

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 01/02/2021.



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



Produção de ácido indol-3-acético e fitases por fermentação em estado sólido e aplicação em *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*

DÉBORA ZANONI DO PRADO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutora no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Área de concentração Bioprocessos.

Prof^a Dr^a Luciana Francisco Fleuri

BOTUCATU - SP

2019



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Produção de ácido indol-3-acético e fitases por fermentação em estado sólido e aplicação em *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*

DÉBORA ZANONI DO PRADO

ORIENTADORA: Prof^ª Dr^ª Luciana Francisco Fleuri

CO-ORIENTADORAS: Prof^ª Dr^ª Giuseppina Pace Pereira Lima

Prof^ª Dr^ª Magali Ribeiro da Silva

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutora no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Área de concentração Bioprocessos.

BOTUCATU - SP

2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Prado, Débora Zanoni do.

Produção de ácido indol-3-acético e fitases por
fermentação em estado sólido e aplicação em *Eucalyptus*
grandis x *E. urophylla* / Débora Zanoni do Prado. - Botucatu,
2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Luciana Francisco Fleuri
Coorientador: Magali Ribeiro da Silva
Coorientador: Giuseppina Pace Pereira Lima
Capes: 20802005

1. *Aspergillus*. 2. *Bacillus* (Bactéria). 3. *Trichoderma*.
4. Reguladores de crescimento de planta. 5. Enzimas.

Palavras-chave: *Aspergillus*; *Bacillus*; *Trichoderma*;
enzimas; fitohormônio.

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese ao meu avô, Ovídio Zanoni, pelos ensinamentos inestimáveis ao longo da vida. Há sempre tempo para aprender e se reinventar.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proporcionar o dom da vida.

A minha família, Marta, Luiz Fernando, Gilberto, Jacira e Ovídio (*in memorian*), meu alicerce, por moldarem o meu caráter e serem sempre exemplos de honestidade e persistência.

A minha orientadora, Prof^a Dr^a Luciana Francisco Fleuri, por ter me apresentado à área de bioprocessos pela qual sou apaixonada, pela disponibilidade e entusiasmo constantes em discutir os eventuais problemas e soluções deste trabalho e, sobretudo, pela confiança ao longo desses anos.

A minha co-orientadora e mãe científica, Prof^a Dr^a Giuseppina Pace Pereira Lima, por quem tenho profunda admiração e em quem me espelho desde o segundo ano de graduação.

A minha co-orientadora, Prof^a Dr^a Magali Ribeiro da Silva, pelo cuidado na elaboração da parte experimental em viveiro, pela atenção e pelo olhar diferenciado, que muito agregaram ao trabalho.

To my supervisor, Professor Jutta Ludwig-Müller, example of human being and professional, for accepting my internship in her lab in Dresden, for the opportunity of knowing a new country and an amazing research group, for all the knowledge in molecular biology and in the writing of scientific articles.

Ao meu namorado, Antônio Guilherme, por tornar a vida mais divertida e por acreditar no meu potencial como profissional mesmo quando eu mesma não acredito.

À família que formei em Botucatu. À Julia, pela amizade rara. À Cintia, pela sintonia inexplicável. À Patrícia, pelo companheirismo de todas as horas. Ao Eduardo, pelas reflexões profundas e filosóficas.

Aos amigos do Laboratório de Bioprocessos, Milene, Samara, João, Paulo, e, principalmente à Clarissa, pelo convite para integrar este grupo tão especial, pela forte amizade e parceria

profissional tão produtiva e à Mirella, pelo suporte emocional e pelo olhar detalhista, criativo e atento nas correções dos artigos.

À equipe do viveiro Avam Flora, por cederem toda a estrutura e a mão-de-obra necessária para a instalação e condução do experimento e à equipe do viveiro da FCA/UNESP- Botucatu, Claudinho, Richardson, Jhuan e Rafael, pelo auxílio no experimento e nas análises.

Às amigas brasileiras que ganhei Dresden, Luiza, Livia e Gabriela, que tornaram a vida no exterior mais leve e divertida.

Ao Prof. Dr. Caio Antonio Carbonari e ao técnico José Roberto Marques Silva, pelas análises em LC-MS/MS sem as quais seria impossível validar os dados deste trabalho.

Aos funcionários da seção de pós-graduação pelo atendimento sempre gentil e eficiente.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES), pelo apoio financeiro no Brasil (código de financiamento 001) e na Alemanha (processo 88881.133019/2016-01).

Sumário

Lista de Tabelas.....	1
Lista de Figuras.....	3
Resumo.....	5
Abstract.....	7
1. Introdução geral.....	9
Capítulo 1: <i>Trichoderma</i> , <i>Bacillus</i> e <i>Aspergillus</i> como micro-organismos promotores de crescimento de plantas (PGPMs): aplicações sustentáveis para a agricultura.....	14
Resumo.....	14
1. Introdução.....	15
2. <i>Bacillus</i> , <i>Trichoderma</i> e <i>Aspergillus</i> como micro-organismos promotores de crescimento de plantas (PGPMs).....	16
2.1. Bioestimulantes.....	16
2.1.1. Auxinas.....	16
2.1.2. Giberelinas.....	19
2.1.3. Citocininas.....	21
2.1.4. Etileno.....	22
2.2. Biofertilizantes.....	24
2.2.1. Micro-organismos fixadores de N.....	24
2.2.2. Micro-organismos disponibilizadores de P.....	25
3. Limitações e desafios.....	27
4. Conclusão e perspectivas futuras.....	28
5. Referências Bibliográficas.....	29
Capítulo 2: <i>Screening</i> de cepas de <i>Aspergillus</i> , <i>Bacillus</i> e <i>Trichoderma</i> e influência das propriedades dos substratos na produção ácido indol-3-acético e fitases por fermentação em estado sólido.....	38
Resumo gráfico.....	38
Resumo.....	39
1. Introdução.....	40
2. Material e métodos.....	41
2.1. Preparação do inóculo.....	41
2.2. Fermentação em Estado Sólido (FES).....	42

2.3. Atividade de fitase.....	42
2.5. Quantificação de ácido indol-3-acético e análogos.....	43
2.6. Quantificação de AIA por cromatógrafo líquido acoplado a espectrômetro de massas (LC-MS/MS)	43
2.7. Características químicas e físicas dos substratos.	44
2.8. Análise estatística.....	44
3. Resultados e discussão.....	44
3.1. Produção de ácido indol-3-acético e derivados.....	44
3.2. Produção de fitases.....	48
3.3. Influência das características dos substratos na produção de auxinas e fitases.....	49
4. Conclusões.....	53
5. Referências Bibliográficas.....	53
Capítulo 3: Desenvolvimento de novo bioestimulante vegetal e aplicação em <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus urophylla</i>	57
Resumo gráfico.....	57
Resumo.....	58
1. Introdução.....	59
2. Materias e métodos.....	60
2.1. Cepas microbianas.....	60
2.2. Preparo do inóculo.....	61
2.3. Quantificação de AIA e derivados.....	61
2.4. Fermentação em Estado Sólido.....	62
2.5. Experimento fatorial.....	62
2.6. Determinação de AIA por cromatógrafo líquido acoplado a espectrômetro de massas (LC-MS/MS)	63
2.7. Preparo dos tratamentos.....	63
2.8. Implantação do experimento.....	64
2.9. Avaliações morfológicas.....	65
2.10. Teste de viabilidade celular.....	66
2.11. Análise estatística.....	66
3. Resultados	66
3.1. Produção de AIA e derivados.....	66
3.2. Produção de AIA e derivados por experimento fatorial.....	68

3.3. Quantificação de ácido indol-3-acético por LC-MS/MS.....	69
3.4. Respostas morfológicas à aplicação do potencial bioestimulante.....	70
3.5. Testes de viabilidade celular.....	73
4. Discussão	74
4.1. Produção de ácido indol-3-acético (AIA) por <i>Aspergillus flavipes</i>	74
4.2. Efeitos do bioestimulante em <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. urophylla</i> (clone IPB2)	75
4.3. Segurança do produto à saúde humana.....	77
4.4. Potencial de Comercialização.....	78
5. Conclusão.....	79
6. Referências Bibliográficas.....	79
Capítulo 4: Influência de <i>Aspergillus niger</i> , produtor de fitases, no desenvolvimento de <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus urophylla</i>	85
Resumo.....	85
1. Introdução.....	86
2. Materiais e métodos.....	87
2.1. Preparação do inóculo.....	87
2.2. Implantação do experimento.....	88
2.3. Avaliações morfológicas.....	89
2.4. Análise estatística.....	89
3. Resultados.....	90
4. Discussão.....	93
5. Conclusão.....	95
6. Referências Bibliográficas.....	96
Atividades complementares: período sanduíche na Universidade Técnica de Dresden (TU Dresden), de julho a outubro de 2017 com auxílio da bolsa PDSE/CAPES.....	99
1. Introdução.....	99
2. Objetivo.....	100
3. Materiais e métodos.....	100
3.1. Extração e quantificação de RNA e DNA.....	100
3.2. qPCR e sequenciamento.....	100
4. Resultados e discussão.....	101
5. Considerações finais.....	104
6. Referências bibliográficas.....	104

Conclusão geral e estudos futuros.....	105
Atividades acadêmicas desenvolvidas durante o doutorado.....	106
Anexo I.....	110

Lista de Tabelas

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Efeitos da aplicação de micro-organismos promotores do crescimento de plantas (PGPM) no desenvolvimento de diversas espécies vegetais.....	17
Tabela 2. Produção de ácido indol-3-acético (AIA) e derivados, por diferentes espécies de micro-organismos dos gêneros <i>Trichoderma</i> , <i>Aspergillus</i> e <i>Bacillus</i>	19
Tabela 3. Produção de giberelinas (GAs), por diferentes espécies de micro-organismos dos gêneros <i>Trichoderma</i> , <i>Aspergillus</i> e <i>Bacillus</i>	20
Tabela 4. Produção de ACC desaminase por micro-organismos dos gêneros <i>Trichoderma</i> , <i>Aspergillus</i> e <i>Bacillus</i>	23
Tabela 5. Produção de fitase (E.C. 3.1.3.8) por diferentes espécies de micro-organismos dos gêneros <i>Bacillus</i> , <i>Trichoderma</i> e <i>Aspergillus</i>	27

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Produção de fitases (U mg ⁻¹ de proteína) e AIA e derivados (µg de ácido indol-3-acético mL ⁻¹) por micro-organismos dos gêneros <i>Aspergillus</i> , <i>Bacillus</i> e <i>Trichoderma</i> , cultivados nos substratos farelo de soja (FS), farelo de trigo (FT), bagaço de mandioca (BM), grãos de destilaria secos com solúveis (DDGS) de sorgo (DS) e DDGS de milho (DM).....	47
Tabela 2. Características físicas e químicas dos substratos farelo de soja (FS), farelo de trigo (FT), bagaço de mandioca (BM), grãos de destilaria secos com solúveis (DDGS) de sorgo (DS) e DDGS de milho (DM).....	50
Tabela 3. Coeficientes de correlação de Pearson entre a produção das biomoléculas auxina e fitase por micro-organismos dos gêneros <i>Bacillus</i> , <i>Trichoderma</i> e <i>Aspergillus</i> e as características dos substratos: macroporosidade (MaP) (%), microporosidade (MiP) (%), porosidade total (PT) (%), retenção de água (RA) (mL/cm ³), condutividade elétrica (EC) (mS/cm ³), pH, proteína bruta (PB) (%), lipídeos (%), hemicelulose (%), celulose (%) e lignina (%)......	51

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Planejamento fatorial para a otimização da produção de AIA e análogos (µg mL ⁻¹) por fermentação em estado sólido utilizando <i>A. flavipes</i> e farelo de soja e modificando as	
---	--

condições do substrato: granulometria das partículas (mm), adição de água (mL) e triptofano (% m/m)69

Tabela 2. Estimativa de efeitos para a produção de auxina ($\mu\text{g mL}^{-1}$) por *Aspergillus flavipes* em farelo de soja.....69

CAPÍTULO 4

Tabela 1. Sobrevivência (%), 30 dias após a implantação do experimento, enraizamento (%), comprimento médio das raízes (cm) e massa fresca média radicular (mg), 40 dias pós-plantio, nos tratamentos com aplicação dos compostos sólido (S) e líquido (L), nas doses 85, 170, 255 e 340 U de fitase por kg de substrato.....90

Tabela 2. Comprimento médio da parte aérea (cm), diâmetro médio do colo (mm), massa seca total (parte aérea e sistema radicular) (g), intensidade de cor verde (SPAD) e número de folhas, 5 meses pós-plantio, nos tratamentos com aplicação dos compostos sólido (S) e líquido (L), nas doses 85, 170, 255 e 340 U de fitase por kg de substrato.....91

Tabela 3. Respostas da interação entre as formas de aplicação, sólida (S) e líquida (L) e as doses de fitase produzida por *A. niger* (85, 170, 255 e 340 U de fitase por kg^{-1} de substrato) na sobrevivência (%), 30 dias pós-plantio, comprimento da parte aérea (cm), diâmetro do colo (cm), massa seca total (g), intensidade de cor verde (SPAD) e número de folhas, 5 meses pós-plantio.....92

Lista de Figuras

INTRODUÇÃO GERAL

- Figura 1. Fluxograma do processo de fermentação em estado sólido para a seleção das combinações com maior produção de auxinas e fitases.....11
- Figura 2. Fluxograma do planejamento experimental, seleção das condições de cultivo e inoculação em *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*.....11

CAPÍTULO 2

- Figura 1. Quantificação em LC-MS/MS de ácido indol-3-acético (AIA) ($\mu\text{g mL}^{-1}$) nos extratos de *B. subtilis* D em farelo de trigo, *T. atroviride* em farelo de soja e *A. niger* 01 em farelo de trigo, com e sem adição de triptofano (Trp) (1% m/m) ao meio.....45

CAPÍTULO 3

- Figura 1. Coleta das estacas de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (clone IPB2) no jardim clonal (A) e plantio das estacas nos substratos contendo o bioestimulante (B).....64
- Figura 2. Mudanças selecionadas para as análises morfológicas (A) e lavagem em água corrente para a total eliminação dos resíduos do substrato (B).....65
- Figura 3. Quantificação de AIA (ácido indol-3-acético) e análogos, produzidos por *A. niger* (01 e INCQS 40015), *A. ustus* (IOC 4410), *A. flavipes* (ATCC 16814), *B. subtilis* (CCGB 0030, B, C, D, E, F e E27), *B. megaterium* (CCGB 0146) e *B. amyloliquefaciens* (CCGB 0145), *T. harzianum* (IOC 3844) e *T. atroviride* (IOC 450)67
- Figura 4. Quantificação de AIA (ácido indol-3-acético) e análogos em extratos provenientes da fermentação em estado sólido de *A. flavipes* (ATCC® 16814™) em farelo de soja, farelo de trigo e DDGS de sorgo.....68
- Figura 5. Produção de ácido indol-3-acético (AIA) por *A. flavipes* cultivado em farelo de soja (0,5 mm) suplementado com 15 mL de água, na presença e ausência de triptofano (1,5%) (A) e cromatograma do extrato com triptofano (MM = 175,187) e os íons secundários gerados (MM = 130,0 e 127,9) (B).....70
- Figura 6. Sobrevivência (%) (A), enraizamento (%) (B), comprimento médio da parte aérea (C), comprimento médio das raízes (D), massa fresca média das raízes (mg) (E) e massa seca média das raízes (F), em resposta aos tratamentos com produto em estado sólido (PES) nas doses 0, 5,

10, 15 e 20 % (m/m) (correspondentes a aplicação de 0, 40, 80, 120 e 160 mg kg⁻¹ de AIA), 40 dias após o plantio.....71

Figura 7. Sobrevivência (%) (A), enraizamento (%) (B), comprimento médio da parte aérea (C), comprimento médio das raízes (D), massa fresca média das raízes (mg) (E) e massa seca média das raízes (F), em resposta aos tratamentos com produto em estado líquido (PEL) nas doses 0, 10, 20, 30 e 40 % (v/m) (correspondentes a aplicação de 0, 40, 80, 120 e 160 mg kg⁻¹ de AIA), 40 dias após o plantio.....72

Figura 8. Viabilidade celular de fibroblastos (NIH/3t3) sob tratamentos com doses crescentes (0, 40, 80, 120 e 160 mg kg⁻¹) de ácido indol-3-acético (AIA) produzido por *A. flavipes* (A) e sintético (Sigma®) (B).....74

CAPÍTULO 4

Figura 1. Efeito das formas de aplicação do produto, sólido e líquido, na porcentagem de enraizamento, no comprimento médio das raízes e na massa fresca média radicular, 40 dias após a aplicação dos tratamentos.....93

PRADO, D.Z. **PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO E FITASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO E APLICAÇÃO EM *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla***. 2019. 111P. TESE (DOUTORADO) - INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

RESUMO

O *Eucalyptus* é um importante gênero florestal plantado mundialmente para fins comerciais. O Brasil é líder global em produtividade de *Eucalyptus*, devido às condições climáticas favoráveis e a eficientes programas de melhoramento baseados em plantações clonais, porém alguns clones de *Eucalyptus* possuem dificuldades de propagação, principalmente relacionadas ao enraizamento. A inoculação fúngica e bacteriana pode auxiliar o enraizamento e desenvolvimento vegetal pela produção de metabólitos tais como ácido indol-3-acético (AIA) e fitases. O objetivo deste trabalho foi produzir AIA e fitases por fermentação em estado sólido (FES) utilizando *Aspergillus* spp., *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. e a inoculação das cepas de maior produtividade em mudas de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (clone IPB2) visando otimizar o desenvolvimento vegetal. A FES ocorreu utilizando bagaço de mandioca, farelos de soja e trigo e grãos secos de destilaria com solúveis (DDGS) de sorgo e milho como substratos. Nos filtrados da FES foram determinados a concentração de AIA e a atividade de fitase. As características físicas e químicas dos substratos [macroporosidade (%), microporosidade (%), retenção de água (mL/cm³), condutividade elétrica (mS/cm³), pH, proteína bruta (%), lipídeos (%), hemicelulose (%), celulose (%) e lignina (%)] foram determinadas e correlacionadas à produtividade das biomoléculas, a fim de esclarecer a influência na alteração do metabolismo microbiano para maior ou menor produtividade de AIA e fitases. Os micro-organismos com maior produtividade de AIA e fitases foram selecionados para a continuidade do estudo. Foram implantados dois experimentos, o primeiro testando a produção de auxina pela fermentação de *A. flavipes* em farelo de soja (0,5 mm) com adição de água (15 mL) e triptofano (1,5 %, m/m), descrito na patente BR 10 2018 007927 1 e o segundo testando a cepa 01 de *A. niger* cultivada em farelo de trigo com adição de água (10 mL), produtor de fitase. Os tratamentos de ambos experimentos foram aplicados em formas sólida e líquida ao substrato Carolina I® nas doses 0, 40, 80, 120 e 160 mg de AIA kg⁻¹ e 0, 85, 170, 255 e 340 U de fitase por kg⁻¹ de substrato, respectivamente. O plantio das estacas foi realizado nos substratos tratados e no controle. O

experimento com AIA, cujo objetivo foi avaliar o enraizamento, teve duração de 40 dias; enquanto o experimento com fitase, cujo objetivo foi avaliar o desenvolvimento vegetal de forma geral, se prolongou por 5 meses. Foram realizadas avaliações de sobrevivência (%), enraizamento (%), comprimento da parte aérea e das raízes e as massas fresca e seca das raízes. Para o experimento com fitase, também foram determinados o comprimento da parte aérea, diâmetro médio do colo, a massa seca total, a intensidade de coloração verde das folhas e o número de folhas. Nossos resultados confirmaram a capacidade de produção de AIA e fitases pela maioria dos micro-organismos utilizados neste estudo. Houve influência negativa de lignina na produtividade de AIA por *Bacillus* e *Trichoderma* e influência positiva do pH, hemicelulose e microporos para a produção de AIA por *Bacillus*. O produto descrito na patente BR 10 2018 007927 1, na forma sólida e na faixa de dosagem de 40 a 120 mg kg⁻¹, incrementou a porcentagem de enraizamento, o comprimento radicular e as massas fresca e seca das raízes, enquanto o tratamento com 120 mg kg⁻¹ do produto na forma líquida induziu o aumento do comprimento das raízes e da massa seca radicular, além dos efeitos positivos no enraizamento o produto não apresentou citotoxicidade em fibroblastos (NIH/3t3). Já a inoculação *A. niger*, em geral, prejudicou o desenvolvimento do clone IBP2, principalmente nos tratamentos com a forma líquida, indicando a produção de metabólitos fitotóxicos pelo micro-organismo. Assim, em estudos futuros, sugerimos que a fitase produzida por *A. niger* seja testada em *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* na forma purificada.

Palavras-chave: *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Bacillus*, enraizamento, fitohormônio, enzima.

ABSTRACT

Eucalyptus is an important forest genus planted worldwide for commercial purposes. Brazil is the global leader in *Eucalyptus* productivity due to favorable climatic conditions and efficient breeding programs based on clonal plantations, but some *Eucalyptus* clones have difficulties of propagation, mainly related to rooting. Fungal and bacterial inoculation can positively influence rooting and plant development by producing metabolites such as indole-3-acetic acid (IAA) and phytases. This work aimed to produce IAA and phytases under solid state fermentation (SSF) using *Aspergillus* spp., *Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp. and inoculate the best producers in cuttings of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (clone IPB2), aiming to optimize plant development. The SSF technique was performed using cassava bagasse, soybean and wheat bran and distillers dried grains with solubles (DDGS) of sorghum and maize as substrates. The concentration of IAA and phytase activity were determined in SSF filtrates. The physical and chemical characteristics of the substrates [macroporosity (%), microporosity (%), water retention (mL/cm³), electrical conductivity (mS/cm³), pH, brute protein (%), lipids (%), hemicellulose (%), cellulose (%) and lignin (%)] were determined and correlated to the biomolecules productivity in order to clarify their influence on the alteration of microbial metabolism for higher or lower productivity of IAA and phytases. The microorganisms with higher productivity of IAA and phytases were selected for the study continuation. Two experiments were carried out, the first one tested the fermentation of *A. flavipes* in soybean bran (0.5 mm) with addition of water (15 mL) and tryptophan (1.5%, m/m), described in patent BR 10 2018 0079271, source of IAA and the second tested the strain 01 of *A. niger*, grown on wheat bran with addition of water (10 mL), source of phytase. The treatments of both experiments were applied in solid and liquid forms to the substrate Carolina I® at 0, 40, 80, 120 and 160 mg of IAA kg⁻¹ and 0, 85, 170, 255 and 340 U of phytase kg⁻¹ of substrate, respectively. The planting of cuttings was carried out on treated substrates and on control. The experiment with IAA, which aimed rooting improvement, lasted 40 days, while the experiment with phytase, whose objective was to evaluate plant development, lasted 5 months. Plants survival (%), rooting (%), shoot and root length, and fresh and dry mass of the roots were evaluated. For the phytase experiment, shoot length, colon diameter, total dry mass, green intensity in leaves and number of leaves were also determined. Our results confirmed the production of IAA and phytases by most of the microorganisms tested in this study. There was a negative influence of

lignin on the productivity of IAA by *Bacillus* and *Trichoderma* and positive influence of pH, hemicellulose and micropores for the production of IAA by *Bacillus*. The product described in the patent BR 10 2018 007927 1, in solid form, and in the range from 40 to 120 mg kg⁻¹, increased rooting percentage, root length and fresh and dry mass of the roots, while treatment with 120 mg kg⁻¹ of the product in liquid form induced increases in root length, and root dry mass. In addition to the positive rooting effects, the product did not show cytotoxicity in fibroblasts (NIH/3t3). However, *A. niger* inoculation generally impaired the development of the IBP2 clone, mainly in treatments with the liquid form, indicating the production of phytotoxic metabolites by the microorganism. Thus, in future studies, we suggest testing purified *A. niger* phytases in *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*.

Key words: *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Bacillus*, rooting, phytohormone, enzyme.

1. Introdução geral

O Brasil é um país que, além de ser composto por diversos, ricos e grandes biomas, apresenta características como clima e solos favoráveis e áreas disponíveis, condições estas que facilitam o estabelecimento de diversas culturas vegetais. No setor florestal, a madeira é o principal recurso comercializado. A maior parte da madeira obtida a partir de florestas plantadas destina-se às indústrias de celulose e papel, madeira e carvão vegetal (BUFALINO et al., 2015). O abastecimento de madeira é feito, em sua maioria, por plantios de *Eucalyptus* e *Pinus* com área plantada de 7,84 M ha, dos quais o *Eucalyptus* representa 73% (IBA, 2017).

O grande sucesso dos plantios de *Eucalyptus* se deve a avançados programas de melhoramento florestal baseados na criação de híbridos intra e inter-específicos. A razão principal de realizar cruzamentos entre linhas puras de uma única espécie ou de diferentes espécies é a exploração da superioridade híbrida (heterose) e a possibilidade de combinação de características complementares (VOLKER; POTTS; BORRALHO, 2008).

O clone IPB2 selecionado pelo programa de melhoramento da ARBORGEN, é um híbrido inter-específico de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* de grande produtividade, com incremento médio anual de 35 a 45 m³/ha, contra 31 a 40 m³/ha do clone controle. Aos 6 anos de idade, com os manejos de silvicultura adequados, as árvores atingem 510 kg/m³ de densidade básica e 53% de rendimento em celulose, contra 460 kg/m³ e 51% no clone controle, respectivamente. Além da grande produtividade, o clone apresenta tolerância à ferrugem, doença causada pelo fungo *Puccinia psidii*, a ataques de vespa da galha e a quebra por adversidades climáticas (ARBORGEN, 2018). No entanto, o material genético apresenta dificuldades de propagação devido à baixa taxa de enraizamento.

Entre as biomoléculas que podem auxiliar o desenvolvimento vegetal estão as auxinas e as fitases. Auxinas sintéticas têm sido amplamente utilizadas para incrementar o enraizamento e o desenvolvimento vegetal e, em altas concentrações, também utilizadas como herbicida (CROZIER et al., 2002). A auxina ácido indol-3-acético (AIA) também pode ser produzida por diversas espécies de micro-organismos (SPAEPEN; VANDERLEYDEN, 2010).

As fitases (mio-inositol-hexafosfato fosfohidrolase, E.C. 3.1.3.8) são uma classe de fosfatases que catalisam a remoção gradual de fosfatos de ácido fítico (hexaquisfosfato mio-inositol) ou do seu sal (fitato), liberando fosfatos na forma inorgânica (VINCENT; CROWDER; AVERILL, 1992). Os micro-organismos possuem a capacidade de produzir

fitases, essas enzimas são ativamente secretadas para o solo, atuando na decomposição de resíduos vegetais e na liberação de fósforos orgânicos para o solo. Assim, as fitases microbianas são as enzimas chave na ciclagem de fósforo no solo (JORQUERA et al., 2008).

Auxinas e fitases produzidas por micro-organismos podem alterar o desenvolvimento vegetal. Um considerável número de micro-organismos vem demonstrando beneficiar plantas promovendo crescimento e/ou atenuando ou prevenindo o efeito deletério de patógenos (GLICK, 1995). Esses micro-organismos incluem fungos e bactérias e geralmente são referidos como micro-organismos promotores do crescimento de plantas (PGPMs) (GROPPIA, BENAVIDES; ZAWOZNIK, 2012).

Os micro-organismos podem ser cultivados por fermentação em estado sólido (FES), técnica que utiliza como substratos resíduos agro-industriais e subprodutos. Essa utilização, além de adicionar valor econômico aos resíduos e subprodutos, também contribui para solucionar descartes excedentes. A FES também possui vantagens como fornecer ao micro-organismo cultivado um ambiente mais próximo ao de seu habitat quando comparado à fermentação líquida, o que vem sendo apontado como o fator principal para seu melhor rendimento e produtividade (SINGH NEE NIGAM; PANDEY, 2009).

A FES vem sendo aplicada, nos últimos anos, em indústrias de biotecnologia, devido ao seu potencial para a produção de metabólitos secundários biologicamente ativos (PANDEY, 2003; SINGHANIA et al., 2009). A busca por processos sustentáveis para substituir os processos químicos, torna a FES uma técnica promissora no cenário atual, por oferecer potenciais benefícios ambientais (SINGH NEE NIGAM; PANDEY, 2009).

Assim, o presente trabalho objetivou a produção de AIA e fitases por *Aspergillus* spp., *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. utilizando fermentação em estado sólido (FES) e a inoculação dos produtos da FES em estacas de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (clone IPB2), visando o enraizamento e o desenvolvimento vegetal das mudas em viveiro. Os experimentos seguiram conforme a Figura 1.

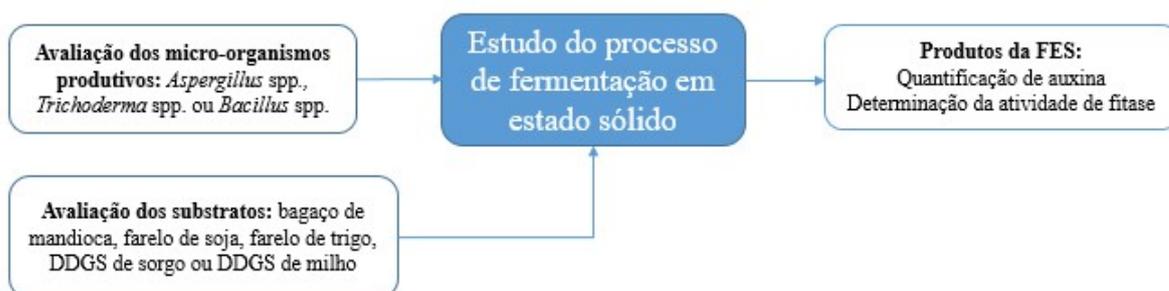


Figura 1. Fluxograma do processo de fermentação em estado sólido para a seleção das combinações com maior produção de auxinas e fitases.



Figura 2. Fluxograma do planejamento experimental, seleção das condições de cultivo e inoculação em *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*.

Este trabalho foi dividido em quatro capítulos. No primeiro, foi realizada uma revisão de literatura sobre a aplicação dos micro-organismos dos gêneros *Trichoderma* spp., *Bacillus* spp. e *Aspergillus* spp., com a função de promotores de crescimento vegetal, na agricultura.

No segundo estão apresentados os dados da produção de auxinas e fitases resultantes do cultivo de *Aspergillus* spp., *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. por FES em diferentes substratos e determinadas as características físicas e químicas dos substratos: macro e microporosidade, capacidade de retenção de água, condutividade elétrica, pH, proteína bruta, lipídeos, hemicelulose, celulose, lignina dos substratos utilizados na FES. A produtividade das biomoléculas foi correlacionada às características dos substratos a fim de investigar a influência de cada um dos fatores na produtividade dos micro-organismos.

O terceiro capítulo consistiu na pesquisa que culminou no desenvolvimento da patente intitulada “Produção de ácido indol-3-acético (AIA) por fermentação em estado sólido”, registrada no INPI (BR 10 2018 007927 1), que relata a produção inédita da biomolécula por *A. flavipes* utilizando fermentação em estado sólido. O produto foi aplicado em mudas de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (clone IPB2) e avaliadas as características morfológicas [sobrevivência (%), enraizamento (%), comprimento da parte aérea e das raízes, massas fresca

e seca das raízes]. Além disso, foi avaliada a segurança do produto e do ácido indol-3-acético purificado (Sigma®) em fibroblastos.

No quarto capítulo foi relatada a aplicação de *A. niger* cultivado em farelo de trigo, produtor de altas concentrações de fitase em mudas de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (clone IPB2) e apresentados os dados morfológicos [sobrevivência (%), enraizamento (%), comprimento da parte aérea e das raízes, massas fresca e seca das raízes, diâmetro médio do colo, massa seca total, intensidade de coloração verde das folhas e o número de folhas].

Ao final da tese foram adicionadas as atividades complementares realizadas durante o doutorado da aluna que consistiram no aprendizado de técnicas de biologia molecular, na pesquisa sobre expressão de genes relacionados à produção de AIA e em estudos sobre o tipo de interação exercida pelo micro-organismo relatado na patente com o clone IPB2. Essas atividades foram realizadas em estágio na Universidade Técnica de Dresden, na Alemanha, de julho a outubro de 2017, sob supervisão da Profª Drª Jutta Ludwig-Müller.

2. Referências Bibliográficas

ARBORGEN. **Clone IPB2 – H15**. Disponível em: <http://supertreeseedlings.com.br/wp-content/uploads/2015/03/GS-0001-14T_Laminas-Arborgen_IPB2.pdf>. Acesso em: 22 jan. 2018.

BUFALINO, L.; SENA NETO, A. R.; TONOLI, G. H. D.; FONSECA, A. S.; COSTA, T. G.; MARCONCINI, J. M.; COLODETTE, J. L.; LABORY, C. R. G.; MENDES, L. M. How the chemical nature of Brazilian hardwoods affects nanofibrillation of cellulose fibers and film optical quality. **Cellulose**, v. 22, n. 6, p. 3657–3672, 2015.

CROZIER, A.; KAMIYA, Y.; BISHOP, G.; YOKOTA, T. Biosynthesis of hormones and elicitor molecules. In: BUCHNAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. New Delhi: I. K. International. p. 850 – 929.

GLICK, B.R. The enhancement of plant growth by free living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 109–117, 1995.

GROPPIA, M.D.; BENAVIDES, M.P.; ZAWOZNIK, M.S. Root hydraulic conductance, aquaporins and plant growth promoting microorganisms: A revision. **Applied Soil Ecology**, v.61, p. 247– 254, 2012.

IBA. **Brazilian tree industry: report 2017**. 2017. Brasília, 2017, 77 p.

- JORQUERA, M.; MARTÍNEZ, O.; MARUYAMA, F.; MARSCHNER, P.; MORA, M. D. L. L. Current and future biotechnological applications of bacterial phytases and phytase-producing bacteria. **Microbes and Environments**, v. 23, n. 3, p. 182–191, 2008.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2–3, p. 81–84, 2003.
- SINGH NEE NIGAM, P.; PANDEY, A. **Biotechnology for agro-industrial residues utilisation: Utilisation of agro-residues**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2009.
- SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13–18, 2009.
- SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Auxin and plant–microbe interactions. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 3, 2010.
- VINCENT, J.B.; CROWDER, M. W.; AVERILL, B.A. Hydrolysis of phosphate monoesters: a biological problem with multiple chemical solutions. **Trends in Biochemical Science**, v. 17, p. 105–110, 1992.
- VOLKER, P. W.; POTTS, B. M.; BORRALHO, N. M. G. Genetic parameters of intra- and inter-specific hybrids of *Eucalyptus globulus* and *E. nitens*. **Tree Genetics and Genomes**, v. 4, n. 3, p. 445–460, 2008.

Conclusão geral e estudos futuros

Neste estudo, *Aspergillus* spp., *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp., gêneros microbianos com diversas possibilidades de aplicação na agricultura, foram avaliados como produtores de auxinas e fitases por fermentação em estado sólido (FES). Pela primeira vez, foi relatada a produção de ácido indol-3-acético (AIA) por FES. Foi também evidenciada a influência positiva de hemicelulose, microporosidade e pH neutro do substrato para a produção de auxina por *Bacillus* e influência negativa da presença de lignina para a produção de auxina por *Trichoderma* e *Bacillus*.

Entre as cepas microbianas testadas para a produção de AIA, houve destaque para a cepa *Aspergillus flavipes* (ATCC® 16814™) cultivada em farelo de soja com adição de água e triptofano. O produto da FES aumentou a taxa de enraizamento de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (clone IPB2) em 30%, o comprimento e a massa fresca radicular e foi comprovado como atóxico para fibroblastos. Os estudos futuros com *A. flavipes* pretendem elucidar se, em altas dosagens, o produto possui efeito herbicida, bem como compreender o tipo de relação estabelecida entre o fungo e o vegetal, desvendar por qual via metabólica ocorre a produção de AIA e elucidar as modificações que ocorrem no transcriptoma vegetal quando inoculado o bioestimulante.

Já a cepa selecionada para aplicação de fitases, *Aspergillus niger* 01 (CBMAI 2084) cultivada em farelo de trigo, não resultou em efeitos positivos no desenvolvimento de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (clone IPB2), os efeitos negativos mais intensos ocorreram quando o produto foi utilizado na forma líquida, forma que aumenta a superfície de contato produto/vegetal, assim, nas pesquisas futuras sugerimos que o inóculo seja testado em menores doses e de forma purificada.

Atividades acadêmicas desenvolvidas durante o doutorado

Formação complementar

1. Curso de Escrita Acadêmica em Língua Inglesa. (Carga horária: 20h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

Artigos completos publicados em periódicos

1. ATHANÁZIO-HELIODORO, JULIA CAROLINA; OKINO-DELGADO, CLARISSA HAMAIO; FERNANDES, CÉLIO JÚNIOR DA COSTA; ZANUTTO, MIRELLA ROSSITTO; PRADO, DÉBORA ZANONI DO; DA SILVA, RODRIGO AUGUSTO; FACANALI, ROSELAINÉ; ZAMBUZZI, WILLIAN FERNANDO; MARQUES, MÁRCIA ORTIZ MAYO; FLEURI, LUCIANA FRANCISCO. Improvement of lipase obtaining system by orange waste-based solid-state fermentation: production, characterization and application. *PREPARATIVE BIOCHEMISTRY & BIOTECHNOLOGY*, v. 14, p. 1-9, 2018.
2. OKINO-DELGADO, CLARISSA HAMAIO; PEREIRA, MILENE STEFANI; DA SILVA, JOÃO VITOR INÁCIO; KHARFAN, DANIELA; DO PRADO, DÉBORA ZANONI; FLEURI, LUCIANA FRANCISCO. Lipases obtained from orange wastes: Commercialization potential and biochemical properties of different varieties and fractions. *BIOTECHNOLOGY PROGRESS*, v. x, p. 1-8, 2018.
3. ZANUTTO-ELGUI, MIRELLA ROSSITTO; VIEIRA, JOSÉ CAVALCANTE SOUZA; DO PRADO, DÉBORA ZANONI; BUZALAF, MARÍLIA AFONSO RABELO; DE MAGALHÃES PADILHA, PEDRO; DE OLIVEIRA, DEILSON ELGUI; FLEURI, LUCIANA FRANCISCO. Production of milk peptides with antimicrobial and antioxidant properties through fungal proteases. *FOOD CHEMISTRY*, v. 278, p. 823-831, 2018.
4. OKINO-DELGADO, C. H.; PRADO, D. Z.; FLEURI, L. F. Brazilian fruit processing, wastes as a source of lipase and other biotechnological products: a review. *ANAIS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS*, v. 90, p. 2927-2943, 2018.
5. FERREIRA, MARIA IZABELA; MAGRO, MASSIMILIANO; MING, LIN CHAU; BARTIRA DA SILVA, MONICA; ORMOND SOBREIRA RODRIGUES, LUAN FERNANDO; ZANONI DO PRADO, DÉBORA; BONAIUTO, EMANUELA;

BARATELLA, DAVIDE; DE ALMEIDA ROGER, JESSICA; PEREIRA LIMA, GIUSEPPINA PACE; ROSSETTO, MONICA; ZENNARO, LUCIO; VIANELLO, FABIO. Sustainable production of high purity curcuminoids from *Curcuma longa* by magnetic nanoparticles: A case study in Brazil. JOURNAL OF CLEANER PRODUCTION, v. 154, p. 233-241, 2017.

6. OKINO-DELGADO, C. H.; PRADO, D. Z.; FACANALI, R.; MARQUES, M. M. O.; NASCIMENTO, A. S.; COSTA, C. J.; ZAMBUZZI, W. F.; FLEURI, L. F. Bioremediation of cooking oil waste using lipases from wastes. PLoS One, v. 12, p. e0186246, 2017.
7. PRADO, D. Z.; DIONIZIO, R. C.; VIANELLO, F.; BARATELLA, D.; COSTA, S. M.; LIMA, G. P. P. Quercetin and indole 3-butyric acid (IBA) as rooting inducers in *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. AUST J CROP SCI, v. 9, p. 1057-1063, 2015.

Capítulos de livros publicados

1. DO PRADO, DÉBORA Z.; CAPOVILLE, BRUNA L.; DELGADO, CLARISSA H.O.; HELIODORO, JULIA C.A.; PIVETTA, MAYARA R.; PEREIRA, MILENE S.; ZANUTTO, MIRELLA R.; NOVELLI, PAULA K.; FRANCISCO, VALESKA C.B.; FLEURI, LUCIANA F. Nutraceutical Food: Composition, Biosynthesis, Therapeutic Properties, and Applications. In: Alexandru Grumezescu; Alina Maria Holban. (Org.). Alternative and Replacement Foods. 1ed.:Elsevier, 2018, v. 17, p. 95-140.
2. FLEURI, L. F.; DELGADO, C. H. O.; NOVELLI, P. K.; PIVETTA, M. R.; PRADO, D. Z.; SIMON, J. W. Enzymes in Fruit Juice and Vegetable Processing. Applications of enzymes in food and beverage industries. 1ed., 2015, v., p. 255-281.

Resumos publicados em anais de eventos

1. PRADO, D. Z.; OLIVEIRA, S. L.; OKINO-DELGADO, C. H.; SILVA, R. B.; SILVA, M. R.; FLEURI, L. F. Low-cost production of potential novel plant biostimulants. In: Total Food 2017 - Exploitation of agri-food chain wastes, 2017, Norwich. Total Food, 2017.
2. PRADO, D. Z.; OKINO-DELGADO, C. H.; FLEURI, L. F. Modification of babassu oil (*Orbignya spp.*) by lipase-catalyzed transesterification. In: Total Food 2017 - Exploitation of agri-food chain wastes, 2017, Norwich. Total Food, 2017.

3. ZANUTTO, M. R.; PRADO, D. Z.; FRANCISCO, V. B.; RODRIGUES, J. C. Z.; OLIVEIRA, D. E.; FLEURI, L. F. Antimicrobial Activity of Milk-derived Bioactive Peptides Generated Using Homemade Fungal Proteases. In: Total Food 2017 - Exploitation of agri-food chain wastes, 2017, Norwich. Total Food, 2017.
4. ATHANAZIO-HELIODORO, J. C.; PRADO, D. Z.; DELGADO, C. O.; ZANUTTO, M. R.; FLEURI, L. F. Seleção de micro-organismos para a obtenção indireta e direta de lipases em resíduos de laranja. In: International Meeting of Agrarian Science and Tecnology - IMAST, 2016, Dracena. International Meeting of Agrarian Science and Tecnology, 2016.
5. PRADO, D. Z.; OLIVEIRA, S. L.; ZANUTTO, M. R.; ATHANAZIO-HELIODORO, J. C.; FLEURI, L. F. *Bacillus subtilis*: um potencial produtor de auxina. In: International Meeting of Agrarian Science and Tecnology - IMAST, 2016, Dracena. International Meeting of Agrarian Science and Tecnology, 2016.
6. PRADO, D. Z.; OLIVEIRA, S. L.; ATHANAZIO-HELIODORO, J. C.; FLEURI, L. F. Produção sustentável de fitases fúngicas e bacterianas. In: International Meeting of Agrarian Science and Tecnology - IMAST, 2016, Dracena. International Meeting of Agrarian Science and Tecnology, 2016.

Apresentações de trabalhos

1. SILVA, R. B.; GABIRA, M. M.; PRADO, D. Z.; VIEGAS, L. B.; DELGADO, L. G. M.; SANTOS, R. L.; UESUGI, G.; SILVA, M. R. Can the leaf angles and water depths affect the morphological quality of seedlings? 2018.
2. PRADO, D. Z.; OLIVEIRA, S. L.; FLEURI, LUCIANA F. Otimização da produção de fitases e auxinas fúngicas pela metodologia da superfície de resposta. 2018.
3. PRADO, D. Z.; OLIVEIRA, S. L.; OKINO-DELGADO, C. H.; SILVA, R. B.; SILVA, M. R.; FLEURI, L. F. Low-cost production of potential novel plant biostimulants. 2017.
4. PRADO, D. Z.; OKINO-DELGADO, C. H.; FLEURI, L. F. Modification of babassu oil (*Orbignya* spp.) by lipase-catalyzed transesterification. 2017.
5. PRADO, D. Z.; OLIVEIRA, S. L.; ATHANAZIO-HELIODORO, J. C.; FLEURI, L. F. Produção sustentável de fitases fúngicas e bacterianas. 2016.
6. PRADO, D. Z.; OLIVEIRA, S. L.; ZANUTTO, M. R.; FLEURI, L. F. *Bacillus subtilis*: um potencial produtor de auxina. 2016.