22, n. 1, p. 55-61, 2004.

LEMOS, M. J. Resposta de cultivares de trigo à inoculação em sementes com *Azospirillum brasilense* e à adubação nitrogenada em cobertura. 2011. 62 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon.

LORENZIH, Árvore Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. v. 01, p. 177, 1998.

MASSENSINI, A.M., TÓTOLA, M.R., BORGES, A.C., COSTA, M.D., 2016. Isolamento e caracterização de bactérias solubilizadoras de fosfato da rizosfera de *Eucalyptus* sp. *Rev. Árvore*, n.1, p.125-134.

O ECO. Caatinga brasileira, notável e desconhecida - Outras Palavras. Disponível em: <<https://outraspalavras.net/outrasmidias/caatinga-brasileira-notavel-e-desconhecida/>>. Acesso em: 21 out. 2023.

PATTEN, Cheryl L.; GLICK, Bernard R.. Bacterial biosynthesis of indole-3- acetic acid. *Canadian Journal Of Microbiology*, [s.l.], v. 42, n. 3, p.207-220, mar. 1996. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/m96-032>.

PRINSEN, et al. 1993. Biossíntese do ácido indol-3-acético do *Azospirillum brasilense*: evidências para uma via não dependente de triptofano . *Mol PlantMicrobe Interact*. 6: 609–615

RAVEN PH, EVERT FR, EICHHORN SE. *Biologia Vegetal*, 6ª ed. Guanabara Koogan, p. 708-713. 2001.

ROSENBLUETH, M., MARTINEZ-ROMERO, E. (2006) Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol. Plant Microbe Interact*. 19, 827–837.

SANTOS, Jennie Kéllyn da Silva; SANTANA, Marcos Diones Ferreira; LARA, Túlio Silva. Responsividade de plantas de milho à inoculação com fungos micorrízicos arbusculares da rizosfera de ipê amarelo. *Revista Agroecossistemas*, [S.l.], v. 10, n. 1, p. 253-264, nov. 2018. ISSN 2318-0188. doi:<http://dx.doi.org/10.18542/ragros.v10i1.5072>.

SILVEIRA RB, MELLONI R, PEREIRA EG, Atributos microbiológicos e bioquímicos como indicadores da recuperação de áreas degradadas, no sul de Minas Gerais. *Revista Acadêmica: Ciência Animal*, [s.l.], v. 2, n. 2, p. 21-29, 15 abr. 2004.

STROSCHEIN, Marcos Roberto Dobler et al. Caracterização e influência de rizóbios isolados de alfafa na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de arroz. *Ciência Rural*, [s.l.], v. 41, n. 10, p.1738-1743, out. 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782011001000010>.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
TONINI, H.; ARCO-VERDE, M.F. O Jatobá (*Hymenaea courbaril* L.); crescimento, potencialidades e usos. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2003. 36 p.

VRIEZE J, The littlest farmhands. Science, [s.l.], v. 349, n. 6249, p. 680-683, American Association for the Advancement of Science (AAAS). 13 ago. 2015.