



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<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> 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<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Luciana Francisco Fleuri**

**CO-ORIENTADORAS: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Giuseppina Pace Pereira Lima**

**Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> 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 memoriam*), meu alicerce, por moldarem o meu caráter e serem sempre exemplos de honestidade e persistência.

A minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> 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<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> 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<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> 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, Lívia 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 <sup>-1</sup> de proteína) e AIA e derivados (µg de ácido indol-3-acético mL <sup>-1</sup> ) 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 <sup>3</sup> ), condutividade elétrica (EC) (mS/cm <sup>3</sup> ), 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 <sup>-1</sup> ) 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  $\text{kg}^{-1}$  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<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup>) 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/cm<sup>3</sup>), condutividade elétrica (mS/cm<sup>3</sup>), 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<sup>-1</sup> e 0, 85, 170, 255 e 340 U de fitase por kg<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup>, incrementou a porcentagem de enraizamento, o comprimento radicular e as massas fresca e seca das raízes, enquanto o tratamento com 120 mg kg<sup>-1</sup> 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/cm<sup>3</sup>), electrical conductivity (mS/cm<sup>3</sup>), 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<sup>-1</sup> and 0, 85, 170, 255 and 340 U of phytase kg<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup>, increased rooting percentage, root length and fresh and dry mass of the roots, while treatment with 120 mg kg<sup>-1</sup> 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 m<sup>3</sup>/ha, contra 31 a 40 m<sup>3</sup>/ha do clone controle. Aos 6 anos de idade, com os manejos de silvicultura adequados, as árvores atingem 510 kg/m<sup>3</sup> de densidade básica e 53% de rendimento em celulose, contra 460 kg/m<sup>3</sup> 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.

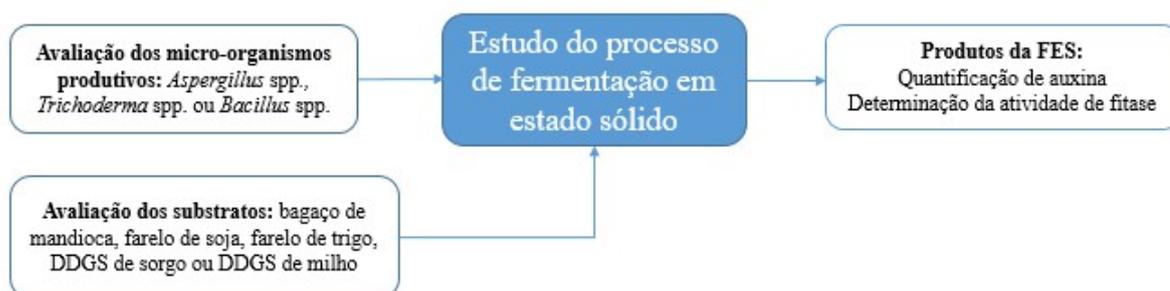


Figura 1. Fluxograma do processo de fermentação em estado sólido para a seleção das combinações com maior produção de auxinas e fitases.



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 Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> 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](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.

## Capítulo 1: *Trichoderma*, *Bacillus* e *Aspergillus* como micro-organismos promotores de crescimento de plantas (PGPMs): aplicações sustentáveis para a agricultura

### **Resumo**

A redução das áreas agrícolas decorrente das mudanças climáticas é, atualmente, uma preocupação mundial. Agroquímicos têm sido amplamente utilizados com o objetivo de aumentar a produção agrícola, porém, seu uso extensivo gera altos custos, pode deteriorar a qualidade do meio ambiente e gerar problemas para a saúde animal e humana. Como alternativa aos agroquímicos, micro-organismos promotores de crescimento de plantas (PGPMs), como algumas espécies dos gêneros *Trichoderma*, *Bacillus* e *Aspergillus*, têm sido considerados uma ferramenta viável para a produção agrícola sustentável e utilizados para diversas finalidades. Assim, esta revisão objetivou discutir as possíveis aplicações agronômicas desses micro-organismos como biofertilizantes (fixadores de N e disponibilizadores de P) e bioestimulantes (reguladores de fitohormônios como auxinas, giberelinas, citocininas, e etileno), bem como as limitações e desafios para comercialização desses produtos e perspectivas futuras.

Palavras-chave: agricultura sustentável, bioestimulantes, biofertilizantes, inoculantes microbianos.

## 1. Introdução

O uso eficiente do solo para fins agrícolas é um importante desafio de sustentabilidade deste século. Atualmente, devido a atividades antropogênicas, mais de 33% dos solos aráveis são inadequadas para a agricultura e com o aumento populacional mundial, degradação do meio ambiente e mudanças climáticas, esse cenário tende a se tornar mais intenso em um futuro próximo (ABHILASH et al., 2016; DUCA et al., 2014).

Além de reduzir as áreas agrícolas, as mudanças climáticas irão acelerar a ocorrência de diversas fitopatologias, aumentando a necessidade do uso de defensivos agrícolas para a produção de alimentos e, conseqüentemente, deteriorando a qualidade das terras cultiváveis (ABHILASH et al., 2016). A agricultura intensiva também exige uma quantidade substancial de fertilizantes sintéticos, cujas fontes são limitadas, sugerindo que haverá aumento no custo dos fertilizantes nitrogenados (N) e fosfatados (P), bem como de todas as formulações oriundas destes nutrientes (NKEBIWE et al., 2016).

O uso extensivo de agroquímicos pode se tornar um grande problema, pois a meia-vida desses compostos é influenciada por fatores ambientais como temperatura, tipo e atividade de micro-organismos, composição e pH do solo, e devido à essas variações, a meia-vida nem sempre corresponde à permanência esperada no ambiente (BARCHANSKA et al., 2017). Além disso a exposição a agroquímicos tem sido relacionada a efeitos negativos na saúde humana, como rinite alérgica, asma (PATEL et al., 2018), distúrbios nos tratos respiratório e reprodutivos, além de efeitos teratogênicos e neurodegenerativos como as doenças de Parkinson e Alzheimer (SABARWAL; KUMAR; SINGH, 2018) e epilepsia (REQUENA et al., 2018).

Assim, devido aos efeitos negativos das substâncias químicas sintéticas, métodos sustentáveis vêm sendo desenvolvidos para a promoção do crescimento vegetal, como o uso de bioinoculantes (MARTÍNEZ-HIDALGO et al., 2018). O mercado global de bioinoculantes tem crescido em uma taxa estimada de 10% ao ano (BERG et al., 2009) e é previsto que movimente US\$ 12,86 bilhões até 2022 (MARKETS & MARKETS, 2018).

Os bioinoculantes englobam, entre outros, micro-organismos promotores de crescimento de plantas (PGPMs). Os PGPMs são micro-organismos benéficos que habitam a rizosfera e influenciam o crescimento de plantas de forma direta, por mecanismos como a produção ou supressão de fitohormônios (bioestimulantes) e o aumento da absorção de água e nutrientes (biofertilizantes) (ABHILASH et al., 2016; BERG, 2009) ou indireta (biopesticidas) e podem

potencializar a produção agrícola (PANDEY; YARZÁBAL, 2018). Nesta revisão, nosso objetivo foi promover uma visão geral sobre a utilização de três gêneros microbianos, *Trichoderma*, *Bacillus* e *Aspergillus* como biestimulantes e biofertilizantes, bem como discutir as dificuldades e futuras perspectivas para o uso desses bioprocessos emergentes na área agronômica.

2. *Bacillus*, *Trichoderma* e *Aspergillus* como micro-organismos promotores de crescimento de plantas (PGPMs)

Micro-organismos dos gêneros *Bacillus*, *Trichoderma* e *Aspergillus* vêm sendo pesquisados nos últimos anos e exercido efeitos benéficos em diferentes culturas vegetais (Tabela 1). Assim, na sequência, revisamos a aplicação desses micro-organismos de forma direta, como bioestimulantes (reguladores de fitohormônios como auxinas, giberelinas, citocininas e etileno) e biofertilizantes (fixadores de N e disponibilizadores de P).

Tabela 1. Efeitos da aplicação de micro-organismos promotores do crescimento de plantas (PGPM) no desenvolvimento de diversas espécies vegetais.

<b>Micro-organismo</b>	<b>Espécie vegetal</b>	<b>Efeito</b>	<b>Referência</b>
<i>Aspergillus ustus</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Solanum tuberosa</i>	Crescimento da parte aérea e das raízes e no número de raízes laterais e pêlos radiculares	Salas-Marina et al. (2011)
<i>Trichoderma virens</i> <i>Trichoderma atroviride</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Aumento das raízes laterais e da biomassa radicular	Contreras-Cornejo et al. (2009)
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Triticum aestivum</i> Linn.	Aumento no comprimento da parte aérea e das raízes	Gujar; Bhavsar; Khire (2013)
<i>Trichoderma asperellum</i>	<i>Cucumis sativus</i> L.	Crescimento radicular e aumento da atividade das raízes	Zhao e Zhang (2015)
<i>Bacillus spp.</i>	<i>Eucalyptus urograndis</i>	Crescimento radicular e da parte aérea	Paz et al. (2012)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Glycine max</i>	Aumento na área foliar e nos comprimento e biomassa da parte aérea, aumento da concentração de clorofila e das taxas fotossintéticas	Khan et al. (2011)
<i>Trichoderma atroviride</i>	<i>Pinus radiata</i>	Aumentos na biomassa radicular e do caule e no diâmetro do caule	Reglinski et al. (2012)
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Piper nigrum</i> L.	Aumento no número de raízes, comprimento de raízes e massas radiculares fresca e seca	Aziz et al. (2015)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Supressão de <i>Ralstonia solanacearum</i> , maiores biomassa, diâmetro e comprimento radiculares, volume de raízes e massa fresca da parte aérea	Tan et al. (2013)
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	Alongamento radicular	Shan-Shan et al. (2014)
<i>Trichoderma spp.</i>	<i>Zea mays</i>	Aumento dos comprimentos da parte aérea e das raízes, área foliar, biomassa total e massa fresca do caule e das raízes	Kumar; Manigundan; Amaresan (2017)

## 2.1. Bioestimulantes

### 2.1.1. Auxinas

As auxinas foram descritas pela primeira vez em 1926 por Fritz Went, que ao estudar coleótilos de aveia obteve um promotor difusível de crescimento. O hormônio auxina está envolvido em vários mecanismos biológicos em plantas como endocitose, polaridade celular, controle do ciclo celular, alongamento e crescimento diferencial, embriogênese, padrão tecidual e formação *de novo* de órgãos (SAUER; ROBERT; KLEINE-VEHN, 2013).

O ácido indol-3-acético (AIA) é uma auxina presente na maioria das plantas e sua produção por micro-organismos ocorre por vias biossintéticas ainda não completamente elucidadas, porém é descrito que o triptofano (Trp) é utilizado como principal precursor tanto para bactérias como para fungos, através de intermediários tais como o ácido indol-3-pirúvico, indol-3-acetamida e triptamina (SPAEPEN; VANDERLEYDEN, 2010).

Micro-organismos dos gêneros *Trichoderma*, *Bacillus* e *Aspergillus* vêm sendo descritos na literatura como capazes de produzir diferentes quantidades de AIA por vias dependentes de triptofano (Tabela 2). A espécie *Bacillus subtilis*, usada como referência para a produção de AIA, produziu  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  de AIA e derivados na ausência de triptofano, enquanto em presença do aminoácido, a produtividade foi elevada cerca de 4 vezes (SALAS-MARINA et al., 2011). *Bacillus* spp. endofíticos isolados do híbrido *Eucalyptus urograndis* cultivados em meio *tryptone soy* acrescido de L-triptofano (5 mM) (PAZ et al., 2012) e cepas de *Bacillus velezensis* cultivadas em caldo *tryptic soy* com acréscimo de tryptofano (1%) produziram quantidades similares de AIA e derivados (MENG; JIANG; HAO, 2016) (Tabela 2).

A produção de auxinas por fungos do gênero *Trichoderma* também apresenta ampla variação na literatura. Isolados de *Trichoderma* spp. provenientes da rizosfera de áreas agrícolas para o cultivo de vegetais e especiarias nas Ilhas Andaman e Nicobar, Índia, cultivados em caldo Czapek-dox produziram de 0,7 a  $1,6 \mu\text{g mL}^{-1}$  de AIA e derivados na ausência de triptofano e de 5,5 a  $36,4 \mu\text{g mL}^{-1}$  na presença de triptofano (KUMAR et al., 2017). Em outro estudo, foi evidenciada a capacidade de produção de AIA, em presença de triptofano (aproximadamente  $1 \text{ ng mL}^{-1}$ ), pela cepa Q1 de *T. asperellum* isolada da rizosfera de pepino (ZHAO; ZHANG, 2015). A espécie *T. virens*, cultivada em solução nutritiva, também produziu

AIA, na ausência de triptofano apresentou a produtividade de 13,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e em presença de triptofano, 233,6  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (CONTRERAS-CORNEJO et al., 2009).

No gênero *Aspergillus*, a produção de AIA e derivados foi evidenciada em *Aspergillus niger* (85  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), sendo superior à produtividade das espécies *Trichoderma harzianum* (68  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e *Penicillium citrinum* (52  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (YADAV; PRAKASH; TIWARI, 2011). Para a espécie *Aspergillus ustus* foi comprovada a utilização de via sintética dependente de triptofano, na ausência do aminoácido houve a produção de 0,79  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , enquanto no meio MS (Murashige e Skoog) suplementado com o aminoácido, a produção foi elevada cerca de 10 vezes (SALAS-MARINA et al., 2011).

Tabela 2. Produção de ácido indol-3-acético (AIA) e derivados, por diferentes espécies de micro-organismos dos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Bacillus*.

Micro-organismo	Bioestimulante	Produção	Referência
<i>Bacillus subtilis</i>	AIA e derivados	106,36 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Salas-Marina et al. (2011)
<i>Bacillus</i> spp.	AIA e derivados	17,1 - 27,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Paz et al. (2012)
<i>Bacillus velezensis</i>	AIA e derivados	15,2 - 21,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Meng; Jiang; Hao (2016)
<i>Bacillus aryabhatai</i>	AIA	6,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Park et al. (2017)
<i>Trichoderma</i> spp.	AIA e derivados	5,5 - 34,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Kumar et al. (2017)
<i>Trichoderma asperellum</i>	AIA	1 $\text{ng mL}^{-1}$	Zhao e Zhang (2015)
<i>Trichoderma virens</i>	AIA	234 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Contreras-Cornejo et al. (2009)
<i>Trichoderma harzianum</i>	AIA e derivados	68 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Yadav; Prakash; Tiwari (2011)
<i>Aspergillus niger</i>	AIA e derivados	85 $\mu\text{g mL}^{-1}$	
<i>Aspergillus ustus</i>	AIA e derivados	7,94 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Salas-Marina et al. (2011)

### 2.1.2. Giberelinas

Os fitohormônios giberelinas (GA) são terpenoides e foram descritos pela primeira vez em *Gibberella fujikuroi*, fungo causador da doença "bakanae", que causa crescimento elevadamente anormal nas plantas infectadas (CHANCLUD; MOREL, 2016). As GAs regulam o crescimento e desenvolvimento durante todo o ciclo de vida vegetal e seu acúmulo vem sendo relacionado à regulação do crescimento de embriões em desenvolvimento, germinação de sementes, alongamento caulinar e radicular e desenvolvimento de órgãos reprodutivos (RIZZA; JONES, 2019).

Tabela 3. Produção de giberelinas (GAs), por diferentes espécies de micro-organismos dos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Bacillus*.

Micro-organismo	Bioestimulante	Produção	Referência
<i>Bacillus licheformis</i>	GA1	130 ng mL <sup>-1</sup>	Gutiérrez-Mañero et al. (2001)
	GA3	60 ng mL <sup>-1</sup>	
	GA4	8 ng mL <sup>-1</sup>	
	GA20	2 ng mL <sup>-1</sup>	
<i>Bacillus pumilus</i>	GA1	150 ng mL <sup>-1</sup>	Gutiérrez-Mañero et al. (2001)
	GA3	50 ng mL <sup>-1</sup>	
	GA4	12 ng mL <sup>-1</sup>	
	GA20	3 ng mL <sup>-1</sup>	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	GA4	2,1 ng 100 mL <sup>-1</sup>	Kim et al. (2017)
	GA8	0,19 ng 100 mL <sup>-1</sup>	
	GA9	1,1 ng 100 mL <sup>-1</sup>	
	GA19	1,25 ng 100 mL <sup>-1</sup>	
	GA20	0,13 ng 100 mL <sup>-1</sup>	
<i>Bacillus methylotrophicus</i>	GA1	0,010 ng mL <sup>-1</sup>	Radhakrishnan e Lee, 2016
	GA3	0,026 ng mL <sup>-1</sup>	
	GA7	0,056 ng mL <sup>-1</sup>	
	GA8	0,024 ng mL <sup>-1</sup>	
	GA9	0,017 ng mL <sup>-1</sup>	
	GA12	0,266 ng mL <sup>-1</sup>	
	GA19	0,008 ng mL <sup>-1</sup>	
	GA20	0,015 ng mL <sup>-1</sup>	
	GA24	0,009 ng mL <sup>-1</sup>	
GA34	0,113 ng mL <sup>-1</sup>		
GA53	0,004 ng mL <sup>-1</sup>		
<i>Trichoderma asperellum</i>	GA	0,09 ng mL <sup>-1</sup>	Zhao e Zhang, 2015
<i>Trichoderma harzianum</i> T-21		75 µg mL <sup>-1</sup>	You et al. (2016)
<i>Trichoderma harzianum</i> T-68	GA	80 µg mL <sup>-1</sup>	
<i>Trichoderma koningiopsis</i> T-35		125 µg mL <sup>-1</sup>	
<i>Trichoderma koningiopsis</i> T-51		130 µg mL <sup>-1</sup>	
<i>Aspergillus ustus</i>	GA	9,7 µg mL <sup>-1</sup>	Salas-Marina et al. (2011)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	GA4	24,8 ng mL <sup>-1</sup>	Khan et al. (2011)
	GA9	1,2 ng mL <sup>-1</sup>	
	GA12	9,8 ng mL <sup>-1</sup>	

Diversas espécies do gênero *Bacillus* vêm sendo relatadas na literatura como capazes de produzir diferentes concentrações de giberelinas (0,0013 – 150 ng mL<sup>-1</sup>) (GUTIÉRREZ-MAÑERO et al., 2001; KIM et al., 2017; RADHAKRISHNAN; LEE, 2016) (Tabela 3) e exercer efeitos positivos no desenvolvimento vegetal. A cepa H-25 de *B. amyloliquefaciens*

induziu crescimento de repolho chinês, mostarda e beterraba (KIM et al., 2017), enquanto a cepa bacteriana KE2 isolada de Kimchi e identificada como *Bacillus methylotrophicus* por análise filogenética, quando inoculado em alface aumentou o comprimento da parte aérea, massa fresca aérea e largura foliar (RADHAKRISHNAN; LEE, 2016).

A produção de GAs também vem sendo descrita em diversas espécies do gênero *Trichoderma* (Tabela 3). A cepa Q1 de *Trichoderma asperellum*, produtora de GA, quando aplicada em pepino aumentou os níveis de GA em folhas em 55,6 e 23,5%, nos tratamentos com e sem NaCl, respectivamente (ZHAO; ZHANG, 2015). Quatro isolados de *Trichoderma* pertencentes às espécies *T. harzianum* e *T. koningiopsis*, apresentaram a capacidade de produzir giberelinas e ácido indol-3-acético e promover o crescimento de tomate, aumentando significativamente o número de folhas, comprimento, diâmetro do caule, massa fresca e massa seca (YOU et al., 2016).

Em relação aos produtores de giberelina pertencentes ao gênero *Aspergillus* (Tabela 3), a inoculação de *A. ustus* em raízes de *Arabidopsis thaliana* e *Solanum tuberosum* induziu aumento no crescimento de raízes e parte aérea e número de raízes laterais e pêlos radiculares (SALAS-MARINA et al., 2011), enquanto a inoculação da cepa endofítica GMH-1, identificada como *Aspergillus fumigatus*, em soja aumentou significativamente o comprimento da parte aérea, as biomassas fresca e seca, a área foliar, o conteúdo de clorofila e as taxas fotossintéticas sob estresse salino (KHAN et al., 2011).

### 2.1.3. Citocininas

A citocinina cinetina foi descrita pela primeira vez no final de 1950, quando pesquisadores buscavam desvendar a molécula responsável pelo estímulo da proliferação celular que atuava em conjunto com o AIA (MILLER et al., 1955). As citocininas (CKs) são fitohormônios relacionados ao desenvolvimento da parte aérea, de gametófitos femininos e raízes laterais (WYBOUW; DE RYBEL, 2018), além de respostas à disponibilidade de nutrientes e estresses bióticos e abióticos (KIEBER; SCHALLER, 2018).

Diversas espécies pertencentes ao gênero *Bacillus* vêm sendo descritas como produtoras de citocininas e promotoras de crescimento de diferentes espécies vegetais. A rizobactéria *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* UCMB5113 produziu 2-300 fmol  $\mu\text{L}^{-1}$  de citocininas e estimulou o crescimento de *Arabidopsis thaliana* Col-0, aumentando o crescimento e

alongamento das raízes laterais, a formação de pêlos radiculares e o crescimento da parte aérea (ASARI et al., 2017). Em outro estudo, a cepa SRB02 de *B. aryabhatai* produziu quantidades significativas de AIA, CKs ( $1,5 \text{ ng mL}^{-1}$ ) e GAs em meio de cultura e, quando aplicado à soja, incrementou os níveis de AIA, ácido jasmônico e GAs e induziu aumentos no comprimento das raízes e da parte aérea (PARK et al., 2017). A citocinina zeatina ribosídica foi produzida em grandes quantidades ( $1,2 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ) pela cepa *B. subtilis* IB-22, a inoculação bacteriana em alface resultou em aumentos no conteúdo de citocininas tanto na parte aérea quanto nas raízes e aumentos da parte aérea e massa radicular (ARKHIPOVA et al., 2005).

Nos gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma*, até o momento não foram detectadas cepas produtoras do fitohormônio, porém em *T. atroviride* foram identificados 5 genes que em *Arabidopsis*, *M. polymorpha* e *C. purpurea* são relacionados à biossíntese de CK, sugerindo que a espécie fúngica produz CKs (GUZMÁN-GUZMÁN, 2018).

#### 2.1.4. Etileno

O etileno ( $\text{C}_2\text{H}_4$ ) foi reconhecido como o primeiro hormônio gasoso, em pesquisas realizadas ao final do século XIX e início do século XX (BAKSHI et al., 2015). O hormônio é produzido em plantas em resposta à estresses bióticos e abióticos e desempenha papel fundamental na regulação do crescimento e desenvolvimento vegetal (SHAHAROONA et al., 2012). Os efeitos do acúmulo de etileno na divisão e alongamento celular podem ser tanto positivos quanto negativos, dependendo do contexto ambiental e do órgão vegetal (DUBOIS; VAN DEN BROECK; INZÉ, 2018).

Alguns PGPMs regulam a produção de etileno pela produção da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminase (E.C. 3.5.99.7), responsável por metabolizar ACC e formar  $\alpha$ -cetobutirato e amônia, assim, a inoculação desses PGPMs poderia reduzir a produção de etileno induzida por estresses, mantendo o crescimento e desenvolvimento vegetal (SHAHAROONA et al., 2012).

Micro-organismos pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Trichoderma* e *Aspergillus*, produtores de ACC desaminase (Tabela 4), vêm sendo descritos como PGPMs. Treze cepas bacterianas (WU-1-13), isoladas de solo salino de Xinjiang, China e produtoras de altas quantidades de ACC desaminase, foram identificadas como pertencentes ao gênero *Bacillus* (Tabela 4). A cepa WU-5, identificada como *B. megaterium*, promoveu maiores aumentos na

massa seca, comprimento da parte aérea e comprimento radicular de mudas de pimenta em comparação ao controle e às demais cepas, sob estresse salino (WANG et al., 2018). Para *Vigna mungo* L. e *Pisum sativum* L., a combinação dos micro-organismos *Ochrobactrum pseudogrignonense* RJ12, *Pseudomonas* sp. RJ15 e *Bacillus subtilis* RJ46 foi usada como tratamento para estresse hídrico e aumentou significativamente a porcentagem de germinação de sementes, comprimento de raiz, comprimento da parte aérea e a massa seca das plantas tratadas, bem como a produção de enzimas oxidativas, osmólitos celulares, teor de clorofila, conteúdo relativo de água e recuperação radicular (SAIKIA et al., 2018).

Cepas do *Trichoderma*, produtoras de ACC desaminase, vêm sendo utilizadas tanto como inóculo quanto para a transformação genética de outros micro-organismos. A cepa PDR-28 de *Trichoderma virens*, tolerante à metais pesados e produtora de ACC desaminase, foi inoculada no solo e aumentou a massa seca radicular e da parte aérea, as concentrações de clorofila, açúcar, amido e proteína de milho (*Zea mays*) (BABU et al., 2014). A bactéria *Escherichia coli* foi modificada geneticamente, adicionando o gene *Tas-acdS* de *Trichoderma asperellum*, que codifica enzima ACC desaminase e quando inoculada em canola (*Brassica napus*) aumentou o alongamento radicular (VITERBO et al., 2010).

Tabela 4. Produção de ACC desaminase por diferentes espécies de micro-organismos dos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Bacillus*.

Micro-organismo	Produtividade de ACC desaminase	Referência
<i>B. pumilus</i>	760 nmol NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> mg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	BELIMOV et al., 2001
<i>B. megaterium</i> (WU-1 and 5)	20 μmol mg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	WANG et al., 2018
<i>B. velezensis</i> (WU-2-3)	15 μmol mg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	
<i>B. atrophaeus</i> (WU-6-8)	25 μmol mg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	
<i>B. methylotrophicus</i> (WU-4 and 9)	35 μmol mg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	
<i>B. amyloliquefaciens</i> (WU-10-12)	35 μmol mg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	
<i>B. subtilis</i> (WU-13)	25 μmol mg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	
<i>B. subtilis</i> (RJ46)	110 nmol mg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	SAIKIA et al., 2018
<i>T. asperellum</i>	8 μmol α-cetobutirato mg <sup>-1</sup> protein h <sup>-1</sup>	VITERBO et al., 2010
<i>T. virens</i> (PDR-28)	12 mmol α-cetobutirato mg <sup>-1</sup> protein h <sup>-1</sup>	BABU et al., 2014
<i>Trichoderma</i> sp. (MG)	25 μM α-cetobutirato mg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	GOVARTHANAN et al., 2018
<i>A. aculeatus</i>	26 μM α-cetobutirato mg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	HAN et al., 2018

Apenas um estudo, até o momento, reportou a produção de ACC deaminase por *Aspergillus* (Tabela 4). A inoculação de *A. aculeatus*, produtor de AIA e ACC desaminase, em azevém aumentou o crescimento, qualidade, teor de clorofila e relação C/N das plantas, sendo

que as duas últimas variáveis podem indicar uma ação protetiva do fungo sob o fotossistema II contra o estresses, como a presença de Cd, e aumentar a eficiência fotossintética (HAN et al., 2018).

## 2.2. Biofertilizantes

### 2.2.1. Micro-organismos fixadores de N

A fixação biológica de N por meio de PGPMs consiste na redução de nitrogênio ( $N_2$ ) a amônia ( $NH_3$ ) e ocorre de modo a suprir as necessidades nutricionais dos vegetais, fornecendo aos ecossistemas terrestres cerca de 200 milhões de toneladas de N por ano (RASCIO; LA ROCCA, 2013). No entanto, o processo é restrito a bactérias e *Archaea*, não ocorrendo em eucariotos (MUS et al., 2016).

A fixação de  $N_2$  vem sendo relatada em diversas espécies do gênero *Bacillus*. A maioria dos isolados diazotróficos heterotróficos de um estuário tropical e mar costeiro foram relatados como pertencentes ao gênero *Bacillus*. A espécie com maior potencial de fixação de  $N_2$  foi *B. megaterium* (210 nmol  $C_2H_4$   $mg^{-1}$  proteína por dia) seguida por *B. flexus* (109 nmol  $C_2H_4$   $mg^{-1}$  proteína por dia) e *B. circulans* (98 nmol  $C_2H_4$   $mg^{-1}$  proteína por dia) (YOUSUF et al., 2017).

A diversidade de 395 cepas de *Bacilli* foi investigada em seis zonas agroecológicas de cultivo de trigo da Índia e várias espécies demonstraram a capacidade de fixação de  $N_2$ . A fixação de  $N_2$  variou de 11 nmol etileno  $h^{-1}mg^{-1}$  proteína em *Bacillus altitudinis* BPZ4 a 98 nmol etileno  $h^{-1}mg^{-1}$  proteína em *Bacillus fusiformis* BNW5 (VERMA et al., 2016).

As cepas *Klebsiella* sp. Br1, *Klebsiella pneumoniae* Fr1, *Bacillus pumilus* S1r1 e *Acinetobacter* sp. S3r2 foram testadas como PGPMs em milho e a inoculação de *B. pumilus* S1r1 se destacou apresentando a maior capacidade de fixação de  $N_2$  antes da antese (262 mg  $N_2$  fixado planta $^{-1}$ ) e na colheita das espigas (304 mg  $N_2$  planta fixado planta $^{-1}$ ) (KUAN et al., 2016).

O estabelecimento de relações simbióticas ou associações entre diazotróficos e culturas de interesse comercial, a fim de reduzir a demanda de fertilizantes nitrogenados, é um dos grandes objetivos da agricultura, nesse sentido, avanços recentes na compreensão da fixação de nitrogênio endossimbiótico, associativo e endofítico com leguminosas e não leguminosas pode

podem contribuir para a criação, por engenharia genética, de cultivares de não leguminosas capazes de fixar nitrogênio (MUS et al., 2016).

### 2.2.2. Micro-organismos disponibilizadores de P

O aumento da disponibilidade de P por micro-organismos ocorre pela produção das fitases. 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. A primeira fitase foi descoberta em 1907 (SUZUKI; YOSHIMURA; TAKAISHI, 1907).

As fitases utilizam diferentes mecanismos catalíticos. Embora todas as fitases atuem na hidrólise do ácido fítico (VINCENT; CROWDER; AVERILL, 1992), a diversidade das enzimas permite sua atuação em diversos meios. O primeiro e mais extensivamente estudado grupo de fitases pertence à classe das fosfatases ácidas histidina (HAPs) (VAN ETTEN et al., 1991), os outros grupos de fitase são classificadas como  $\beta$ -hélice fosfatase (BPP; também descrita como fitase alcalina) (HA et al., 1999), fosfatase púrpura ácida (PAP; metaloenzimas) (HEGEMAN & GRABAU, 2001), e proteína tirosina fosfatase [PTP; também referida como fosfatase de dupla especificidade (DSP) ou fitase cisteína] (CHU et al., 2004). Este conjunto de mecanismos catalíticos distintos torna possível a expansão das aplicações das fitases e a gama de ambientes e condições químicas em que elas podem funcionar (LEI et al., 2013).

Os gêneros *Bacillus*, *Trichoderma* e *Aspergillus* vêm sendo relatados como produtores de variadas quantidades de fitases (Tabela 5) e promotores de crescimento em plantas. A cepa *Bacillus aryabhatai* RS1 isolada da rizosfera, produziu fitases extracelulares ativas em baixas temperaturas e a inoculação bacteriana foi efetiva para a germinação e crescimento de plântulas de grão-de-bico sob condições limitantes de fosfato (PAL ROY; DATA; GHOSH, 2017). A inoculação da cepa *B. subtilis* KPS-11, produtora de fitase, aumentou os comprimentos radicular e da parte aérea, e a biomassa radicular e da parte aérea de batata (*Solanum tuberosum* L.) (HANIF et al., 2015). Três cepas isoladas de solos contaminados com patógenos vegetais foram identificadas como *B. amyloliquefaciens* e foram capazes de degradar fitato extracelular. A maior atividade de fitase foi descrita na cepa FZB45, e a adição do filtrato da cultura estimulou o crescimento de plântulas de milho em condições limitantes de fosfato e presença de fitato (IDRISS et al., 2002).

Para *Trichoderma*, a inoculação da cepa *Trichoderma asperellum* Q1, capaz de solubilizar fosfatos orgânicos e inorgânicos, aumentou a atividade e o crescimento radicular de pepino (ZHAO; ZHANG, 2015). Em outro estudo, foram isoladas cepas de *Trichoderma* spp. da rizosfera de *A. marina*, e o isolado TSK8 quando inoculado em solo suplementado com  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , aumentou significativamente a biomassa de mudas de *Avicennia marina* (SARAVANAKUMAR; ARASU; KATHIRESAN, 2013). Em experimento em sistema hidropônico suplementado com 60 mM de cloreto de sódio a inoculação dos micro-organismos produtores de fitase *T. harzianum* e *A. niger*, aumentaram significativamente o crescimento da parte aérea de trigo. A produção de fitase por *A. niger* se destacou em relação a *T. harzianum*, sendo recomendado como bioinoculante para melhorar a disponibilidade de P no solo, promover o crescimento das plantas e aliviar o efeito adverso do estresse salino (GAIND, 2016).

Os resultados positivos da produção de fitase por *A. niger* foram descritos em outro estudo em que a dose 12 IU de fitase foi suficiente para hidrolisar fitato e aumentar a assimilação do fósforo em cerca de 74% e aumentar a relação parte aérea/comprimento total em cerca de 200%, indicando efeito promotor de crescimento em trigo (*Triticum aestivum* Linn.) (GUJAR et al., 2013).

Tabela 5. Produção de fitase (E.C. 3.1.3.8) por diferentes espécies de micro-organismos dos gêneros *Bacillus*, *Trichoderma* e *Aspergillus*.

Micro-organismo	Atividade de fitase	Referência
<i>B. aryabhatai</i>	20-35 U mL <sup>-1</sup> *	Pal Roy; Data; Ghosh (2017)
<i>B. subtilis</i> KPS-11	4,3 x 10 <sup>-10</sup> kat mg <sup>-1</sup> proteína**	Hanif et al. (2015)
<i>B. amyloliquefaciens</i>	0,03 - 0,35 U mL <sup>-1</sup> *	Idriss et al. (2002)
<i>Trichoderma</i> spp.	318 U mL <sup>-1</sup> *	Saravanakumar et al. (2013)
<i>T. asperellum</i> Q1	0,17 U mL <sup>-1</sup> *	Zhao e Zhang (2015)
<i>T. harzianum</i>	0,9 - 5 EU Pi g <sup>-1</sup> massa fúngica min <sup>-1</sup> **	Gaind (2016)
<i>A. niger</i>	4 - 12 EU Pi g <sup>-1</sup> massa fúngica min <sup>-1</sup> **	
<i>A. niger</i>	625 IU mg <sup>-1</sup> proteína**	Gujar et al. (2013)
<i>A. oryzae</i> SBS50	157 U mL <sup>-1</sup> *	Sapna e Singh (2013)

\*Produtividade

\*\*Atividade

### 3. Limitações e desafios

Embora extensas pesquisas visando à aplicação dos PGPMs como uma alternativa para a agricultura sustentável venham sendo realizadas mundialmente, ainda existem muitos gargalos impedindo a produção de PGPMs em larga escala (ABHILASH et al., 2016). A qualidade,

regulamentação e eficácia dos inoculantes microbianos são áreas que ainda necessitam foco e emprego de expertises científicas para impulsionar o mercado (VOSÁTKA; ALBRECHTOVÁ; PATTEN, 2008).

A eficiência dos PGPMs na agricultura é influenciada por variáveis experimentais, *design* do produto, substrato, dose aplicada e validade do inóculo (OWEN et al., 2015). Além disso, o sucesso futuro das formulações microbianas depende também de áreas multidisciplinares como agrobiotecnologia, tecnologia industrial e ciências dos materiais (ABHILASH et al., 2016). Porém, as pesquisas com PGPMs que objetivam desenvolver inoculantes para a área agrônômica têm focado no isolamento de micro-organismos, triagem de características desejáveis, seleção de linhagens eficientes para aplicação em campo e produção de formulações de inóculos adequadas (PANDEY; YARZÁBAL, 2018). A maioria dos estudos são focados em ensaios laboratoriais em vasos, havendo uma escassez de testes robustos em condições de campo (OWEN et al., 2015).

A eficácia dos produtos biológicos é prejudicada pela adesão de padrões inadequados de qualidade ao processo e conhecimento insuficiente sobre as interações complexas que ocorrem na rizosfera, que envolvem variáveis ambientais (ex. pH, umidade, temperatura e reações de oxirredução) e que podem afetar as interações micro-organismo-solo-planta, culminando em relatos contraditórios sobre o desempenho desses produtos no campo (OWEN et al., 2015). Também é importante aprofundar os conhecimentos sobre a interação micro-organismo-solo-planta com o clima, a fim de compreender os mecanismos de sobrevivência e adaptação de plantas sob condições climáticas variáveis. Este conhecimento pode ser utilizados para realizar modificação da rizosfera, a fim de promover um ambiente viável para a produção agrícola sustentável (DUBEY et al., 2016).

O melhor entendimento sobre a dinâmica dos fatores edáficos e bióticos que afetam a dinâmica dos solos é o desafio central para a intensificação da agricultura sustentável, nesse sentido, técnicas moleculares são essenciais para promover análises mais precisas dos PGPMs (OWEN et al., 2015). Para aprimorar a eficácia dos PGPMs é necessário estabelecer doses e densidades do propágulo para cada finalidade, nesse sentido, o desenvolvimento de sondas de DNA podem auxiliar na quantificação dos limites de eficácia (VOSÁTKA; ALBRECHTOVÁ; PATTEN, 2008). Além disso, para explorar as interações benéficas da rizosfera, são necessários estudos transcriptômicos, proteômicos e metabolômicos a fim de entender a regulação de novos genes, proteínas e metabólitos que afetam os processos fotossintéticos, metabolismo de

carbono, e síntese de aminoácidos, açúcares e amido em plantas e suas interações com o microbioma (DUBEY et al., 2016).

A ausência de regulamentações governamental para a produção desses inoculantes tem impulsionado a criação de organizações, como a europeia, Federation of European Mycorrhizal Fungi Producers e as americanas, International Mycorrhizal Manufacturers Association e a International Mycorrhizal Society, que visam melhorar a confiabilidade do setor e estabelecer padrões para fabricantes globais de produtos micorrízicos (OWEN et al., 2015). Essas organizações são um ponto positivo para o desenvolvimento do setor biotecnológico de micorrizas, pois, para assegurar que o mercado não seja afetado por produtos ineficientes, é necessário estabelecer padrões de qualidade que também atuam como uma barreira à entrada de produtores menos conscientes (VOSÁTKA; ALBRECHTOVÁ; PATTEN, 2008).

#### 4. Perspectivas futuras e conclusões

Nesta revisão, foi possível evidenciar as possibilidades de aplicação de micro-organismos dos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Bacillus* como PGPMs, por diferentes mecanismos, como a produção ou supressão de fitohormônios, fixação de N ou disponibilização de P. Com base nos dados disponíveis, aparentemente, cepas nativas de *Bacillus* sp., *Aspergillus* sp. e *Trichoderma* sp. estão entre as mais promissoras para o desenvolvimento de formulações comerciais de fácil aplicação em condições de campo (PANDEY et al., 2018).

Os micro-organismos e sua relação benéfica com plantas são uma alternativa promissora e ambientalmente sustentável para a agricultura mundial (BERG, 2009). Assim, em um futuro próximo, há forte tendência de crescimento do mercado de inoculantes microbianos. O estabelecimento de bioinoculantes comerciais deve gerar ganho econômico, tanto pelo aumento no rendimento da produção quanto pela aplicação reduzida de fertilizantes inorgânicos, assim, os PGPMs não devem substituir os agroquímicos, mas atuar de forma integrada (OWEN et al., 2015).

Apesar do grande potencial de aplicação dos PGPMs para a agricultura sustentável, alguns fatores necessitam de melhor compreensão para que as formulações microbianas comerciais tenham sucesso quando aplicadas em campo. Para que os estudos futuros com PGPMs contribuam com o estabelecimento de formulações comerciais, as pesquisas devem ser realizadas em maior escala e em diferentes condições ambientais. Também deve ser

considerado o estabelecimento de interações com outras áreas do conhecimento, tais como agrobiotecnologia, tecnologia industrial e ciências dos materiais. Os resultados devem considerar não apenas as alterações morfológicas nos vegetais, mas também as modificações transcriptômicas, proteômicas e metabolômicas resultantes da interação planta-microorganismo. Assim, as formulações microbianas compostas pelos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Bacillus*, terão maior chance de sucesso na tarefa de aumentar a produção de alimentos para a população humana crescente.

## 5. Referências Bibliográficas

- ABHILASH, P. C.; DUBEY, R. K.; TRIPATHI, V.; GUPTA, V. K.; SINGH, H. B. Plant growth-promoting microorganisms for environmental sustainability. **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 11, p. 847–850, 2016.
- AI'SHAH, O. N.; THAREK, M.; KEYEO, F.; KENG, C. L.; ZAMZURI, I.; RAMLI, A. M. Y.; AMIR, H. G. Influence of indole-3-acetic acid (IAA) produced by diazotrophic bacteria on root development and growth of *in vitro* oil palm shoots (*Elaeis guineensis* jacq.). **Journal of Oil Palm Research**, v. 25, n. 1, p. 100-107, 2013.
- ASARI, S.; TARKOWSKÁ, D.; ROLČÍK, J.; NOVÁK, O.; PALMERO, D. V.; BEJAL, S.; MEIJER, J. Analysis of plant growth-promoting properties of *Bacillus amyloliquefaciens* UCMB5113 using *Arabidopsis thaliana* as host plant. **Planta**, v. 245, n. 1, p. 15–30, 2017.
- AZIZ, Z. F. A.; HALIMI, M. S.; KUNDAT, F. R.; JIWAN, M.; WONG, S.K. Rhizobacterium *Bacillus cereus* induces root formation of pepper (*Piper nigrum* L.) stem cuttings. **Research in Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 23–30, 2015.
- BABU, A. G.; SHIM, J.; BANG, K.; SHEA, P. J.; OH, B. *Trichoderma virens* PDR-28: a heavy metal-tolerant and plant growth-promoting fungus for remediation and bioenergy crop production on mine tailing soil. **Journal of Environmental Management**, v. 132, p. 129–134, 2014.
- BAKSHI, A.; SHEMANSKY, J. M.; CHANG, C.; BINDER, B. M. History of research on the plant hormone ethylene. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 34, n. 4, p. 809–827, 2015.
- BARCANSKA, H.; SAJDAK, M.; SZCZYPKA, K.; SWIENTEK, A. TWOREK, M.; KUREK, M. Atrazine, triketone herbicides, and their degradation products in sediment, soil

and surface water samples in Poland. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 1, p. 644–658, 2017.

BERG, G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: Perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 1, p. 11–18, 2009.

CHANCLUD, E.; MOREL, J. Plant hormones: a fungal point of view. **Molecular Plant Pathology**, v. 17, n. 8, p. 1289–1297, 2016.

CHU, H.M.; GUO, R.T.; LIN, T.W.; CHOU, C.C.; SHR, H.L.; et al. Structures of *Selenomonas ruminantium* phytase in complex with persulfated phytate: DSP phytase fold and mechanism for sequential substrate hydrolysis. **Structure**, v. 12, p. 2015–2024, 2004.

CONTARDO-JARA, V.; KLINGELMANN, E.; WIEGAND, C. Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup Ultra in *Lumbriculus variegatus* and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 1, p. 57–63, 2009.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A., MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.; CORTÉS-PENAGOS, C., LÓPEZ-BUCIO, J. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v.149, p. 1579–1592, 2009.

DUBEY, R. K.; TRIPATHI, V.; DUBEY, P. K.; SINGH, H. B.; P.C. ABHILASH, P. C. Exploring rhizospheric interactions for agricultural sustainability: the need of integrative research on multi-trophic interactions. **Journal of Cleaner Production**, v. 115, p. 362–365, 2016.

DUBOIS, M.; VAN DEN BROECK, L.; INZÉ, D. The pivotal role of ethylene in plant growth. **Trends in Plant Science**, v. 23, n. 4, p. 311–323, 2018.

DUCA, D.; LORV, J.; PATTEN, C. L.; ROSE, D.; GLICK, B. R. Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 106, n. 1, p. 85–125, 2014.

DVORÁKOVÁ, J. Phytase: Sources, preparation and exploitation. **Folia Microbiol.**, v. 43, p. 323–338, 1998.

FU, L.; LU, X.; TAN, J.; WANG, L.; CHEN, J. Multiresidue determination and potential risks of emerging pesticides in aquatic products from Northeast China by LC-MS/MS. **Journal of Environmental Sciences**, v. 63, p. 116–125, 2017.

GAIND, S. Phosphate dissolving fungi: mechanism and application in alleviation of salt stress

in wheat. **Microbiological Research**, v. 193, p. 94–102, 2016.

GOVARTHANAN, M.; MYTHILI, R.; SELVANKUMAR, T.; KAMALA-KANNAN, S.; KIM, H. Myco-phytoremediation of arsenic- and lead-contaminated soils by *Helianthus annuus* and wood rot fungi, *Trichoderma* sp. isolated from decayed wood. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 151, p. 279–284, 2018.

GUJAR, P. D.; BHAVSAR, K. P.; KHIRE, J. M. Effect of phytase from *Aspergillus niger* on plant growth and mineral assimilation in wheat (*Triticum aestivum* Linn.) and its potential for use as a soil amendment. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 9, p. 2242–2247, 2013.

GUTIÉRREZ-MAÑERO, F. J.; RAMOS-SOLANO, B.; PROBANZA, A.; MEHOUACHI, J.; TADEO, F. R.; TALON, M. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. **Physiologia Plantarum**, v. 111, p. 206–211, 2001.

GUZMÁN-GUZMÁN, P.; PORRAS-TRONCOSO, M. D.; OLMEDO-MONFIL, V.; HERRERA-ESTRELLA, A. *Trichoderma* species: versatile plant symbionts. **Phytopathology**, 2018.

HA, N.C.; KIM, Y.O.; OH, T.K.; OH, B.H. Preliminary X-ray crystallographic analysis of a novel phytase from a *Bacillus amyloliquefaciens* strain. **Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.**, v. 55, p. 691–93, 1999.

HAN, S.; LI, X.; AMOMBO, E.; FU, J.; XIE, Y. Cadmium tolerance of perennial ryegrass induced by *Aspergillus aculeatus*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1–13, 2018.

HANIF, M. K.; HAMEED, S.; IMRAN, A.; NAQQASH, T.; SHAHID, M.; VAN ELSAS, J. D. Isolation and characterization of a  $\beta$ -propeller gene containing phosphobacterium *Bacillus subtilis* strain KPS-11 for growth promotion of potato (*Solanum tuberosum* L.). **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1–12, 2015.

IDRISS, E.E.; MAKAREWICZ, O.; FAROUK, A.; ROSNER, K.; GREINER, R.; BOCHOW, H.; RICHTER, T.; BORRIS, R. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. **Microbiology**, v. 148, p. 2097–2109, 2002.

IQBAL, A.; HASNAIN, S. Auxin producing bacilli: potential candidates in growth stimulation of *Vigna radiata*. (L.). **International Proceedings of Social and Behavioral Sciences**, v. 1, n.1, p. 145-151, 2013.

ISLAM, F.; WANG, J.; FAROOQ, M. A.; KHAN, M. S. S.; XU, L.; ZHU, J.; ZHAO, M.; MUÑOS, S.; QING X. LI, Q. X.; ZHOU, W. Potential impact of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on human and ecosystems. **Environment International**, v. 111, p. 332–351, 2017.

KIM, M. J.; RADHAKRISHNAN, R.; KANG, S. M.; YOU, Y. H.; JEONG, E. J.; KIM, J. G.; LEE, I. J. Plant growth promoting effect of *Bacillus amyloliquefaciens* H-2-5 on crop plants and influence on physiological changes in soybean under soil salinity. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 23, n. 3, p. 571–580, 2017.

KUAN, K. B.; OTHMAN, R.; RAHIM, K. A.; SHAMSUDDIN, Z. H. Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation to enhance vegetative growth, nitrogen fixation and nitrogen remobilisation of maize under greenhouse conditions. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–19, 2016.

KUMAR, K.; MANIGUNDAN, K.; AMARESAN, N. Influence of salt tolerant *Trichoderma* spp. on growth of maize (*Zea mays*) under different salinity conditions. **Journal of Basic Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 141–150, 2017.

LEI, X. G.; WEAVER, J. D.; MULLANEY, E.; ULLAH, A. H.; AZAIN, M. J. Phytase, a new life for an “old” enzyme. **Annual reviews further**, p. 283-309, 2013.

LIU, T.; CHEN, D.; LI, Y.; WANG, X.; WANG, F. Enantioselective bioaccumulation and toxicity of the neonicotinoid insecticide Dinotefuran in earthworms (*Eisenia fetida*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 17, p. 4531–4540, 2018.

MARKETS & MARKETS. **Agricultural biologicals market by type (biopesticides, biofertilizers, and biostimulants), source (microbials and biochemicals), mode of application (foliar spray, soil treatment, and seed treatment), application, and region - global forecast to 2022.** Disponível em: <<http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/agricultural-biological.asp>>. Acesso em: 20 mai. 2018.

MAOUGAL, R. T.; BRAUMAN, A.; C. PLASSARD, C.; ABADIE, J.; DJEKOUN, A.; DREVON, J.J. Bacterial capacities to mineralize phytate increase in the rhizosphere of nodulated common bean (*Phaseolus vulgaris*) under P deficiency. **European Journal of Soil Biology**, v. 62, p. 8-14, 2014.

MARTÍNEZ-HIDALGO, P.; MAYMON, M.; PULE-MEULENBERG, F.; HIRSCH, A. M. Engineering root microbiomes for healthier crops and soils using beneficial, environmentally safe bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, p. 1-14, 2018.

MENG, Q.; JIANG, H.; HAO, J. J. Effects of *Bacillus velezensis* strain BAC03 in promoting plant growth. **Biological Control**, v. 98, p. 18–26, 2016.

MILLER, C. O.; SKOOG, F.; SALTZA, M. H. V.; STRONG, F. M. Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. **Journal of the American Chemical Society**, v. 77, n. 5, p. 1392, 1955.

MULLIN, C. A.; FRAZIER, M.; FRAZIER, J. L.; ASHCRAFT, S.; SIMONDS, R.; VANENGELSDORP, D.; PETTIS, J. S. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. **PLoS ONE**, v. 5, n. 3, 2010.

MUS, F.; CROOK, M. B.; GARCIA, K.; COSTAS, A. G.; GEDDES, B. A.; KOURI, E. D.; PARAMASIVAN, P.; RYU, M.; OLDROYD, G. E. D.; POOLE, P. S.; UDVARDI, M. K.; VOIGT, C. A. Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to nonlegumes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 3, p. 3698–3710, 2016.

NKEBIWE, P. M.; WEINMANN, M.; BAR-TAL, A.; MÜLLER, T. Fertilizer placement to improve crop nutrient acquisition and yield: a review and meta-analysis. **Field Crops Research**, v. 196, p. 389–401, 2016.

OWEN, D.; WILLIAMS, A. P.; GRIFFITH, G. W.; WITHERS, P. J.A. Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorous acquisition. **Applied Soil Ecology**, v. 86, p. 41–54, 2015.

PAL ROY, M.; DATTA, S.; GHOSH, S. A novel extracellular low-temperature active phytase from *Bacillus aryabhatai* RS1 with potential application in plant growth. **Biotechnology Progress**, v. 33, n. 3, p. 633–641, 2017.

PANDEY, A.; YARZÁBAL, L. A. Bioprospecting cold-adapted plant growth promoting microorganisms from mountain environments. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 1–15, 2018.

PATEL, O.; SYAMLAL, G.; HENNEBERGER, P. K.; ALARCON, W. A.; MAZUREK, J. M. Pesticide use, allergic rhinitis, and asthma among US farm operators. **Journal of Agromedicine**, v. 23, n. 4, p. 327–335, 2018.

PAZ, I.C.P.; SANTIN, R.C.M.; GUIMARÃES, A.M.; ROSA, O.P.P.; DIAS, A.C.F.; QUECINE, M.C.; AZEVEDO, J.L.; MATSUMURA, A.T.S. Eucalyptus growth promotion by endophytic *Bacillus* spp. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n. 4, p. 3711–3720, 2012.

PUPPALA, K. R.; NAIK, T.; SHAIK, A.; DASTAGER, S.; KUMAR V, R.; KHIRE, J.; DHARNE, M. Evaluation of *Candida tropicalis* (NCIM 3321) extracellular phytase having

plant growth promoting potential and process development. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 13, p. 225–235, 2018.

RADHAKRISHNAN, R.; LEE, I. J. Gibberellins producing *Bacillus methylotrophicus* KE2 supports plant growth and enhances nutritional metabolites and food values of lettuce. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 109, p. 181–189, 2016.

RASCIO, N.; LA ROCCA, N. Biological nitrogen fixation. **Encyclopedia of Ecology**, v. 2, p. 264–279, 2013.

REETHA, S.; BHUVANESWARI, G.; THAMIZHINIYAN, P.; MYCIN, T. R. Isolation of indole acetic acid (IAA) producing rhizobacteria of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* and enhance growth of onion (*Allium cepa* L. ). **International Journal of Current Microbiology and Applied sciences**, v. 3, n. 2, p. 568–574, 2014.

REGLINSKI, T.; RODENBURG, N.; TAYLOR, J. T.; NORTHCOTT, G. L.; AH CHEE, A., SPIERS, T. M.; HILL, R. A. *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic resistance to *Diplodia pinea* in radiata pine (*Pinus radiata*) seedlings. **Forest Pathology**, v. 42, p. 75–78, 2012.

REQUENA, M.; PARRÓN, T.; NAVARRO, A.; GARCÍA, J.; VENTURA, M. I.; HERNÁNDEZ, A. F.; ALARCÓN, R. Association between environmental exposure to pesticides and epilepsy. **NeuroToxicology**, v. 68, p. 13–18, 2018.

RIZZA, A.; JONES, A. M. The makings of a gradient: spatiotemporal distribution of gibberellins in plant development. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 47, p. 9–15, 2019.

SABARWAL, A.; KUMAR, K.; SINGH, R. P. Hazardous effects of chemical pesticides on human health- cancer and other associated disorders. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 63, n. January, p. 103–114, 2018.

SAIKIA, J.; SARMA, R. K.; DHANDIA, R.; YADAV, A.; BHARALI, R.; GUPTA, V. K.; SAIKIA, R. Alleviation of drought stress in pulse crops with ACC deaminase producing rhizobacteria isolated from acidic soil of Northeast India. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–16, 2018.

SALAS-MARINA, M. A.; SILVA-FLORES, M. A.; MAYTE GUADALUPE CERVANTES-BADILLO, M. G.; ROSALES-SAAVEDRA, M. T.; ISLAS-OSUNA, M. A.; CASAS-FLORES, S. The plant growth-promoting fungus *Aspergillus ustus* promotes growth and induces resistance against different lifestyle pathogens in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 7, p. 686–696, 2011.

SAPNA; SINGH, B. Improved production of protease-resistant phytase by *Aspergillus oryzae* and its applicability in the hydrolysis of insoluble phytates. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 8, p. 891–899, 2013.

SARAVANAKUMAR, K.; ARASU, V. S.; KATHIRESAN, K. Effect of *Trichoderma* on soil phosphate solubilization and growth improvement of *Avicennia marina*. **Aquatic Botany**, v.104, p. 101-105, 2013.

SAUER, M.; ROBERT, S.; KLEINE-VEHN, J. Auxin: simply complicated. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 9, p. 2565–2577, 2013.

SHAN-SHAN, X.; HUI-JUN, W.; HAO-YU, Z.; LI-MING, W.; QING-QING, Z.; XUE-WEN, G. Plant growth promotion by spermidine-producing *Bacillus subtilis* OKB105. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 27, n. 7, p. 655–663, 2014.

SHAHAROONA, B.; ARSHAD, M.; WAQAS, R.; KHALID, A. Role of ethylene and plant growth-promoting rhizobacteria in stressed crop plants. In: VENKATESWARLU, B.; SHANKER, A. K.; SHANKER, C.; MAHESWARI, M. (Eds.). **Crop stress and its management: perspectives and strategies**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012. p. 429–446.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Auxin and plant-microbe interactions. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, p. 1–13, 2010.

SUZUKI, U.; YOSHIMURA, K.; TAKAISHI, M. Über ein enzyme ‘phytase’ das anhydro-oxy methylen diphosphorsäure’ spalter. **The bulletin of the College of Agriculture, Tokyo Imperial University**, v. 7, p. 503–512, 1907.

TAN, S.; JIANG, Y.; HUANG, S.S.J.; LING, N.; XU, Y.; SHEN, Q. Two *Bacillus amyloliquefaciens* strains isolated using the competitive tomato root enrichment method and their effects on suppressing *Ralstonia solanacearum* and promoting tomato plant growth. **Crop Protection**, v. 43, p. 134-140, 2013.

TSYGANKOV, V. Y.; LUKYANOVA, O. N.; BOYAROVA, M. D. Organochlorine pesticide accumulation in seabirds and marine mammals from the Northwest Pacific. **Marine Pollution Bulletin**, v. 128, p. 208–213, 2018.

VAN ETTEN, R. L.; DAVIDSON, R.; STEVIS, P. E.; MACARTHUR, H.; MOORE, D. L. Covalent structure, disulfide bonding, and identification of reactive surface and active site residues of human prostatic acid phosphatase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 2313–2319, 1991.

VANNINI, A.; GUARNIERI, M.; PAOLI, L.; SORBO, S.; BASILE, A.; LOPPI, S. Chemosphere bioaccumulation, physiological and ultrastructural effects of glyphosate in the lichen *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. **Chemosphere**, v. 164, p. 233–240, 2016.

VERMA, P.; YADAV, A. N.; KHANNAM, K. S.; KUMAR, S.; SAXENA, A. K.; SUMAN, A. Molecular diversity and multifarious plant growth promoting attributes of *Bacilli* associated with wheat (*Triticum aestivum* L.) rhizosphere from six diverse agro-ecological zones of India. **Journal of Basic Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 44–58, 2016.

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.

VITERBO, A.; LANDAU, U.; KIM, S.; CHERNIN, L.; CHET, I. Characterization of ACC deaminase from the biocontrol and plant growth-promoting agent *Trichoderma asperellum* T203. **FEMS Microbiology Letters**, v. 305, n. 1, p. 42–48, 2010.

VOSÁTKA, M.; ALBRECHTOVÁ, J.; PATTEN, R. The international market development for mycorrhizal technology. In: VARMA, A. (Ed.). **Mycorrhiza**. Springer Berlin Heidelberg, 2008. p. 419–438.

WANG, W.; WU, Z.; HE, Y.; HUANG, Y.; LI, X.; YE, B. Plant growth promotion and alleviation of salinity stress in *Capsicum annuum* L. by *Bacillus* isolated from saline soil in Xinjiang. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 164, p. 520–529, 2018.

WU, Y. JING, X.; GAO, C.; HUANG, Q.; Cai, P. Recent advances in microbial electrochemical system for soil bioremediation. **Chemosphere**, v. 211, p. 156–163, 2018.

WYBOUW, B.; DE RYBEL, B. Cytokinin – a developing story. **Trends in Plant Science**, v. xx, p. 1–9, 2018.

YADAV, R. H. Indole acetic acid production by *Bacillus popilliae* isolated from few legume plants rhizosphere soils. **International Proceedings of Social and Behavioral Sciences**, v. 1, n.1, p. 58-63, 2013.

YADAV, J.; PRAKASH, J.; TIWARI, K. N. Plant growth promoting activities of fungi and their effect on chickpea plant growth. **Asian Journal of Biological Sciences**, v. 4, n. 3, p. 291–299, 2011.

YOUSUF, J.; JABIR, T.; MUJEEB, R.; SOUMYA, K.; ANEESA, A. P.; ABDULLA, M. H. A. Nitrogen fixing potential of various heterotrophic *Bacillus* strains from a tropical estuary and adjacent coastal regions. **Journal of Basic Microbiology**, v. 57, n. 11, p. 922–932, 2017.

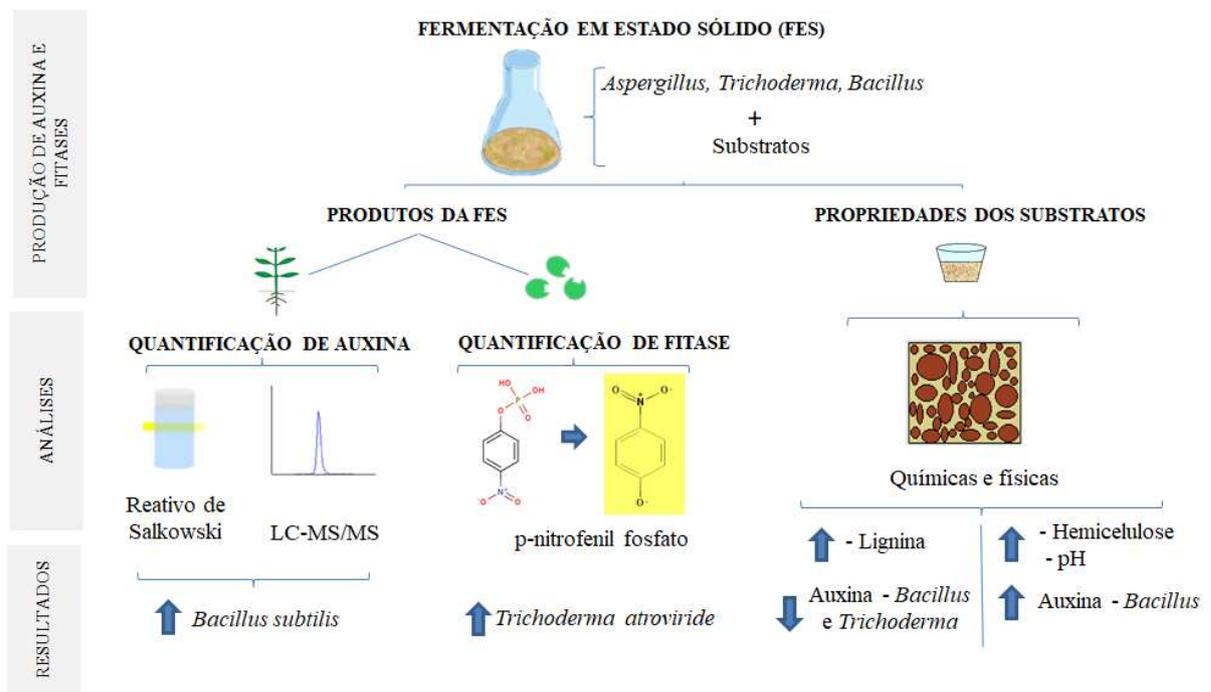
ZHAO, L.; ZHANG, Y. Q. Effects of phosphate solubilization and phytohormone production of *Trichoderma asperellum* Q1 on promoting cucumber growth under salt stress. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 14, n. 8, p. 1588–1597, 2015.

ZHAO, Y. Auxin biosynthesis: a simple two-step pathway converts tryptophan to indole-3-acetic acid in plants. **Molecular Plant**, v. 5, n.2, p. 334-338, 2012.

Capítulo 2: *Screening* de cepas de *Aspergillus*, *Bacillus* e *Trichoderma* e influência das propriedades dos substratos na produção ácido indol-3-acético e fitases por fermentação em estado sólido

Débora Zanoni do Prado, Clarissa Hamaio Okino-Delgado, Mirella Rossitto Zanutto, Richardson Barbosa Gomes da Silva, Milene Stefani Pereira, Linda Jahn, Jutta Ludwig-Müller, Magali Ribeiro da Silva, Edvaldo Domingues Velini, Luciana Francisco Fleuri

**Resumo gráfico**



## Resumo

A inoculação de micro-organismos em plantas vem sendo realizada com o objetivo de estimular o desenvolvimento vegetal por mecanismos que incluem a produção do fitohormônio ácido indol-3-acético (AIA) e enzimas solubilizadoras de P, as fitases. O presente trabalho objetivou produzir AIA e fitases por micro-organismos dos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Bacillus* utilizando a técnica de fermentação em estado sólido (FES) e correlacionar as características dos substratos macroporosidade, microporosidade, retenção de água, condutividade elétrica, pH, proteína bruta, lipídeos, hemicelulose, celulose e lignina à produtividade das biomoléculas, visando otimizar o bioprocesso. As análises em LC-MS/MS indicaram que micro-organismos de todos os gêneros produziram AIA por via dependente de triptofano. A combinação da cepa *B. subtilis* (D) e farelo de trigo resultou na maior produtividade de AIA e derivados ( $158 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), enquanto a cepa de *T. atroviride* cultivada em grãos de destilaria secos com solúveis de milho resultou na maior atividade de fitases ( $2080 \text{ U mg}^{-1}$  de proteína) ( $p \leq 0,05$ ). Foi observada ausência de fortes correlações entre a produção de fitase e as características dos substratos. Houve forte correlação negativa entre AIA produzido por *Trichoderma* e lignina ( $-0,688$ ). O AIA produzido por *Bacillus* apresentou forte correlação negativa com lignina ( $-0,819$ ) e fortes correlações positivas com pH ( $0,772$ ), microporos ( $0,575$ ), retenção de água ( $0,571$ ) e hemicelulose ( $0,683$ ) ( $p \leq 0,01$ ). Assim, são recomendados substratos com com pHs próximos ao neutro, com maior concentração de hemicelulose e de microporos para a produção de auxina por *Bacillus* e substratos com baixa concentração de lignina para aumentar a produção de auxina por *Bacillus* e *Trichodema*.

**Palavras-chave:** ácido indol-3-acético, fósforo, fermentação em estado sólido, bioprocesso, triptofano.

## 1. Introdução

Micro-organismos vêm sendo utilizados como aditivos na agricultura com o objetivo de estimular o desenvolvimento de plantas. Dentre os mecanismos utilizados pelos micro-organismos estão a produção da biomolécula ácido indol-3-acético (AIA) e da enzima fitase (ACUÑA; JORQUERA, 2011).

O AIA está associado a diversos processos fisiológicos em plantas, tais como dominância apical, tropismos, alongamento da parte aérea, indução da divisão celular cambial e iniciação radicular (ZHAO, 2010). Diversas classes de micro-organismos possuem a habilidade de produzir AIA, entre eles agentes patogênicos de plantas, simbioses, rizobactérias e micro-organismos não comumente associados às plantas (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007). Associações microbianas com o sistema radicular e a rizosfera, podem exercer papel fundamental na disponibilidade de auxina para plantas, bem como aumentar a resistência a doenças e auxiliar na nutrição e absorção de água (ALMEIDA et al., 2017).

A ação das fitases no desenvolvimento vegetal ocorre pelo aumento da disponibilização de fósforo (P). A forma predominante de P nos solos é a orgânica (Po), representando até 80% do total, sendo que 50% destes estão na forma de fitato (Na-IHP), forma que é utilizada apenas marginalmente pelas plantas (HAYES; SIMPSON; RICHARDSON, 2000; RICHARDSON; HADOBAS; HAYES, 2000). O fitato pode ser hidrolisado pelas plantas ou por fitases microbianas produzindo ortofosfatos, forma disponível para a absorção vegetal (GEORGE et al., 2007).

A produção microbiana de diversas biomoléculas, como auxinas e fitases, pode ser realizada por fermentação, processo pelo qual micro-organismos catalisam nutrientes, sintetizam metabólitos secundários e completam outras atividades metabólicas em condições aeróbicas e anaeróbicas. Há dois tipos de fermentação: líquida (FL) e em estado sólido (FES). A fermentação líquida é a técnica mais comumente utilizada devido à uniformidade e fácil controle da temperatura, porém apresenta desvantagens, como alto consumo de energia e maior índice de poluição, limitando a sustentabilidade por esse bioprocessos (CHEN, 2013). Em contrapartida a FES é realizada na ausência ou baixa quantidade de água, em substrato com umidade suficiente para suportar o crescimento e a atividade metabólica do micro-organismo (THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013). Os substratos utilizados são, majoritariamente,

resíduos agro-industriais e subprodutos contribuindo para solucionar descartes excedentes e reduzindo problemas de poluição (SINGH NEE NIGAM; PANDEY, 2009).

A FES pode ser regulada modificando as características do substrato. As características podem ser macroscópicas, como a massa seca e a porosidade, dinâmicas durante o processo fermentativo; e microscópicas, que incluem, principalmente, o crescimento microbiano, a adesão da superfície do substrato, bem como a decomposição do substrato pelo micro-organismo (CHEN, 2013). Os substratos servem como fonte de carbono e energia na FES e possuem estrutura comum composta majoritariamente por celulose, amido, pectina e lignocelulose (SINGHANIA et al., 2016); porém, ainda desconhece-se a influência isolada e conjunta dessas características na produção industrial por FES.

Este trabalho visou verificar a capacidade de produção de AIA e fitases por fermentação em estado sólido pelos micro-organismos *Aspergillus* spp., *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. nos substratos bagaço de mandioca, farelo de trigo, farelo de soja, grãos de destilaria secos com solúveis (DDGS) de sorgo e de milho e otimizar o processo produtivo pela elucidação da influência das características físicas e químicas dos substratos na produção das biomoléculas.

## 2. Material e métodos

### 2.1. Preparação do inóculo

Os micro-organismos *Aspergillus ustus* (Bainier.) Thom & Church (IOC 4410), *Aspergillus niger* van Tieghem (INCQS 40015), *Trichoderma atroviride* (IOC 4503), *Trichoderma koningii* (INCQS 40331), *Trichoderma harzianum* Rifai (IOC 3844), *Bacillus subtilis* (CCGB 0030), *Bacillus megaterium* (CCGB 0146), *Bacillus amyloliquefaciens* (CCGB 0145) foram obtidos da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). A cepa de *Aspergillus niger* 01 foi isolada pelo nosso grupo de pesquisa, morfológicamente identificada e depositado na Coleção Brasileira de Microrganismos Ambientais e Industriais sob o registro CBMAI 2084. As cepas de *Bacillus subtilis* (B, C, D, E, F, E27) foram obtidas da coleção do Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Todas as cepas microbianas foram registradas sob o nº. A3B348F na plataforma do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SISGEN), conforme preconizado pela Lei Brasileira da Biodiversidade (nº 13.123/15).

Os fungos foram cultivados em *slants* com meio *potato dextrose agar* (PDA) por 96 h a 30°C e as bactérias em *slants* com meio *tryptic soy agar* (TSA) por 24 h a 33°C. Após o crescimento, os *slants* foram armazenados a 4°C até o uso sob camada de vaselina esterilizada e repicados a cada três meses para manutenção da linhagem. O inóculo foi preparado suspendendo o conteúdo do *slant* em 6 mL de água esterilizada. A suspensão foi ajustada a  $10^7$  de esporos.mL<sup>-1</sup> e 2 mL desta suspensão foi inoculada no substrato da FES.

## 2.2. Fermentação em Estado Sólido (FES)

Para a avaliação da produção de AIA e fitase por FES foram utilizados os substratos bagaço de mandioca, (doado pela fecularia “Flor de Lótus”, localizada em Cândido Mota, São Paulo, Brasil), farelo de trigo, farelo de soja, grãos de destilaria secos com solúveis (DDGS) de sorgo e de milho (doados pela fábrica de ração da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil). O aminoácido triptofano (1%) foi adicionado aos substratos como indutor da produção de AIA. O meio utilizado para a FES foi composto de 50% de substrato e 50% de água destilada (m/m).

As suspensões microbianas foram inoculadas em 10 g de substrato em frascos Erlenmeyer (250 mL) e incubados a 30°C por 120 h. Após este período, foram adicionados 50 mL de água destilada aos frascos. O conteúdo foi homogeneizado por agitação manual e filtrado em duas camadas de gaze de algodão. O filtrado foi utilizado para os ensaios de AIA e fitase.

## 2.3. Atividade de fitase

A atividade enzimática de fitase foi determinada de acordo com o método de Stöckmann et al. (2003). Foram adicionados 1 mL de solução 5 mM 4-nitrofenilfosfato dissódico hexahidratado, 500 µL de tampão acetato (pH 5,0 e 0,8 M) e 10 a 500 µL do filtrado. O sistema foi incubado por 10 min em banho-maria a 37°C. A reação foi paralisada com 2 mL de solução hidróxido de sódio 0,1 M. As amostras foram centrifugadas por 10 min a 4.000 x g e 10°C e a liberação de *p*-nitrofenol lida a 410 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram calculados com base em uma curva padrão de *p*-nitrofenol.

As proteínas totais também foram quantificadas nos extratos microbianos para determinar a atividade específica das fitases. O meio de reação foi composto por 10 a 100 µL de extrato

microbiano, 900 µL de sulfito de sódio (24%, v/v) e 4,0 mL do reagente de Biureto. A mistura foi incubada por 30 min a temperatura ambiente e as leituras em absorbância realizadas a 535 nm. Os resultados foram calculados com base em curva de calibração de caseína (0 a 9 mg mL<sup>-1</sup>) (GORNALL; BARDAWILL; DAVID, 1949) e os resultados expressos como U de fitase por mg proteína<sup>-1</sup>.

#### 2.4. Quantificação de AIA e derivados

Para a quantificação da produção de AIA e derivados foi utilizada uma adaptação dos métodos propostos por Bric et al. (1991) e Sarwar et al. (1992). A quantificação ocorreu pela reação de 1 mL de extrato microbiano e 4 mL do reativo de Salkowski (2% de FeCl<sub>3</sub> em 35% de ácido perclórico) à temperatura ambiente. O branco foi composto de 1 mL do extrato dos substratos com adição de triptofano (1%, m/m) e 4 mL do reativo de Salkowski. Após 30 min de reação, as cepas produtoras de AIA ou análogos foram identificadas por coloração rosa/avermelhada. As leituras em absorbância foram realizada em espectrofotômetro a 535 nm e comparadas com curva padrão de ácido indol-3-acético, os resultados foram expressos em µg de ácido indol-3-acético mL<sup>-1</sup> de amostra.

#### 2.5. Quantificação de AIA por cromatógrafo líquido acoplado a espectrômetro de massas (LC-MS/MS)

Os extratos microbianos de *A. niger* em farelo de trigo, *B. subtilis* D em farelo de trigo e *T. atroviride* em farelo de soja foram preparados para injeção em LC-MS/MS por centrifugação a 4.000 x g por 10 min, seguida por filtração em membrana de 0,22 µm. Para a quantificação de AIA foi utilizado sistema LC-MS/MS, composto por Cromatógrafo a Líquido de Alta Eficiência (CLAE), modelo Proeminence UFLC (Shimadzu®, Quioto, Japão), equipado com duas bombas LC-20AD, auto-injetor SIL-20AC, degazeificador DGU-20A5, sistema controlador CBM-20A e forno CTO-20AC, acoplado ao espectrômetro de massas 3200 Q TRAP (Applied Biosystems®, Foster City, EUA).

A corrida ocorreu em coluna cromatográfica Synergi 2.5 µm Fusion RP 100 Å (Phenomenex), com 1% de ácido acético diluído em água mili-q (v/v) (fase A) e 1% de ácido acético diluído em metanol (v/v) (fase B) como fases móveis e vazão de 0,65 mL min<sup>-1</sup>,

seguindo o gradiente: 0-2 min, 45% fase B; 2-8 min, 95% da fase B; e 8-10 min, 45% de fase B. O tempo total de execução foi de 10 min, e o tempo de retenção do composto na coluna cromatográfica foi de 2,44 min, utilizando ionização por electrospray (ESI) no modo de ionização negativo.

## 2.6. Características químicas e físicas dos substratos

As propriedades químicas proteína bruta, lipídeos, hemicelulose, celulose, lignina, pH e condutividade elétrica foram determinadas segundo AOAC (2000). As propriedades físicas macroporosidade, microporosidade, porosidade total e retenção de água dos substratos foram determinadas de acordo com Guerrini e Trigueiro (2004).

## 2.7. Análises estatísticas

Os dados de produtividade de auxina e fitase foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e ao teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ), utilizando o software Assistat 7.7. Os resultados foram expressos como o valor médio de três replicatas biológicas (média  $\pm$  SD). Os resultados da produtividade das biomoléculas foram correlacionados às características físicas e químicas dos substratos utilizando correlação de Pearson ( $p \leq 0,01$ ), análise em que é estabelecida uma medida entre duas variáveis de +1 para -1, onde 1 é uma correlação linear positiva total, 0 não é uma correlação linear e -1 é uma correlação linear negativa total. A análise de correlação foi realizada usando o software Minitab® 17.1.0.

## 3. Resultados e discussão

### 3.1. Produção de ácido indol-3-acético e derivados

Como o estudo da produção de derivados de auxina por fermentação em estado sólido envolveu alta amostragem, as demais combinações micro-organismo e substrato foram avaliadas por método espectrofotométrico, pelo qual é possível estimar AIA e intermediários de sua via biossintética (GLICKMANN; DESSAUX, 1995). Os resultados mostraram que a maioria das linhagens analisadas é capaz de produzir AIA e derivados usando os diferentes

substratos. Vinte e seis combinações apresentaram produção acima de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ , além disso, foram evidenciadas diferenças na produção de derivados de AIA dependendo da espécie e do substrato.

A cepa *Bacillus subtilis* D cultivada em farelo de trigo apresentou a maior produção de AIA e derivados ( $158 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), em relação às demais combinações de substratos e cepas (Tabela 1). A elevada produção de AIA e derivados foi seguida por *B. amyloliquefaciens* cultivada em farelo de soja ( $141 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). As cepas de *B. subtilis* (CCGB 0030) em farelo de soja, *B. subtilis* E27 em farelo de trigo, *B. megaterium* em farelo de soja e farelo de trigo apresentaram a mesma capacidade de produção de AIA e derivados (aproximadamente  $110 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

O potencial de produção de auxinas por *Bacillus* sp. foi descrito em vários estudos. Cepas endofíticas de *Bacillus* spp. isoladas de plantas medicinais de Bangladesh e cultivadas em caldo Jensen contendo  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  de L-triptofano produziram de 6 a  $63 \mu\text{g mL}^{-1}$  de AIA, as duas cepas com maior produção de AIA foram identificados como *B. subtilis* BRtL-2 e *B. amyloliquefaciens* BDR por sequenciamento dos genes 16S rRNA (ANSARY et al., 2018).

Cepas de *Bacillus* spp. cultivadas em caldo contendo diferentes concentrações de L-triptofano ( $150$  e  $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) produziram diferentes quantidades de AIA e derivados, a cepa *Bacillus* sp. BHUJP-H2 produziu  $26 \mu\text{g mL}^{-1}$  de AIA e derivados independentemente da concentração de triptofano. Enquanto *B. subtilis* BHUJP-H1 e *B. licheniformis* BHUJP-H3 produziram, respectivamente,  $15$  e  $32 \mu\text{g mL}^{-1}$  de AIA e derivados com menor adição de triptofano e  $25$  e  $35 \mu\text{g mL}^{-1}$  de AIA e derivados com maior adição de triptofano. As linhagens e suas combinações melhoraram o crescimento de feijão-mungo (*Vigna radiata*), *Bacillus subtilis* BHUJP-H1, *B. subtilis* BHUJP-H1C + *B. licheniformis* BHUJP-H3 e *B. subtilis* BHUJP-H1C + *Bacillus* sp. BHUJP-H2C + *B. licheniformis* BHUJP-H3 foram descritas como os melhores tratamentos para o crescimento das plantas em comparação com o controle e outros (VERMA et al., 2018).

A linhagem endofítica, *B. subtilis* 10-4, cultivada em caldo Luria-Bertani suplementado com  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  de triptofano, produziu  $5,8 \mu\text{g mL}^{-1}$  de AIA e derivados e, quando inoculada em trigo (*Triticum aestivum* L.), aumentou significativamente o crescimento e biomassa das plantas sob condições não salinas e salinas ( $2\% \text{ NaCl}$ ) (LASTOCHKINA et al., 2017).

Tabela 1. Produção de fitases (U mg<sup>-1</sup> de proteína) e AIA e derivados (µg de ácido indol-3-acético mL<sup>-1</sup>) por micro-organismos dos gêneros *Aspergillus*, *Bacillus* e *Trichoderma*, 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).

Micro-organismo	Substrato	Fitase (U mg <sup>-1</sup> de proteína)	AIA e derivados (µg mL <sup>-1</sup> )
<i>A. niger</i> 01	FS	358,5 ± 40,9 f	37,7 ± 28,3 g
<i>A. niger</i> 01	FT	1536,4 ± 169,0 b	19,2 ± 14,8 h
<i>A. niger</i> 01	BM	84,3 ± 18,3 g	11,9 ± 1,9 i
<i>A. niger</i> 01	DS	332,6 ± 61,3 f	32,5 ± 4,0 h
<i>A. niger</i> 01	DM	541,4 ± 142,7 e	19,9 ± 1,0 i
<i>A. niger</i> 15	FS	267,0 ± 31,0 f	26,9 ± 0,70 h
<i>A. niger</i> 40015	FT	332,9 ± 50,8 f	7,8 ± 0,22 i
<i>A. niger</i> 40015	BM	8,55 ± 0,45 g	17,2 ± 1,2 i
<i>A. niger</i> 40015	DS	43,5 ± 8,6 g	45,1 ± 2,6 g
<i>A. niger</i> 40015	DM	333,1 ± 30,3 f	20,5 ± 1,5 i
<i>A. ustus</i>	FT	1,3 ± 0,18 g	81,3 ± 7,4 d
<i>A. ustus</i>	DS	9,3 ± 1,2 g	61,2 ± 11,5 g
<i>B. subtilis</i>	FS	0,48 ± 0,10 g	111,7 ± 22,8 c
<i>B. subtilis</i>	FT	0,67 ± 0,09 g	86,7 ± 9,5 d
<i>B. subtilis</i>	BM	0,58 ± 0,16 g	7,9 ± 4,0 i
<i>B. subtilis</i> B	FS	1,45 ± 0,18 g	75,3 ± 13,8 e
<i>B. subtilis</i> B	FT	1,01 ± 0,16 g	45,9 ± 6,6 g
<i>B. subtilis</i> B	BM	0,52 ± 0,08 g	6,2 ± 4,6 i
<i>B. subtilis</i> C	FS	1,56 ± 0,18 g	57,3 ± 4,5 f
<i>B. subtilis</i> C	FT	1,11 ± 0,03 g	85,2 ± 12,6 d
<i>B. subtilis</i> C	BM	0,88 ± 0,17 g	12,6 ± 3,2 i
<i>B. subtilis</i> D	FS	2,03 ± 0,05 g	78,0 ± 1,9 e
<i>B. subtilis</i> D	FT	1,00 ± 0,20 g	158,4 ± 16,8 a
<i>B. subtilis</i> D	BM	0,66 ± 0,06 g	-
<i>B. subtilis</i> E	FS	0,61 ± 0,09 g	78,6 ± 2,8 e
<i>B. subtilis</i> E	FT	0,46 ± 0,07 g	93,8 ± 16,6 d
<i>B. subtilis</i> E	BM	0,43 ± 0,03 g	3,2 ± 2,9 i
<i>B. subtilis</i> F	FS	0,76 ± 0,05 g	33,3 ± 3,2 h
<i>B. subtilis</i> F	FT	0,56 ± 0,08 g	89,3 ± 15,4 d
<i>B. subtilis</i> F	BM	1,64 ± 0,29 g	5,1 ± 2,5 i
<i>B. subtilis</i> 27	FS	0,90 ± 0,08 g	74,0 ± 5,6 e
<i>B. subtilis</i> 27	FT	2,00 ± 0,54 g	110,5 ± 13,4 c
<i>B. subtilis</i> 27	BM	1,00 ± 0,14 g	7,7 ± 3,7 i
<i>B. amyloliquefaciens</i>	FS	0,42 ± 0,09 g	140,8 ± 6,7 b
<i>B. amyloliquefaciens</i>	FT	0,33 ± 0,04 g	90,9 ± 2,2 d
<i>B. amyloliquefaciens</i>	BM	0,68 ± 0,05 g	13,1 ± 2,0 i
<i>B. megaterium</i>	FS	0,67 ± 0,06 g	116,5 ± 10,3 c
<i>B. megaterium</i>	FT	1,06 ± 0,25 g	118,4 ± 6,7 c
<i>B. megaterium</i>	BM	0,80 ± 0,05 g	13,3 ± 2,0 i

Tabela 1. Continuação.

<i>T. koningii</i>	FS	5,78 ± 0,53 g	70,5 ± 33,8 d
<i>T. koningii</i>	FT	50,8 ± 18,7 g	70,5 ± 9,7 d
<i>T. koningii</i>	BM	11,7 ± 0,13 g	23,6 ± 1,4 e
<i>T. koningii</i>	DS	60,4 ± 12,3 g	108,1 ± 5,5 b
<i>T. koningii</i>	DM	37,4 ± 5,1 g	65,8 ± 8,2 d
<i>T. harzianum</i>	FT	19,7 ± 2,5 g	97,3 ± 0,24 c
<i>T. harzianum</i>	BM	23,3 ± 2,0 g	19,9 ± 1,3 f
<i>T. harzianum</i>	DS	109,2 ± 17,2 g	95,3 ± 42,4 c
<i>T. harzianum</i>	DM	937,9 ± 65,5 c	33,0 ± 2,3 e
<i>T. atroviride</i>	FS	541,3 ± 65,3 e	103,3 ± 7,1 b
<i>T. atroviride</i>	FT	784,3 ± 305,5 d	60,8 ± 3,3 d
<i>T. atroviride</i>	BM	28,6 ± 2,4 g	1,1 ± 0,47 f
<i>T. atroviride</i>	DS	1013,2 ± 132,7 c	24,3 ± 2,7 e
<i>T. atroviride</i>	DM	2084,8 ± 405,5 a	30,5 ± 2,9 e

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott Knott ( $p \leq 0,05$ ).

As combinações de *Trichoderma*, *T. koningii* e DDGS de sorgo e *T. atroviride* e farelo de soja, também apresentaram produção superior de AIA e derivados, respectivamente, 108 e 103  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Tabela 1). Na literatura, a produção de metabólitos com potencial para promover o crescimento vegetal foi verificada em 101 genótipos de *Trichoderma* da Colômbia, dos quais 60% tinham capacidade de produzir ácido indol-3-acético ou análogos de auxina (HOYOS-CARVAJAL et al., 2009). Setenta cepas de *Trichoderma* spp. isoladas da rizosfera de solos indianos e inoculadas em caldo czapek-dox, produziram de 0,7 a 1,6  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de AIA e derivados sem adição de triptofano ao meio, e de 5,5 a 36,4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  com adição de triptofano (200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Um dos isolados (TRC3) foi o mais efetivo para aumentar o comprimento de raiz, área foliar, biomassa total e massa fresca de caule e folhas de milho (*Zea mays*) em condições de estresse salino (KUMAR et al., 2017).

Em nosso estudo, a produção de AIA e derivados por *Bacillus* e *Trichoderma* foi, respectivamente, de 2 a 26 vezes e de 3 a 18 vezes maior do que os resultados da literatura. Assim, notavelmente, a produção de AIA e derivados por *Bacillus* e *Trichoderma* por FES foi superior à produção por FL. Além disso, a FL requer meios de cultura mais complexos e de maior custo (compostos por substâncias purificadas), enquanto para a FES são utilizados meios de cultura de baixo custo (resíduos agroindustriais) e o produto (resíduo + micro-organismo) pode ser aplicado diretamente ao solo. Assim, consideramos a FES uma técnica promissora para fins agrícolas.

Para confirmar a produção de AIA por FES, foram realizadas análises em LC-MS/MS com uma combinação de cada gênero microbiano. Todas as combinações de cepas/substratos, *B. subtilis* D e farelo de trigo, *T. atroviride* e farelo de soja e *A. niger* 01 e farelo de trigo foram confirmadas como produtoras de AIA por vias dependentes de triptofano, visto que a adição do aminoácido aumentou, cerca de 10 vezes, a produção de AIA (Figura 1).

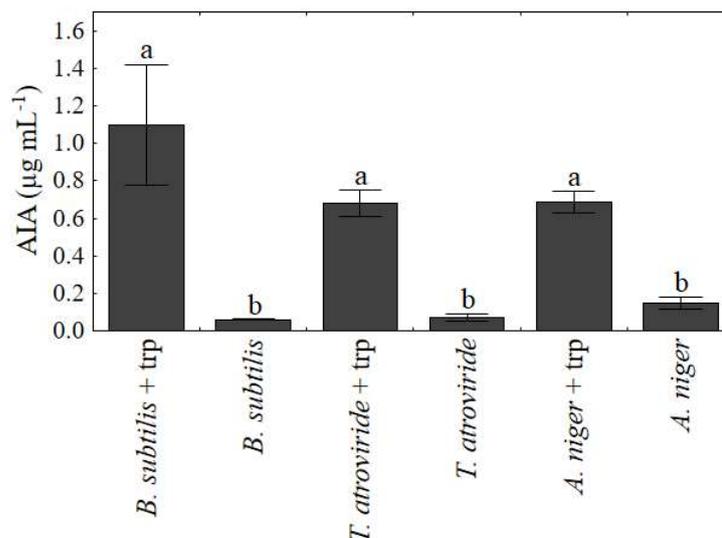


Figura 1. Quantificação em LC-MS/MS de ácido indol-3-acético (AIA) ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) nos extratos de *B. subtilis* D em farelo de trigo, *T. atroviride* em farelo de soja e *A. niger* 01 em farelo de trigo, com e sem adição de triptofano (Trp) (1% m/m) ao meio. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott Knott ( $p \leq 0,05$ ).

### 3.2. Produção de fitases

Os resultados da produção de fitase mostraram que um menor número de combinações (micro-organismo + substrato) foram capazes de produzir extratos com alta atividade, apenas 14 combinações apresentaram atividade acima de  $80 \text{ U mg de proteína}^{-1}$ , as maiores atividades foram observadas em *A. niger* e *T. atroviride*.

As combinações que resultaram nas maiores atividades de fitase foram *T. atroviride* em DDGS de milho ( $2000 \text{ U mg}^{-1}$  de proteína), seguida por *A. niger* 01 em farelo de trigo ( $1500 \text{ U mg}^{-1}$  de proteína). Inversamente à produção de AIA e derivados, as cepas de *Bacillus* apresentaram os resultados mais baixos para atividade de fitase (de  $0,3$  a  $2,0 \text{ U mg}^{-1}$  de proteína) (Tabela 1).

A alta produção de fitase por *A. niger* e *Trichoderma* vem sendo relatada em diversos trabalhos, corroborando os nossos resultados, bem como sua aplicabilidade em plantas tem sido descrita. A produção de fitase por *A. niger*, utilizando FES em farelo de trigo, após 5 dias de incubação atingiu 38 U g<sup>-1</sup> de substrato. Foi observado incremento na atividade de fitase (50,7 U g<sup>-1</sup> de substrato) quando utilizado meio composto de farelo de trigo, farelo de arroz e torta de amendoim na proporção 2:1:1 (SHIVANNA; VENKATESWARAN, 2014). A capacidade de produção de fitase por *A. niger* foi aplicada às plantas por transformação genética. As plantas modificadas adquiriram a habilidade de liberar fitase extracelular fúngica e de absorver P diretamente do fitato (RICHARDSON et al., 2005), solucionando problemas de indisponibilidade de P.

Em relação ao gênero *Trichoderma*, a cepa Q1 do micro-organismo *Trichoderma asperellum*, cultivada em meio líquido produziu 0,17 U mL<sup>-1</sup> de fitases e foi capaz de degradar uma grande quantidade de fosfato tricálcio e fosfato dibásico de cálcio (ZHAO; ZHANG, 2015). Em outro estudo, dez isolados de *Trichoderma* derivados da rizosfera de *A. marina* produziram de 160 a 350 U mL<sup>-1</sup> de fitases e solubilizaram de 1 a 29% de fosfato utilizando Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> como o fosfato insolúvel em experimento *in vitro*, demonstrando o potencial do gênero fúngico em aumentar a fertilidade do solo e o crescimento em zonas de mangue (SARAVANAKUMAR; ARASU; KATHIRESAN, 2013).

A baixa atividade de fitase pelo gênero *Bacillus*, em comparação com *Trichoderma* e *Aspergillus* também foi corroborada com estudos anteriores. A cepa *Bacillus* sp. KHU-10 produziu em condições ótimas 0,2 U mL<sup>-1</sup> de fitase, porém essas enzimas atuam em pH neutro, com alta estabilidade térmica e possuem especificidade de substrato para o complexo cálcico-fitato, características que favorecem aplicações comerciais e ambientais (FU et al., 2008).

### 3.3. Influência das características dos substratos na produção de auxinas e fitases

Foi observada grande variação da produção, tanto de AIA e derivados quanto de fitases, decorrente dos substratos. Por exemplo, não houve produção de AIA e derivados por *Bacillus subtilis* D usando bagaço de mandioca, enquanto, usando farelo de trigo a produção atingiu 158 µg mL<sup>-1</sup> em farelo de trigo; assim como a produção de fitase por *T. atroviride* variou de 28 U mg<sup>-1</sup> de proteína em bagaço de mandioca a 2080 U mg<sup>-1</sup> de proteína em DDGS de milho. Para todos os micro-organismos, a menor produtividade de ambas as biomoléculas ocorreu em

bagaço de mandioca. O bagaço de mandioca é composto majoritariamente de carboidratos, sendo o amido o principal deles, assim, micro-organismos que utilizam amido como substrato para o crescimento e outras atividades metabólicas têm sido selecionados para processos de bioconversão utilizando bagaço de mandioca (PANDEY et al., 2000). Neste estudo, devido à baixa produtividade de auxina e fitase em bagaço de mandioca, concluímos que outros componentes do substrato exercem maior influência nesta bioconversão. Devido à estas diferenças, determinamos as propriedades físicas e químicas dos substratos usados para a FES e as correlacionamos às produtividades das biomoléculas.

Algumas espécies de micro-organismos não apresentaram crescimento quando inoculadas nos substratos, entre eles *A. ustus* em farelo de soja, bagaço de mandioca e DDGS de milho; *T. harzianum* em farelo de soja e todas as cepas de *Bacillus* em DDGS de sorgo e milho. A ausência de crescimento de *Bacillus* em DDGS de sorgo e milho pode ser justificada pelo baixo pH dos substratos, respectivamente, 4,20 e 4,04 (Tabela 2).

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).

Características físicas e químicas	Substratos				
	FS	FT	BM	DS	DM
Macroporosidade (%)	13,86	29,84	33,10	36,95	45,23
Microporosidade (%)	59,09	47,43	40,28	38,90	36,90
Porosidade total (%)	72,95	77,28	73,38	75,84	82,13
Retenção de água (mL/cm <sup>3</sup> )	0,56	0,45	0,38	0,37	0,35
Condutividade elétrica (mS/cm <sup>3</sup> )	3,10	0,78	0,69	0,60	0,70
pH	6,48	5,91	4,33	4,20	4,04
Proteína bruta (%)	46,65	17,00	3,32	36,92	30,16
Lipídeos (%)	8,76	6,35	8,91	9,58	8,09
Hemicelulose (%)	15,84	28,88	9,96	36,82	43,87
Celulose (%)	5,56	10,77	10,29	15,22	15,28
Lignina (%)	2,43	4,77	27,00	14,69	13,60

O crescimento de fungos e bactérias foram relacionados ao pH de maneira inversamente proporcional. No trabalho de Rousk; Brookes; Bååth, (2009) o crescimento bacteriano ocorreu mais rapidamente em pH acima de pH 7, sendo que, após este valor o crescimento decresceu em 80% até atingir o pH 8,3. Para os fungos, entre os pHs 4,5 e 8,3 houve aumento do crescimento em 5 vezes, seguindo modelo exponencial. Abaixo do pH 4,5 houve inibição total do crescimento de todos os micro-organismos.

A análise de correlação foi realizada em cada gênero microbiano, objetivando investigar as diferenças no metabolismo microbiano (Tabela 3). Para o gênero *Aspergillus*, não houve correlações significativas para as produções tanto de AIA quanto de fitases. No gênero *Trichoderma* houve correlação positiva moderada entre a atividade de fitases e porosidade total e conteúdo de hemiceluloses e forte correlação negativa entre AIA e derivados e lignina (-0,688). Em *Bacillus* não houve correlação significativa para a atividade de fitases, para AIA e derivados foi observada correlação moderada positiva com microporosidade (0,575), retenção de água (0,571) e proteína bruta (0,529), correlação negativa moderada com lipídeos (-0,538), forte correlação positiva com pH (0,772) e hemicelulose (0,683) e forte correlação negativa com lignina (-0,819).

Tabela 3. Coeficientes de correlação de Pearson entre a produção das biomoléculas auxina e fitase por micro-organismos dos gêneros *Bacillus*, *Trichoderma* e *Aspergillus* e as características dos substratos: macroporosidade (MaP) (%), microporosidade (MiP) (%), porosidade total (PT) (%), retenção de água (RA) (mL/cm<sup>3</sup>), condutividade elétrica (EC) (mS/cm<sup>3</sup>), pH, proteína bruta (PB) (%), lipídeos (%), hemicelulose (%), celulose (%) e lignina (%).

Características dos substratos	Micro-organismos					
	<i>Bacillus</i>		<i>Trichoderma</i>		<i>Aspergillus</i>	
	AIA (µg mL <sup>-1</sup> )	Fitase (U mg ptn <sup>-1</sup> )	AIA (µg mL <sup>-1</sup> )	Fitase (U mg ptn <sup>-1</sup> )	AIA (µg mL <sup>-1</sup> )	Fitase (U mg ptn <sup>-1</sup> )
MaP (%)	-0,448*	-0,142	-0,409	0,358	-0,226	-0,044
MiP (%)	0,604*	0,155	0,502*	-0,224	0,242	0,166
PT (%)	0,470*	0,003	-0,057	0,528*	-0,103	0,280
RA (mL/cm <sup>3</sup> )	0,600*	0,155	0,500*	-0,222	0,240	0,165
EC (mS/cm <sup>3</sup> )	0,352*	0,132	0,371	-0,093	0,102	0,023
Ph	0,800*	0,158	0,552*	-0,211	0,302	0,293
PB (%)	0,558*	0,152	0,510*	0,252	0,259	-0,200
LP (%)	-0,569*	-0,025	-0,225	-0,058	-0,125	-0,489
H (%)	0,717*	0,065	0,175	0,493*	0,119	0,164
C (%)	-0,257	-0,121	-0,191	0,355	-0,053	-0,069
L (%)	-0,846*	-0,151	-0,705*	-0,130	-0,412	-0,391

\*  $p \leq 0,01$

Os coeficientes de correlação da microporosidade e da retenção de água foram similares em todos os micro-organismos e biomoléculas, o que pode ser justificado devido à adesão

molecular por adsorção, em que os microporos retêm água a maiores tensões do que os macroporos, tornando-a menos disponível (SILVA; SIMÕES; SILVA, 2012).

A forte correlação positiva entre o pH e a produtividade de AIA e derivados por *Bacillus* foi demonstrada e pode ser explicada devido à melhor adaptação de bactérias, e conseqüentemente, maior produção de metabólitos, em ambientes com pHs próximos ao neutro, assim como estudado por Rousk et al. (2009). Em contrapartida, nossos resultados diferem dos de Lanciotti et al. (2001), em que o pH e a atividade de água não exerceram efeito no crescimento de *B. cereus*.

A correlação positiva entre hemicelulose e AIA e derivados e negativa entre lignina e AIA e derivados pode ser justificada pelas complexidades das biomoléculas e suas diferentes conversões energética. As hemiceluloses são compostas, principalmente, pelo carboidrato xilano e sua degradação necessita da ação de diversas enzimas hidrolíticas, resultando em monossacarídeos e ácido acético (PÉREZ et al., 2002). Enquanto a lignina é composta por unidades de fenil-propano, unidas por ligações C-O-C e C-C, com grupos alcóolicos e metoxílicos e para sua despolimerização há a necessidade da ação de enzimas extracelulares, oxidativas e inespecíficas devido à complexidade estrutural, alto peso molecular e insolubilidade do polímero, fatores que dificultam sua degradação (KIRK; FARRELL, 1987). Assim, a conversão energética de hemicelulose é mais simples em relação à lignina, o que pode ter favorecido a produção de AIA e derivados por *Bacillus*.

Uma grande variedade de micro-organismos possui a capacidade de degradar celulose, hemicelulose e lignina, conseqüentemente, processos que utilizem enzimas e micro-organismos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de explorar o potencial de biotecnológico de aplicação (PÉREZ et al., 2002). Os micro-organismos utilizados neste trabalho foram caracterizados previamente como capazes de produzir enzimas que atuam na degradação de lignocelulose. *Bacillus* sp., *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus fumigatus* *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride* foram descritos como produtores das celulasas endoglucanase,  $\beta$ -glucosidase, celobiohidrolase ou exoglucanase e glicosiltransferase. *Bacillus* sp., *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus fumigatus* foram relatados como produtores das hemicelulasas xilanase, manase, endoglucanase,  $\beta$ -xilodase,  $\alpha$ -galactosidade, acetil esterase e  $\beta$ -glucosidase. Enquanto os micro-organismos *Bacillus subtilis*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma longibrachiatum* foram descritos como produtores das lignases lacase, lignina peroxidase, manganês peroxidase, peroxidase e celbiose desidrogenase (SHARMA; XU; QIN,

2017). Assim, testar a atividade de lignocelulases em estudos futuros pode ser um novo campo de aplicações biotecnológicas para essas linhagens.

#### 4. Conclusões

Este estudo confirmou, pela primeira vez, a produção de AIA por fermentação em estado sólido utilizando LC-MS/MS. Os micro-organismos pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Trichoderma* e *Aspergillus* analisados neste estudo possuem capacidade de produzir fitases e AIA por fermentação em estado sólido. As linhagens *B. subtilis* D, cultivadas em farelo de trigo, e *T. atroviride* (IOC 4503) em DDGS de milho são, respectivamente, as combinações com maiores produtividades de AIA e derivados e fitases e consideradas promissoras para fins agrícolas. Nossos resultados indicam que a produção de AIA e derivados por *Bacillus* e *Trichoderma* pode ser melhorada utilizando substratos com baixa concentração de lignina, como os farelos de soja e trigo. Para a produção de AIA por *Bacillus* também são recomendados substratos com pHs próximos a neutro, com alta concentração de hemicelulose e maior quantidade de microporos.

#### 5. Referências Bibliográficas

ACUÑA, J.; JORQUERA, M. Indole acetic acid and phytase activity produced by rhizosphere bacilli as affected by pH and metals. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 11, n. 3, p. 1–12, 2011.

ALMEIDA, M. R.; AUMOND, M.; DA COSTA, C. T.; SCHWAMBACH, J.; RUEDELL, C. M.; CORREA, L. R.; FETT-NETO, A. G. Environmental control of adventitious rooting in *Eucalyptus* and *Populus* cuttings. **Trees - Structure and Function**, v. 31, n. 5, p. 1377–1390, 2017.

ANSARY, W. R.; PRINCE, F. R. K.; HAQUE, E.; SULTANA, F.; WEST, H. M.; MAHBUBUR RAHMAN, M.; MONDOL, A. M.; AKANDA, A. M.; RAHMAN, M.; CLARKE, M. L.; ISLAM, T. Endophytic *Bacillus* spp. from medicinal plants inhibit mycelial growth of *Sclerotinia sclerotiorum* and promote plant growth. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 73, n. 5–6, p. 247–256, 2018.

AOAC. **Official methods of analysis of the AOAC international**. 17. ed. Gaithersburg,

Maryland: Association of Official Analytical Chemists, 2000.

BRIC, J. M.; BOSTOCK, R. M.; SILVERSTONE, S. E. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 535–538, 1991.

CHEN, H. **Modern solid state fermentation theory and practice**. 1. ed. Springer Dordrecht Heidelberg New York London, 2013. 324 p.

FU, S.; SUN, J.; QIAN, L.; LI, Z. *Bacillus* phytases: present scenario and future perspectives. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 151, n. 1, p. 1–8, 2008.

GEORGE, T. S.; QUIQUAMPOIX, H.; SIMPSON, R. J.; RICHARDSON, A. E. Interactions between phytases and soil constituents: implications for the hydrolysis of inositol phosphates. In: TURNER, B.; RICHARDSON, A.; MULLANEY, E. (Eds.). **Inositol phosphates: linking agriculture and the environment**. Wallingford: CABI, 2007. p. 221–241.

GLICKMANN, E.; DESSAUX, Y. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 793–796, 1995.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C.; DAVID, M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 177, n. 2, p. 751–766, 1949.

GUERRINI, I. A.; TRIGUEIRO, R. M. Physical and chemical attributes of substrates composed of biosolids and carbonized rice chaff. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 28, n. 6, p. 1069–1076, 2004.

HAYES, J. E.; SIMPSON, R. J.; RICHARDSON, A. E. The growth and phosphorus utilisation of plants in sterile media when supplied with inositol hexaphosphate, glucose 1-phosphate or inorganic phosphate. **Plant and Soil**, v. 220, n. 1–2, p. 165–174, 2000.

HOYOS-CARVAJAL, L.; ORDUZ, S.; BISSETT, J. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. **Biological Control**, v. 51, n. 3, p. 409–416, 2009.

KIRK, T. K.; FARRELL, R. L. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. **Annual Review of Microbiology**, v. 41, p. 465–505, 1987.

KUMAR, K.; MANIGUNDAN, K.; AMARESAN, N. Influence of salt tolerant *Trichoderma* spp. on growth of maize (*Zea mays*) under different salinity conditions. **Journal of Basic Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 141–150, 2017.

LANCIOTTI, R.; SINIGAGLIA, M.; GARDINI, F.; VANNINI, L.; GUERZONI, M. E. Growth/no growth interfaces of *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella*

*enteritidis* in model systems based on water activity, pH, temperature and ethanol concentration. **Food Microbiology**, v. 18, n. 6, p. 659–668, 2001.

LASTOCHKINA, O.; PUSENKOVA, L.; YULDASHEV, R.; BABAEV, M.; GARIPOVA, S.; BLAGOVA, D.; KHAIRULLIN, R.; ALINIAEIFARD, S. Effects of *Bacillus subtilis* on some physiological and biochemical parameters of *Triticum aestivum* L. (wheat) under salinity. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 121, p. 80–88, 2017.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T.; VANDENBERGHE, L. P. S.; RADJISKUMAR, M. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: Sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 69–80, 2000.

PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; DE LA RUBIA, T.; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 53–63, 2002.

RICHARDSON, A. E.; GEORGE, T. S.; HENS, M.; SIMPSON, R. J. Utilization of soil organic phosphorus by higher plants. In: **Organic phosphorus in the environment**. Wallingford: CABI, 2005. p. 165–184.

RICHARDSON, A. E.; HADOBAS, P. A.; HAYES, J. E. Acid phosphomonoesterase and phytase activities of wheat (*Triticum aestivum* L.) roots and utilization of organic phosphorus substrates by seedlings grown in sterile culture. **Plant, Cell and Environment**, v. 23, n. 4, p. 397–405, 2000.

ROUSK, J.; BROOKES, P. C.; BÅÅTH, E. Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth suggest functional redundancy in carbon mineralization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 6, p. 1589–1596, 2009.

SARAVANAKUMAR, K.; ARASU, V. S.; KATHIRESAN, K. Effect of *Trichoderma* on soil phosphate solubilization and growth improvement of *Avicennia marina*. **Aquatic Botany**, v. 104, p. 101–105, 2013.

SARWAR, M.; ARSHAD, M.; MARTENS, D. A.; FRANKENBERGER, W. T. Tryptophan-dependent biosynthesis of auxins in soil. **Plant and Soil**, v. 147, n. 2, p. 207–215, 1992.

SHARMA, H. K.; XU, C.; QIN, W. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and bioproducts: an overview. **Waste and Biomass Valorization**, n. 0, p. 1–17, 2017.

SHIVANNA, G. B.; VENKATESWARAN, G. Phytase production by *Aspergillus niger* CFR 335 and *Aspergillus ficuum* SGA 01 through submerged and solid-state fermentation. **The Scientific World Journal**, p. 1–6, 2014.

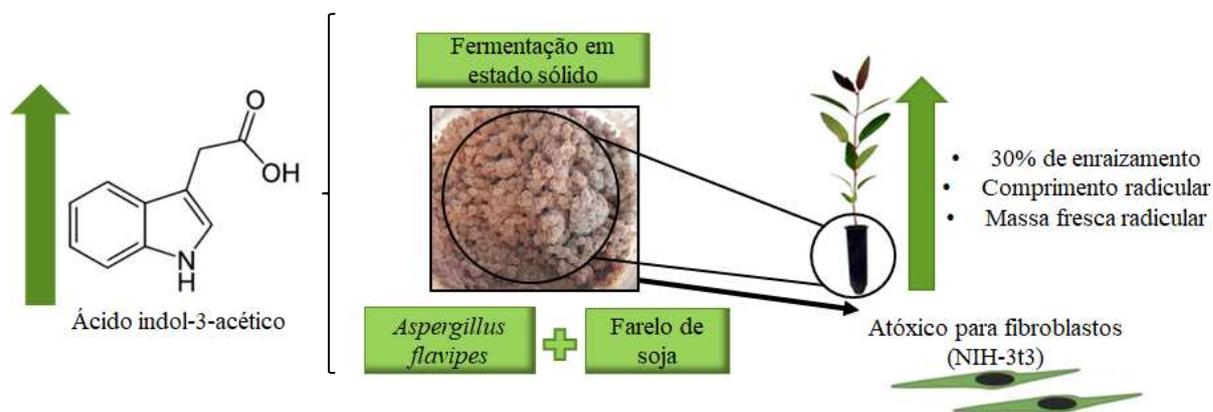
- SILVA, R. B. G. DA; SIMÕES, D.; SILVA, M. R. DA. Quality of *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* cuttings as a function of substrate. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 16, n. 3, p. 297–302, 2012.
- SINGH NEE NIGAM, P.; PANDEY, A. **Biotechnology for agro-industrial residues utilisation: utilisation of agro-residues**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2009.
- SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; THOMAS, L.; PANDEY, A. Solid-state fermentation. In: WITTMANN, C.; LIAO, J. C. (Eds.). **Industrial Biotechnology: Production and Processes**, 1. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2016. p. 187–204.
- SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 425–448, 2007.
- STÖCKMANN, C.; LOSEN, M.; DAHLEMS, U.; KNOCKE, C.; GELLISSEN, G.; BÜCHS, J. Effect of oxygen supply on passaging, stabilising and screening of recombinant *Hansenula polymorpha* production strains in test tube cultures. **FEMS Yeast Research**, v. 4, n. 2 SPEC.ISS., p. 195–205, 2003.
- THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 146–161, 2013.
- VERMA, J. P.; JAISWAL, D. K.; KRISHNA, R.; PRAKASH, S.; YADAV, J.; SINGH, V. Characterization and screening of thermophilic *Bacillus* strains for developing plant growth promoting consortium from hot spring of Leh and Ladakh region of India. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1–15, 2018.
- ZHAO, L.; ZHANG, Y. Q. Effects of phosphate solubilization and phytohormone production of *Trichoderma asperellum* Q1 on promoting cucumber growth under salt stress. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 14, n. 8, p. 1588–1597, 2015.
- ZHAO, Y. Auxin biosynthesis and its role in plant development. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 49–64, 2010.

### Capítulo 3: Desenvolvimento de novo bioestimulante vegetal e aplicação em *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*

Débora Zanoni do Prado, Samara Louzada Oliveira, Clarissa Hamaio Okino-Delgado, Susann Auer, Jutta Ludwig-Müller, Magali Ribeiro da Silva, Célio Júnior da Costa Fernandes, Caio Antonio Carbonari, William Fernando Zambuzzi, Luciana Francisco Fleuri.

Incluso: PRADO, D. Z.; FLEURI, L. F. Produção de ácido indol-3-acético por fermentação em estado sólido. 2018, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020180079271, Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 19/04/2018 (Anexo I).

#### Resumo gráfico



## Resumo

Programas de melhoramento genético têm tornado as florestas comerciais de *Eucalyptus* cada vez mais produtivas, no entanto, alguns clones com alto desempenho em campo apresentam dificuldades de propagação, principalmente relacionadas ao enraizamento. Micro-organismos produtores de ácido indol-3-acético (AIA) podem induzir o enraizamento em plantas, atuando como bioestimulantes vegetais. O objetivo deste trabalho foi produzir AIA microbiano por fermentação em estado sólido (FES), utilizando os resíduos farelos de soja e trigo, bagaço de mandioca e grãos de destilaria secos com solúveis de sorgo e milho, otimizar a produção da biomolécula, aplicar o produto visando o enraizamento de *E. grandis* x *E. urophylla* (clone IPB2) e testar a citotoxicidade do produto. Foram avaliadas, colorimetricamente, 16 cepas microbianas para a produção de AIA e análogos. A maior produção foi observada, ineditamente, pela cepa ATCC® 16814™ de *Aspergillus flavipes*. Quando cultivada por FES, a maior produtividade de *A. flavipes* ocorreu com o uso de partículas de farelo de soja de 0,5 mm, 15 mL de água e 1,5% de triptofano e nessas condições de cultivo, foi confirmada a alta produção de AIA em LC/MS-MS. As melhores condições de cultivo foram produzidas em maior escala e misturadas, nas formas sólida (PES) e líquida (PEL), ao substrato Carolina I®, nas doses 0, 40, 80, 120 e 160 mg kg<sup>-1</sup> de AIA e, em seguida, plantadas estacas de *E. grandis* x *E. urophylla*. Os tratamentos com 40 a 120 mg kg<sup>-1</sup> do PES incrementaram a porcentagem de enraizamento, o comprimento radicular e as massas fresca e seca das raízes, enquanto o tratamento com 120 mg kg<sup>-1</sup> do PEL induziu o aumento do comprimento das raízes e da massa seca radicular. O novo produto foi comprovado como bioestimulante para *E. grandis* x *E. urophylla* e patenteadado junto ao INPI sob o registro BR 10 2018 007927 1. O produto, independentemente da dose, não apresentou citotoxicidade em fibroblastos (NIH/3t3). Assim, o bioestimulante foi considerado eficiente para o enraizamento do clone IPB2, não tóxico, de baixo custo e ambientalmente sustentável. Entre as formas de aplicação e doses, recomenda-se a aplicação de 40 mg kg<sup>-1</sup> de PES, por exercer efeitos similares aos demais tratamentos, a menores custos de produção.

**Palavras-chave:** ácido indol-3-acético, fermentação em estado sólido, LC-MS/MS, propagação vegetativa, citotoxicidade.

## 1. Introdução

Os programas mundiais de melhoramento florestal são baseados na plantação clonal de espécies do gênero *Eucalyptus* empregando propagação vegetativa. No entanto, a eficiência da propagação vegetativa é prejudicada, em algumas espécies, devido aos efeitos específicos de fatores endógenos e exógenos na planta-mãe, alterações na arquitetura do sistema radicular e manifestação de efeitos de topófitose que determinam diferenças no potencial de enraizamento (PERALTA et al., 2012).

O clone de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* IPB2 da ArborGen é classificado como um clone SuperTree®, tais clones são selecionados para maior volume de madeira, resistência a doenças, retidão do tronco e características de qualidade da madeira. Utilizando o manejo adequado, a perspectiva de incremento na renda do produtor utilizando os clones citados é de 10% a 20% em relação às mudas tradicionais (ARBORGEN, 2018). Apesar das vantagens no campo, o clone apresenta dificuldades de enraizamento no viveiro, demandando pesquisas para promover a indução e o desenvolvimento rizogênico.

A inoculação de algumas classes de micro-organismos (fungos e bactérias) podem modificar o desenvolvimento radicular benéficamente aumentando a absorção de água e nutrientes, a tolerância a estresses como secas e doenças e a biomassa vegetal da planta hospedeira (SUKUMAR et al., 2013). Quando uma substância é aplicada à plantas com o objetivo de melhorar a eficiência nutricional, estresse abiótico e/ou como tratamento que influencie a qualidade da cultura, é denominada bioestimulante vegetal. Os bioestimulantes também designam produtos comerciais contendo misturas de substâncias e/ou micro-organismos (DU JARDIN, 2015), sendo que os produzidos comercialmente são, atualmente, divididos em cinco classes: inoculantes microbianos, ácidos húmicos, ácidos fúlvicos, aminoácidos e extratos de algas marinhas (CALVO; NELSON; KLOPPER, 2014).

O mercado global de produtos agrícolas biológicos, o qual inclui biopesticidas, biofertilizantes e bioestimulantes, pode atingir o valor de US\$ 10,05 bilhões até 2020, com estimativa de aumento anual de 14,5%. Além dos benefícios atrelados diretamente ao produto, esse crescimento está ligado também à diminuição de riscos químicos e melhor gestão de resíduos, além de incentivos de agências governamentais (MARKETS & MARKETS, 2016).

O efeito de bioestimulantes contendo micro-organismos com a habilidade de fornecer às plantas fitohormônios adicionais e/ou seus precursores vem sendo evidenciado em diversos

estudos (WONG et al., 2016). Os fitohormônios, como as auxinas, modulam as associações entre plantas e micro-organismos e coordenam as respostas celulares e metabólicas associadas ao crescimento microbiano em diferentes tecidos vegetais (BOIVIN; FONOUNI-FARDE; FRUGIER, 2016).

O fitohormônio ácido indol-3-acético (AIA) é o maior regulador de todos os aspectos do desenvolvimento de plantas, atuando tanto em processos celulares básicos quanto em fenômenos macroscópicos (SAUER; ROBERT; KLEINE-VEHN, 2013), desempenhando papel central na formação de raízes adventícias (PACURAR; PERRONE; BELLINI, 2014). Efeitos benéficos, como incrementos no crescimento da parte aérea, raízes e raízes laterais e no número de raízes decorrentes da aplicação de micro-organismos dos gêneros *Aspergillus*, *Bacillus* e *Trichoderma*, produtores de auxina, foram descritos em diversos estudos (HOYOS-CARVAJAL et al., 2009; HUSSEIN et al., 2016; SALAS-MARINA et al., 2011).

Os micro-organismos podem ser cultivados por Fermentação em Estado Sólido (FES), processo heterogêneo trifásico que compreende fases sólida, líquida e gasosa, oferecendo condições benéficas para o cultivo microbiano. Nas últimas duas décadas, a FES vem se destacando para o desenvolvimento de bioprocessos industriais, particularmente, devido às menores exigências de energia associadas ao maior rendimento do produto e menor produção de águas residuais, com conseqüente menor risco de contaminação bacteriana. Além disso, é considerada ambientalmente sustentável, principalmente por utilizar de resíduos agroindustriais sólidos como substrato (THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013).

Tendo em vista as dificuldades no enraizamento de clones de *Eucalyptus*, este estudo objetivou produzir um novo bioestimulante por FES, avaliar os efeitos da inoculação do produto no enraizamento de mudas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (clone IPB2) e testar a segurança do produto em fibroblastos.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1. Cepas microbianas

Para a produção de AIA, foram testadas as cepas *Aspergillus ustus* (Bainier.) Thom & Church (IOC 4410), *Aspergillus niger* van Tieghem (INCQS 40015), *Aspergillus flavipes* (ATCC® 16814<sup>TM</sup>), *Bacillus subtilis* (CCGB 0030), *Bacillus megaterium* (CCGB 0146),

*Bacillus amyloliquefaciens* (CCGB 0145), *Trichoderma atroviride* (IOC 4503), *Trichoderma koningii* (INCQS 40331), *Trichoderma harzianum* Rifai (IOC 3844), oriundas da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), a cepa *Aspergillus niger* 01, isolada pelo Laboratório de Bioprocessos, UNESP, Botucatu e depositada na Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria sob número de CBMAI 2084 e as cepas de *Bacillus subtilis* (B, C, D, E, F, E27), doadas pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os micro-organismos que se referem à acesso ao patrimônio genético brasileiro foram cadastrados no Sisgen pelo nº A3B348F.

## 2.2. Preparo do inóculo

Os fungos foram cultivados em *slants* com meio *potato dextrose agar* (PDA) por 96 h a 30°C e as bactérias em *slants* com meio *tryptic soy agar* (TSA) por 24 h a 33°C. Após o crescimento, os *slants* foram armazenados a 4°C até o uso sob camada de vaselina esterilizada e repicados a cada três meses para manutenção da linhagem. O inóculo foi preparado suspendendo o conteúdo do *slant* em 6 mL de água esterilizada. A suspensão foi ajustada a  $10^7$  de esporos.mL<sup>-1</sup> e 2 mL desta suspensão foi inoculada sobre o substrato da FES.

## 2.3. Quantificação de AIA e derivados

Para a quantificação da produção de AIA e derivados foi utilizada uma adaptação dos métodos propostos por Bric et al. (1991) e Sarwar et al. (1992). Placas de petri com meio PDA para fungos e TSA para bactérias, acrescidos de triptofano (1%, m/v) foram inoculadas com 100 µL de solução ajustada para  $10^7$  esporos mL<sup>-1</sup> em tampão fosfato pH 7,0 (0,01 M).

Após 96 h de incubação para fungos e 24 h de incubação para bactérias, a 30°C, foram adicionados 20 mL do reagente Salkowski (2% de FeCl<sub>3</sub> em 35% de ácido perclórico) à temperatura ambiente às placas. Após 30 min de reação, as cepas produtoras de AIA ou análogos foram identificadas por coloração rosa/avermelhada.

O conteúdo das placas foi transferido para tubos Falcon de 50 mL e centrifugado por 15 min a 4.000 x g. Como branco foram utilizadas placas com meio de cultura e triptofano (1%, m/v). A leitura em absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 535 nm e comparada com

curva padrão de ácido indol-3-acético (Sigma Aldrich®), os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  de ácido indol-3-acético e análogos  $\text{mL}^{-1}$  de amostra.

#### 2.4. Fermentação em Estado Sólido (FES)

O micro-organismo com maior produção de AIA e derivados foi cultivado por FES, utilizando os substratos bagaço de mandioca, (doado pela fecularia “Flor de Lótus”, localizada em Cândido Mota, São Paulo, Brasil), farelo de trigo, farelo de soja, grãos de destilaria secos com solúveis (DDGS) de sorgo e de milho (doados pela fábrica de ração da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil). O aminoácido triptofano (1,0%, m/m) foi adicionado aos substratos como indutor da produção de AIA. O meio utilizado para a FES foi composto de 50% de substrato e 50% de água destilada (m/m).

As suspensões microbianas foram inoculadas em 10 g de substrato em frascos Erlenmeyer (250 mL) e incubadas a  $30^{\circ}\text{C}$  por 120 h. Após este período, foram adicionados 50 mL de água destilada aos frascos e o conteúdo filtrado em duas camadas de gaze de algodão.

O filtrado foi utilizado para os ensaios de AIA. A quantificação de AIA e derivados ocorreu pela reação de 1 mL de extrato e 4 mL do reativo de Salkowski. A leitura em absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 535 nm e os resultados expressos em  $\mu\text{g}$  de ácido indol-3-acético e análogos  $\text{mL}^{-1}$  de amostra.

#### 2.5. Experimento fatorial

A combinação de substrato e micro-organismo que resultou em maior produção de AIA e derivados em meio de cultura teve suas condições otimizadas por planejamento experimental. Foram avaliadas as variáveis independentes: granulometria do substrato (0,5, 1,0 e  $>1,0$ ), quantidade de água adicionada ao substrato (5, 10, 15 mL) e porcentagem de triptofano (0,5, 1,0 e 1,5%, m/m), utilizando planejamento fatorial completo, englobando 11 ensaios, sendo oito referentes ao planejamento experimental somado a três repetições no ponto central ( $2^n +$  três pontos centrais, onde n é o número de variáveis independentes), conforme o método descrito por Barros-Neto; Scarminio; Bruns, 2010. As análises foram realizadas utilizando o software Statistica versão 10, Statsoft®).

## 2.6. Determinação de AIA por cromatógrafo líquido acoplado a espectrômetro de massas (LC-MS/MS)

Para confirmar a produção de AIA por via metabólica com triptofano como precursor, a FES sob condições selecionadas como ótimas [farelo de soja (0,5 mm) e 15 mL de água] ocorreu com e sem adição de triptofano (1,5%), e ambos extratos utilizados para a injeção em LC-MS/MS. Os extratos foram centrifugados a 4.000 x g por 10 min e filtrados em membrana de 0,22 µm.

Para a realização das análises foi utilizado sistema LC-MS/MS, composto por Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE), modelo Proeminence UFLC (Shimadzu®, Quioto, Japão), equipado com duas bombas LC-20AD, auto-injetor SIL-20AC, degazeificador DGU-20A5, sistema controlador CBM-20A e forno CTO-20AC, acoplado ao espectrômetro de massas 3200 Q TRAP (Applied Biosystems®, Foster City, EUA).

Para a quantificação de AIA foi utilizada uma coluna cromatográfica Synergi 2.5 µm Fusion RP 100 Å (Phenomenex), com 1% de ácido acético diluído em água mili-q (v/v) (fase A) e 1% de ácido acético diluído em metanol (v/v) (fase B) como fases móveis e vazão de 0,65 mL min<sup>-1</sup>. A corrida ocorreu seguindo o gradiente: 0-2 min, 45% fase B; 2-8 min, 95% da fase B; e 8-10 min, 45% de fase B. O tempo total de execução foi de 10 min, e o tempo de retenção do composto na coluna cromatográfica foi de 2,44 min, utilizando ionização por electrospray (ESI) no modo de ionização negativo.

## 2.7.Preparo dos tratamentos

O produto foi produzido em maior escala e testado em sua forma bruta, denominado produto em estado sólido (PES) e processado para a obtenção da forma líquida, denominado produto em estado líquido (PEL). Essas duas formas de aplicação foram propostas com o objetivo de comparar uma forma com menor superfície de contato, porém com maior tempo de ação (sólida) e outra forma com maior superfície de contato, porém com menor tempo de ação (líquida).

A forma líquida foi preparada pela adição de água destilada na mistura do processo fermentativo na proporção de 5:1 (5 mL de água para cada g de mistura), seguida por filtração em duas camadas de gaze de algodão. O rendimento do processo de filtração foi de 80%, ou

seja, para cada 5 mL de água adicionados, foram obtidos 4 mL do produto. Ambos os preparos foram misturados ao substrato Carolina I® (turfa Sphagnum, casca de arroz torrefada e vermiculita), respectivamente, nas proporções 5, 10, 15 e 20 % (m/m) e 10, 20, 30, 40% (v/m), ambos equivalentes a 0, 40, 80, 120 e 160 mg kg<sup>-1</sup> de AIA. Os substratos preparados foram depositados em tubetes plásticos de 55 m<sup>3</sup> e umedecidos com o auxílio de nebulizadores.

## 2.8. Implantação do experimento

O experimento foi conduzido no viveiro pertencente à empresa Avam Flora, localizado no município de Águas de Santa Bárbara-SP, nas coordenadas 22°52'50'' S e 49° 14'20'' O. O clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* selecionado para o trabalho foi o IPB2 da ArborGen, devido à grande capacidade de produção de celulose e ao baixo desempenho em viveiro por problemas no enraizamento.



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).

Estacas caulinares, de 3 a 6 cm de comprimento e 1,5 a 2,5 mm de diâmetro, foram coletadas no jardim clonal da empresa (Figura 1A). O jardim clonal foi suprido com todos os nutrientes necessários ao desenvolvimento vegetal, o pH foi mantido entre 5,5 e 6,2 e condutividade elétrica entre 1,0 e 2,5 mS cm<sup>-1</sup>. O manejo hídrico do jardim foi realizado conforme a necessidade. Após coletadas, as estacas foram plantadas nos substratos preparados (Figura 1B).

Os experimentos foram implantados em delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (quatro doses de AIA mais o controle) e três repetições. Cada unidade experimental correspondeu a 88 mudas do clone IPB2. As plantas permaneceram em casa de vegetação por 30 dias e após este período, foram transferidas para casa de sombra por mais 10 dias para aclimação, totalizando 40 dias de experimento. O manejo hídrico foi realizado de acordo com a necessidade de irrigação, observando a saturação de água do substrato.

### 2.9. Avaliações morfológicas

A avaliação da porcentagem de sobrevivência foi determinada pela contagem das plantas que possuíam vigor foliar na transição da casa de vegetação para a casa de sombra, 30 dias após o início do experimento. Aos 40 dias de experimento, foram retiradas 15 mudas centrais de cada unidade experimental para a realização das avaliações destrutivas (Figura 2A) e determinação dos comprimentos e biomassas radiculares. As plantas foram retiradas dos tubetes lavadas em água corrente a fim de eliminar qualquer resíduo do substrato (Figura 2B).



Figura 2. Mudanças selecionadas para as análises morfológicas (A) e lavagem em água corrente para a total eliminação dos resíduos do substrato (B).

## 2.10. Teste de viabilidade celular

Para verificar a possível citotoxicidade do bioestimulante desenvolvido, fibroblastos (3t3-NHI) foram plaqueados 48 h antes dos tratamentos, em placa de 96 poços e na densidade de  $5 \times 10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Os extratos microbianos foram centrifugados a  $4.000 \times g$  por 10 min e filtrados em membrana de  $0,22 \mu\text{m}$ . As células foram expostas ao bioestimulante e ao AIA sintético (Sigma-Aldrich®, St Louis, USA) nas doses 0, 40, 80, 120 e  $160 \text{ mg kg}^{-1}$ , assim como nos experimentos em viveiro. Após o tempo determinado de exposição (24 h), a viabilidade destas células foi medida através do teste de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio]. O meio de cultura foi removido, adicionado MTT ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e levado em estufa por 3 h. Após esse período o meio foi removido e adicionado  $0,1 \text{ mL}$  em cada poço de DMSO (dimetilsulfóxido) para solubilização do corante formado por células viáveis. Após, a absorbância foi medida a  $570 \text{ nm}$  utilizando um leitor de microplacas (SYNERGY-HTX multi-mode reader, Biotek, USA).

## 2.11. Análise estatística

Os resultados foram expressos como médias de três replicatas biológicas (média  $\pm$  desvio padrão). Os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), quando o valor do teste F indicou efeito significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).

# 3. Resultados

## 3.1. Produção de AIA e derivados

As auxinas podem ser quantificadas por diversos métodos tais como os qualitativos (BRIC; BOSTOCK; SILVERSTONE, 1991; HOYOS-CARVAJAL; ORDUZ; BISSETT, 2009), espectrofotométricos (SARWAR et al., 1992), por espectrometria gasosa (GC) (BARKAWI et al., 2010) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (GUPTA et al., 2011; LU et al., 2010), quanto maior a eficiência do método, maiores são os custos para realizá-los. Em nosso estudo, devido à grande quantidade de cepas testadas, realizamos, primeiramente, a quantificação de AIA e derivados por método espectrofotométrico.

Todas as cepas testadas demonstraram a capacidade de produção de AIA e derivados em meio de cultura (PDA para fungos e TSA para bactérias) suplementado com triptofano (1%, m/v) em placas de petri. A maior produção de AIA e derivados foi relatada, ineditamente, pela cepa de *Aspergillus flavipes* ( $71 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), enquanto a produtividade das demais cepas variou de 3 (*T. harzianum*) a  $23 \mu\text{g mL}^{-1}$  (*B. subtilis* E27) (Figura 3). Assim, o fungo *A. flavipes* foi selecionado para a continuidade do estudo, sendo cultivado por FES.

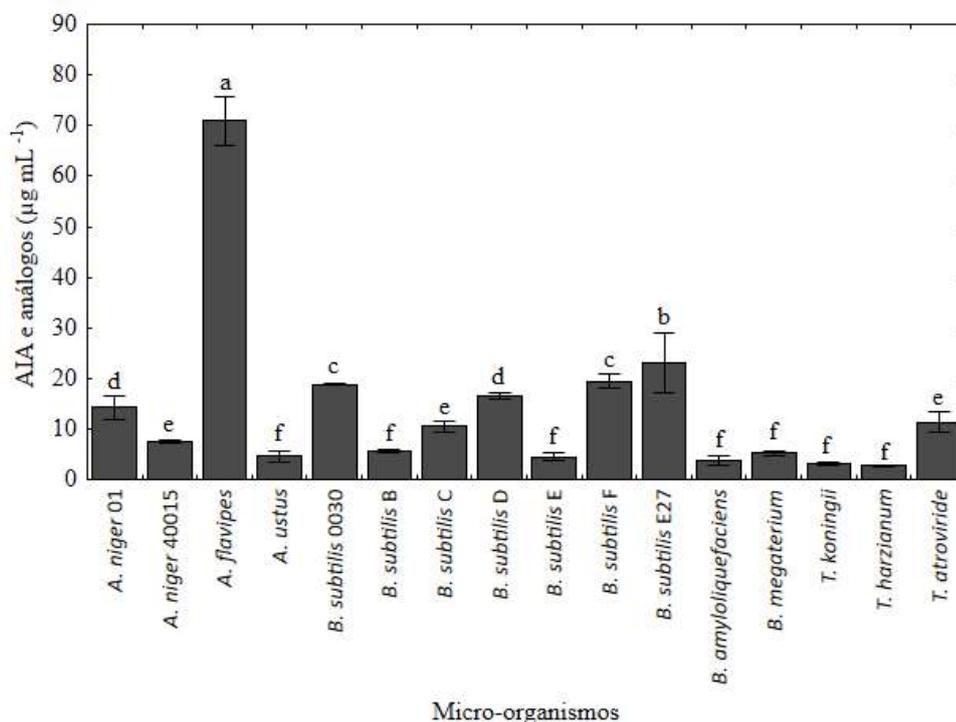


Figura 3. Quantificação de AIA (ácido indol-3-acético) e análogos, produzidos por *A. niger* (01 e INCQS 40015), *A. ustus* (IOC 4410), *A. flavipes* (ATCC 16814), *B. subtilis* (CCGB 0030, B, C, D, E, F e E27), *B. megaterium* (CCGB 0146) e *B. amyloliquefaciens* (CCGB 0145), *T. harzianum* (IOC 3844) e *T. atroviride* (IOC 450) em meios de cultura.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott Knott ( $p \leq 0,05$ ).

A cepa de *A. flavipes* foi cultivada em farelo de soja, farelo de trigo, bagaço de mandioca, DDGS de sorgo e DDGS de milho. Não houve crescimento microbiano em bagaço de mandioca e DDGS de milho. A maior produção de AIA e derivados por FES foi obtida utilizando farelo de soja ( $183 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), sendo aumentada 2,1 vezes em relação à produção em farelo de trigo ( $87 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e 5 vezes em relação ao DDGS de sorgo ( $36 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Figura 4). Assim, o farelo de soja foi selecionado para a otimização da produção AIA e derivados pelo método da superfície de resposta.

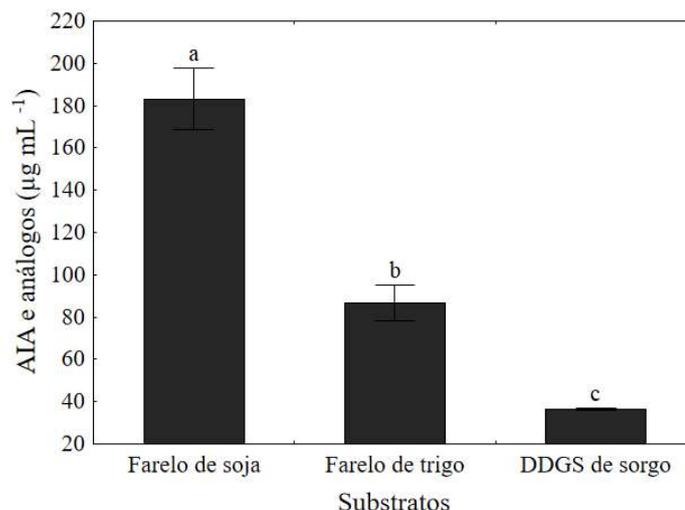


Figura 4. Quantificação de AIA (ácido indol-3-acético) e análogos em extratos provenientes da fermentação em estado sólido de *A. flavipes* (ATCC® 16814™) em farelo de soja, farelo de trigo e DDGS de sorgo.

Médias comparadas estatisticamente pelo teste de Scott Knott ( $p \leq 0,05$ ).

### 3.2. Produção de AIA e derivados por experimento fatorial

No planejamento experimental ( $R^2 = 0,86$ ), para a produção de AIA e derivados em farelo de soja, as variáveis granulometria do substrato (mm), adição de água (mL) e triptofano (%) e a interação entre todas as variáveis não foram estatisticamente significativas (Tabela 2). No entanto, houve grande variação na produtividade de AIA e derivados em razão da variação das condições do meio de cultivo. Com menor granulometria (0,5 mm), maior adição de água (15 mL) e menor adição de triptofano (0,5 %) foi obtida a menor produtividade de AIA e análogos ( $237 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), enquanto, nas mesmas condições de granulometria (0,5 mm) e água (15 mL) e maior concentração de triptofano (1,5 %) foi obtida a maior produção de AIA e derivados ( $655 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Tabela 1).

Além disso, houve aumento de 3,6 vezes na produtividade de AIA e derivados em relação às condições iniciais de cultivo em farelo de soja ( $183 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Figura 4). Assim, embora não estatisticamente significativas por planejamento experimental, as condições de cultivo que inferiram maior produção de AIA foram selecionadas para a continuidade do estudo.

Tabela 1. Planejamento fatorial para a otimização da produção de AIA e análogos ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) por fermentação em estado sólido utilizando *A. flavipes* e farelo de soja e modificando as condições do substrato: granulometria das partículas (mm), adição de água (mL) e triptofano (% m/m).

Ensaio	Granulometria (mm)	Água (mL)	Triptofano (%)	AIA e análogos ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
1	-1	-1	-1	317,77
2	+1	-1	-1	285,83
3	-1	+1	-1	237,30
4	+1	+1	-1	307,84
5	-1	-1	+1	365,52
6	+1	-1	+1	264,74
7	-1	+1	+1	654,56
8	+1	+1	+1	384,56
9	1	1	1	450,84
10	1	1	1	383,86
11	1	1	1	359,09

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

Parâmetros	Efeito	Desvio Padrão	t (4)	p	Limite de Confiança (-95%)	Limite de Confiança (+95%)
Média	364,72	20,38	17,89	0,00	308,12	421,32
Partícula (mm)	-83,04	47,81	-1,74	0,16	-215,77	49,69
Água (mL)	87,60	47,81	1,83	0,14	-45,13	220,33
Triptofano (%)	130,16	47,81	2,72	0,05	-2,57	262,89
1x2	-16,69	47,81	-0,35	0,74	-149,42	116,04
1x3	-102,34	47,81	-2,14	0,10	-235,07	30,38
2x3	116,83	47,81	2,44	0,07	-15,90	249,56

### 3.3. Quantificação de ácido indol-3-acético por LC-MS/MS

Foram realizadas três repetições biológicas para as condições em que foi constatada a maior produção de AIA e derivados pelo método colorimétrico (farelo de soja com granulometria 0,5 mm, 15 mL de água adicionada e 1,5 % de triptofano) e, nos extratos, foi quantificado o ácido indol-3-acético por LC-MS/MS. A produtividade de AIA por *A. flavipes*

nas condições selecionadas para o cultivo ( $516 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Figura 5B), confirmou os resultados da análise colorimétrica ( $654 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), sobre a alta produção AIA pelo micro-organismo.

Também foi verificada que a produção de AIA por *A. flavipes* ocorre utilizando uma via dependente de triptofano como precursor. Na ausência de triptofano, a produção de AIA por *A. flavipes* foi de  $0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ , enquanto, com a adição de 1,5% de triptofano foi aumentada para  $515,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 5A).

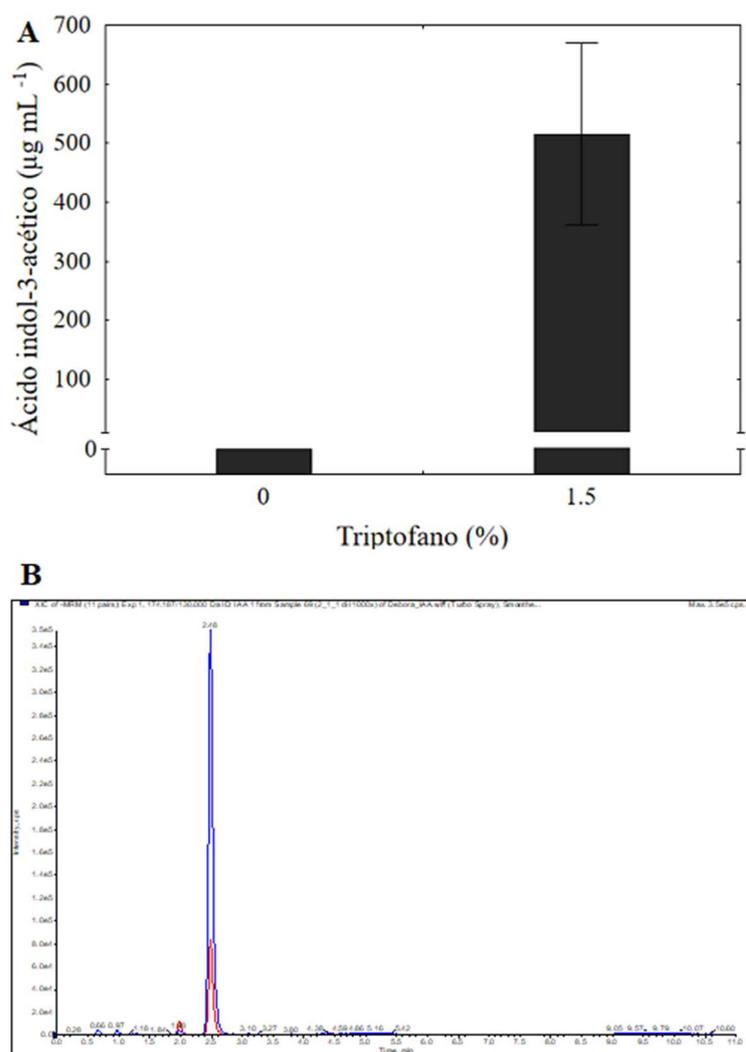


Figura 5. Produção de ácido indol-3-acético (AIA) por *A. flavipes* cultivado em farelo de soja (0,5 mm) suplementado com 15 mL de água, na presença e ausência de triptofano (1,5%) (A) e cromatograma do extrato com triptofano (MM = 175,187) e os íons secundários gerados (MM = 130,0 e 127,9) (B).

### 3.4. Respostas morfológicas à aplicação do potencial bioestimulante

Os tratamentos com PES e PEL resultaram em alterações no enraizamento e no desenvolvimento das plantas (Figuras 6 e 7).

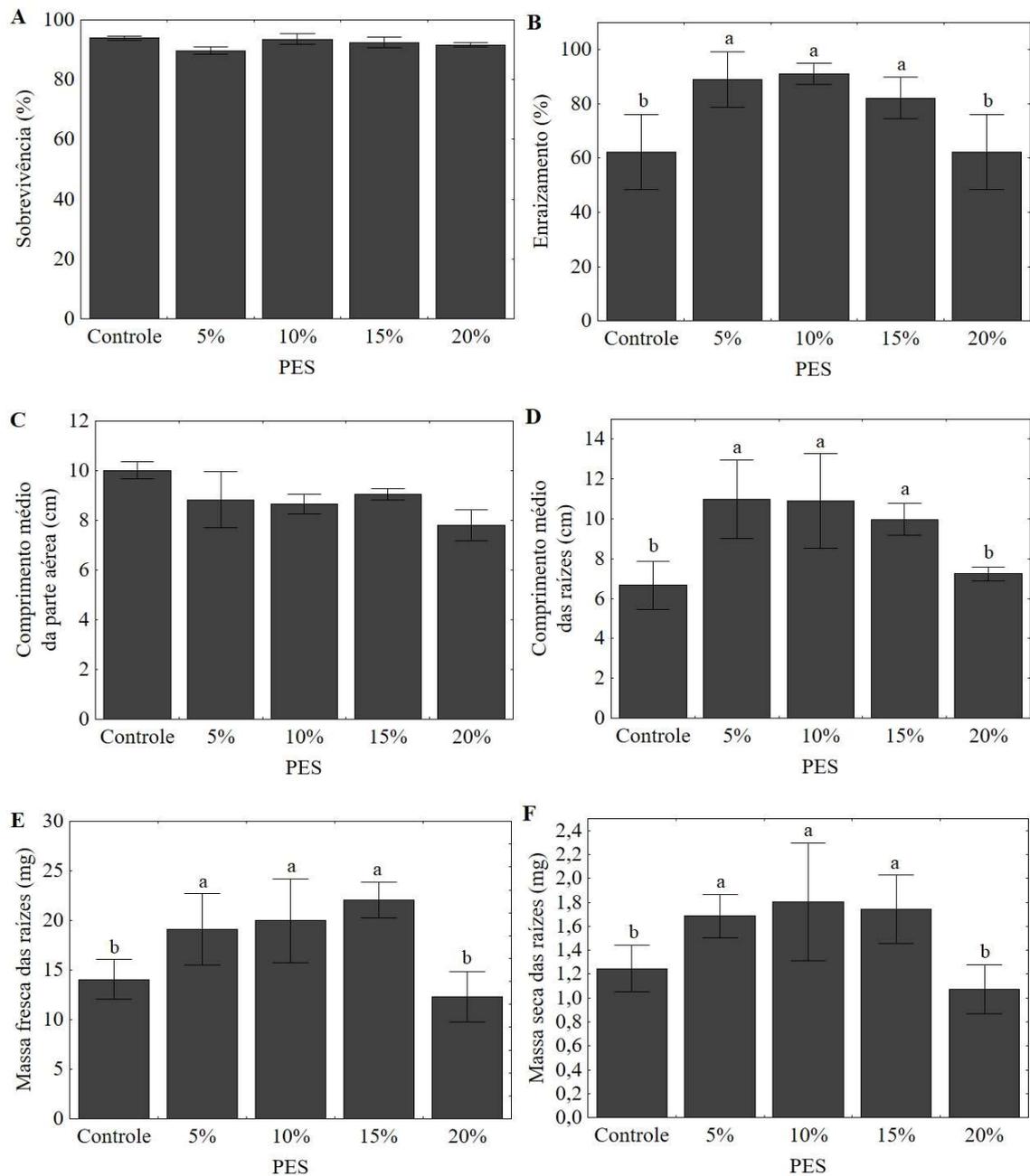


Figura 6. Sobrevivência (%) (A), enraizamento (%) (B), comprimento médio da parte aérea (C), comprimento médio das raízes (D), massa fresca média das raízes (mg) (E) e massa seca média das raízes (F), em resposta aos tratamentos com produto em estado sólido (PES) nas doses 0, 5,

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

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).

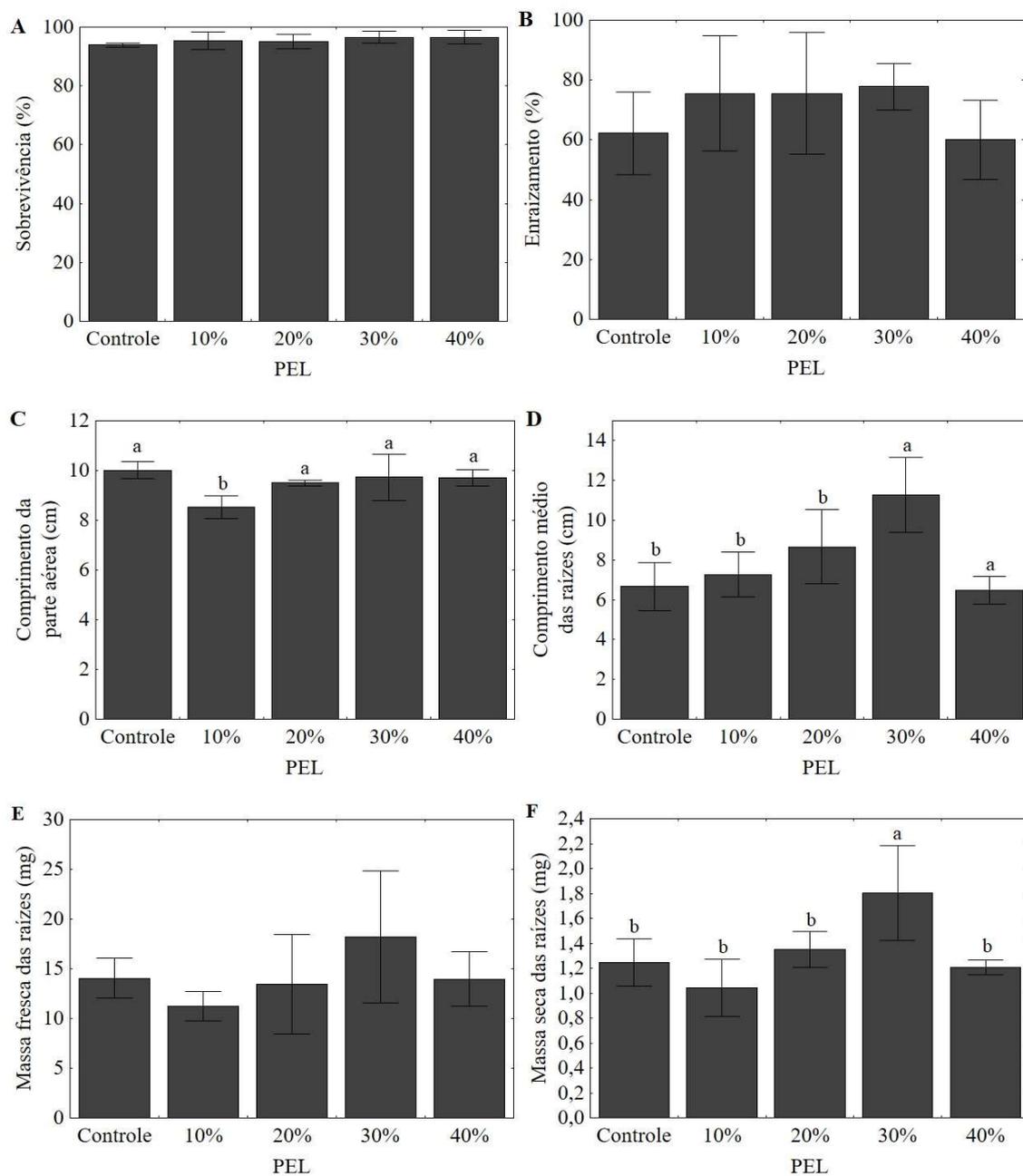


Figura 7. Sobrevivência (%) (A), enraizamento (%) (B), comprimento médio da parte aérea (C), comprimento médio das raízes (D), massa fresca média das raízes (mg) (E) e massa seca média das raízes (F), em resposta aos tratamentos com produto em estado líquido (PEL) nas doses 0, 10, 20, 30 e 40 % (v/m)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

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott Knott ( $p \leq 0,05$ ).

Não houve diferença significativa entre os tratamentos e o controle para as variáveis sobrevivência (Figura 6A) e comprimento médio da parte aérea (Figura 6C). Houve aumento significativo na porcentagem de enraizamento pela ação dos tratamentos com PES a 5% (89%), 10% (91%) e 15% (82%) em relação ao controle (62%). O tratamento com 20% de PES se igualou estatisticamente ao controle (Figura 6B). O mesmo padrão foi seguido para o comprimento médio das raízes (Figura 6D), os tratamentos a 5% (11,0 cm), 10% (10,9 cm), e 15% (10,0 cm) foram estatisticamente superiores ao controle (6,7 cm) e a 20% (7,2 cm) (Figura 10D). O incremento das massas radiculares fresca e seca, ocorreram, assim como nas demais variáveis, nos tratamentos com 5 (19,1 e 1,7 mg, respectivamente), 10 (20,0 e 1,8 mg) e 15 % (22,1 e 1,7 mg) de PES, em relação ao controle (14,0 e 1,3 mg) (Figuras 6E e 6F), enquanto o tratamento com 20% de PES se igualou estatisticamente ao controle (12,3 e 1,1 mg).

Para os tratamentos com PEL não houve diferença significativa para porcentagem de sobrevivência (Figura 7A), porcentagem de enraizamento (Figura 7B) e massa fresca das raízes (Figura 7E). Os tratamentos com 20, 30 e 40% de PEL (cujas médias foram de, respectivamente, 9,5, 9,7 e 9,7 cm) não alteraram o comprimento médio da parte aérea em relação ao controle (10,0 cm), enquanto o tratamento com 10% de PEL induziu redução dessa variável (8,5 cm) (Figura 7C). O comprimento médio das raízes só foi aumentado pelo tratamento com 30% de PEL (11,3 cm) em relação ao controle (6,7 cm), enquanto os demais tratamentos não provocaram alterações (Figura 7D). Assim, como no comprimento das raízes, houve incremento apenas na massa seca radicular pela ação do tratamento com 30% de PEL, que atingiu 1,8 mg, enquanto o controle resultou em 1,3 mg (Figura 11F).

### 3.5. Testes de viabilidade celular

Os fibroblastos (NIH/3t3) foram selecionados para o teste de citotoxicidade do produto, pois, durante a operação de mistura do produto ao substrato, há contato direto das mãos do operador com o produto e ensaios com fibroblastos vêm se mostrando eficientes na análise de irritação da pele causada por um grande número de agentes (BASON; GORDON; MAIBACH, 1991; LEE et al., 2000).

Houve diferença entre as doses de AIA, tanto produzido por *A. flavipes* e quanto sintético, na viabilidade celular de fibroblastos (NIH/3t3) (Figuras 8A e 8B). Houve aumento da viabilidade de NIH/3t3 em decorrência da aplicação de 120 e 160 mg kg<sup>-1</sup> de AIA produzido

por *A. flavipes* em relação aos controles e às demais doses (Figura 8A), enquanto as maiores doses da auxina sintética (Figura 8B) causaram redução na viabilidade de NIH/3t3 em relação aos controles. Assim, o bioestimulante, nas doses testadas, pode ser considerado não tóxico para fibroblastos e vantajoso em relação ao AIA sintético, que apresentou citotoxicidade.

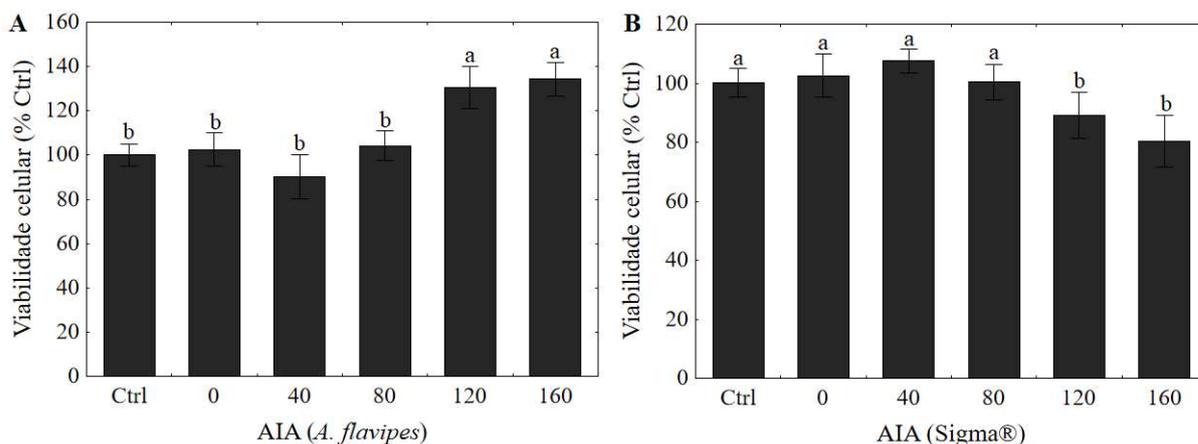


Figura 8. Viabilidade celular de fibroblastos (NIH/3t3) sob tratamentos com doses crescentes (0, 40, 80, 120 e 160 mg kg<sup>-1</sup>) de ácido indol-3-acético (AIA) produzido por *A. flavipes* (A) e sintético (Sigma®) (B).

Médias comparadas pelo Teste Scott Knott ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4. Discussão

##### 4.1. Produção de ácido indol-3-acético (AIA) por *Aspergillus flavipes*

Neste estudo, foi relatada, pela primeira vez a produção de AIA por *A. flavipes* usando a técnica de fermentação em estado sólido. A produção de AIA foi relatada previamente por diversas espécies microbianas cultivadas em meio de cultura, entre elas *Bacillus subtilis* (106,36  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), *Aspergillus ustus* (7,94  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (SALAS-MARINA et al., 2011), *Aspergillus nidulans* (5 pmol mL<sup>-1</sup>) (ECKERT et al., 1999), *Proteus mirabilis* (2,21  $\mu\text{g 100 mL}^{-1}$ ), *Proteus vulgaris* (6,5  $\mu\text{g 100 mL}^{-1}$ ), *Klebsiella pneumoniae* (50,68  $\mu\text{g 100 mL}^{-1}$ ), *Bacillus megaterium* (2,2  $\mu\text{g 100 mL}^{-1}$ ), *Bacillus cereus* (0,8  $\mu\text{g 100 mL}^{-1}$ ) e *Escherichia coli* (2,6  $\mu\text{g 100 mL}^{-1}$ ) (KARADENIZ; TOPCUOĞLU; INAN, 2006). Assim, além de inédita, a produtividade do fungo sob as condições otimizadas, em farelo de soja (515  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), é superior à dos microorganismos já estudados.

Para *A. flavipes*, a produção auxínica foi aumentada exponencialmente (de 0,3 para 515,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) em presença de triptofano. O AIA pode ser sintetizado usando L-triptofano (Trp) como precursor e outras vias independentes de triptofano (ZHAO, 2010). Embora as vias biossintéticas de produção de AIA por micro-organismos ainda não estejam completamente elucidadas, é descrito que o Trp é utilizado como principal precursor tanto para bactérias como para fungos, através de intermediários tais como o ácido indol-3-pirúvico (AIP), indol-3-acetamida (IAM), e triptamina (TAM) (SPAEPEN; VANDERLEYDEN, 2010). Assim, nosso estudo, comprovou a utilização do triptofano como precursor e da utilização de uma de suas vias metabólicas, para a produção do fitohormônio por *A. flavipes*,

#### 4.2. Efeitos do bioestimulante em *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (clone IPB2)

O produto (*A. flavipes* cultivado em farelo de soja), em ambas formas de aplicação, demonstrou exercer a função bioestimulante em mudas de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. Diversos gêneros de micro-organismos vêm sendo relatados como capazes de atuar no enraizamento e desenvolvimento de plantas.

A inoculação de *Aspergillus ustus* em raízes de *Arabidopsis thaliana* e *Solanum tuberosa* induziu aumento no crescimento da parte aérea e das raízes e no número de raízes laterais e pêlos radiculares (SALAS-MARINA et al., 2011). Em *Arabidopsis thaliana*, a inoculação de *Trichoderma virens* e *Trichoderma atroviride* resultou em maior produção de biomassa e desenvolvimento de raízes laterais (CONTRERAS-CORNEJO et al., 2009). Isolados bacterianos da rizosfera de *Araucaria angustifolia*, produtores de auxina, foram bem adaptados ao hospedeiro *Pinus elliottii*, sugerindo que esses grupos microbianos podem ser úteis para o desenvolvimento e reestabelecimento de florestas (GUMIERE et al., 2014).

Em relação às formas de aplicação, o PES, nas doses 5, 10 e 15%, incrementaram a porcentagem de enraizamento, o comprimento das raízes e as massas fresca e seca das raízes; enquanto o PEL resultou em incremento no comprimento das raízes e na massa seca radicular apenas no tratamento com 30%. Auxinas naturais e sintéticas vêm sendo aplicadas às estacas como forma de induzir o enraizamento, tanto em solução quanto na forma sólida, misturada a talco.

Estacas lenhosas de pecan (*Carya illinoensis*) foram submetidas a tratamentos com soluções aquosas a 0,03%, 0,06%, e 0,09% de AIA e da auxina sintética ácido indol-3-butírico

(AIB) e 0,06%, 0,09% e 0,12% da auxina sintética ácido naftaleno acético (ANA), sendo que a rizogênese ocorreu mais rapidamente com o tratamento de 0,09% de ANA (ZHAO; ZHANG, 2015). Em *Azadirachta indica* A. Juss (Neem), tratamentos com AIB, AIA e ANA nas concentrações 100; 250; 500; 750; 1.000 e 1.500 mg L<sup>-1</sup> foram aplicados às estacas e o tratamento com AIB (500 mg L<sup>-1</sup>) resultou em maior porcentagem de enraizamento (GEHLOT et al., 2015). Estacas de pimenta negra (*Piper nigrum* cv. Bragantina) foram expostas a 4000 mg kg<sup>-1</sup> de AIB misturado a talco, melhorando o enraizamento e a qualidade do sistema radicular (FREIRE et al., 2017). Em estacas de goiaba (*Psidium guajava* L.) CV. Safeda foram aplicadas diferentes auxinas (AIB, AIA e ANA a 100mg 100 g<sup>-1</sup> de talco). Todas as auxinas promoveram o enraizamento, porém as estacas tratadas com AIA produziram o máximo de 27,6 raízes, enquanto os tratamentos com AIB e ANA produziram 23 raízes. O AIA também resultou em porcentagem máxima de sobrevivência em relação ao controle (ZAMIR et al., 2017).

Embora resultados promissores no enraizamento de estacas venham sendo evidenciados em diversos estudos por ambas formas de aplicação, até o momento não há discussões comparativas entre os métodos. Para *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (clone IPB2), o tratamento em estado sólido se destacou em relação ao líquido, por exercer efeitos semelhantes e necessitar de uma etapa a menos de processamento. Além disso, a presença de um substrato suporte para o inoculante é importante para proporcionar um ambiente estável para o inóculo e prolongar a vida de prateleira do produto (MALUSÁ; SAS-PASZT; CIESIELSKA, 2012). Entre as doses de PES aplicadas consideramos 5% a mais vantajosa para o enraizamento do clone IPB2, pois além de proporcionar incrementos estatisticamente iguais a 10 e 15 %, também proporciona menor custo de produção.

Houve tendência inibitória da maioria das variáveis analisadas pela aplicação da dose máxima de PES (20%) e PEL (40%), correspondentes a 160 mg kg<sup>-1</sup> de AIA. Em baixas concentrações as auxinas estimulam os processos de crescimento e desenvolvimento em plantas, porém com concentração e atividade crescentes nos tecidos, o crescimento é prejudicado e a planta pode ser letalmente afetada (DAYAN; DUKE; GROSSMANN, 2010). Assim, nossos resultados sugerem que houve efeito inibitório no enraizamento resultante da aplicação da maior dose de PES e PEL.

A manipulação química do sistema auxínico pela síntese de análogos tem ganhado considerável importância na pesquisa básica de auxina (DAYAN; DUKE; GROSSMANN, 2010). Compostos sintéticos que atuam como fitohormônios estão entre os herbicidas de maior

sucesso utilizados na agricultura, pois possuem maior estabilidade na planta do que o AIA, bem como mobilidade sistêmica e ação seletiva (GROSSMANN, 2010).

No entanto, a auxina sintética mais amplamente utilizada como herbicida, o ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) gera resíduos, contaminando o ar, água, solo e alimentos e a exposição a estes resíduos causa efeitos adversos à saúde humana (BUKOWSKA, 2006), como genotoxicidade (MADRIGAL-BUJAJIDAR; HERNÁNDEZ-CERUELOS; CHAMORRO, 2001), neurotoxicidade (TAYEB et al., 2010), hepatotoxicidade (BORTOLOZZI et al., 2001) e toxicidade renal (UYANIKGIL et al., 2009). Em contrapartida, os inoculantes microbianos vêm se destacando por solucionarem problemas ambientais (CALVO; NELSON; KLOEPPER, 2014) e exercerem efeitos similares aos sintéticos.

Devido aos efeitos inibitórios no enraizamento com a dose máxima aplicada, é possível que além de efeito bioestimulante, o produto descrito na patente BR 10 2018 007927 1, em altas concentrações, possa prejudicar o desenvolvimento vegetal, atuando como herbicida. Assim, para verificar tal efeito, os próximos estudos devem testar altas doses do produto, assim como investigar a existência dos possíveis efeitos de toxidez ao ambiente e à saúde humana.

#### 4.3. Segurança do produto à saúde humana

Hormônios, presentes em todos os vegetais, são ingeridos na dieta, com consequências para a fisiologia humana, porém seu modo de ação ainda não está completamente elucidado (CHANCLUD; LACOMBE, 2017). Alguns efeitos adversos decorrente do AIA vêm sendo relatados. Altas doses das auxinas AIA, ácido 2-naftoxiacético e ácido diclorofenóxiacético (2,4-D) causaram modificações significativas nas propriedades de biomembranas (FLASIŃSKI; PAULINA, 2017). Neutrófilos e linfócitos incubados com AIA apresentaram despolarização do potencial transmembrana mitocondrial, aumento nas atividades de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase, mostrando que o processo de morte celular induzido por AIA envolve a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (MELO et al., 2004).

Porém, especificamente para pele, o AIA vem, recentemente, sendo utilizado em tratamentos, e reconhecido como um novo fotossensibilizador, com efeitos adversos mínimos (JANG et al., 2011). O AIA associado à terapia fotodinâmica (PDT) foi apontado como um possível tratamento para queratoses actínicas (forma de carcinoma de células escamosas

ocorrem em peles cronicamente fotoexpostas) (GRANDI et al., 2016) dermatite seborreica facial (KWON et al., 2014) e acne de nível leve a moderado (JANG et al., 2011), enquanto o AIA associado à enzima *horseradish peroxidase* induziu os radicais livres à apoptose de células de melanoma humano (KIM; JEON; PARK, 2004).

Em nossos estudos, para células saudáveis, NIH/3T3, tanto para o AIA sintético quanto para o AIA microbiano, foram comprovados efeitos adversos mínimos à viabilidade celular, havendo diminuição da viabilidade de NIH/3T3 apenas quando aplicadas as maiores doses de AIA sintético.

#### 4.4. Potencial de Comercialização

Em uma análise inicial, além da alta produtividade de AIA, a presente invenção apresenta redução de custos de produção de AIA em relação ao produto comercial, devido à utilização de resíduos agroindustriais no processo fermentativo. Considerando os custos para a produção de AIA, preço do farelo de soja (R\$ 1,27 kg<sup>-1</sup>) (AGROLINK, 2018) e quantidade de triptofano (Mecassab®) acrescido ao substrato (R\$ 2,25 kg<sup>-1</sup> de resíduo), o custo de produção de 1 g de AIA custaria R\$ 1,70, enquanto a biomolécula purificada (Sigma Aldrich®) é vendida por R\$ 43,20.

As auxinas têm sido utilizadas amplamente e aplicadas como herbicidas, reguladores de crescimento vegetal e modificadores de outras propriedades de culturas vegetais (FLASIŃSKI; PAULINA, 2017). Como exemplo de reguladores vegetais usualmente utilizados pode-se citar o AIA, ácido indol-3-butírico (AIB), ácido naftalenoacético (ANA) e 2,4-D. O novo produto desenvolvido pode ser um concorrente direto dessas auxinas, com menor custo e maior facilidade de aplicação, já que as auxinas sintéticas são comercializadas em pó e necessitam ser diluídas para a aplicação às plantas, enquanto a nova tecnologia possibilita a aplicação direta para a finalidade indicada.

As auxinas também podem ser utilizadas como composto de biorreguladores para auxiliar em todos os estágios do desenvolvimento da cultura, como é o caso do Stimulate® (Stoller), cuja composição é citocinina (90 mg L<sup>-1</sup>), giberelina (50 mg L<sup>-1</sup>) e auxina (50 mg L<sup>-1</sup>), assim, o novo produto também pode ser utilizado como componente de bioestimulantes comerciais.

## 5. Conclusão

Neste estudo foi relatada, ineditamente, a produção de ácido indol-3-acético (AIA) pelo fungo *A. flavipes* (ATCC<sup>®</sup> 16814<sup>TM</sup>) e pelo processo de fermentação em estado sólido (FES). Entre as condições testadas, a melhor produtividade de AIA ocorre em farelo de soja (0,5 mm), com acréscimo de 15 mL de água e 1,5% de triptofano.

O produto foi comprovado como bioestimulante no clone IPB2 de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, incrementando o enraizamento, apresenta baixo custo de produção e pode ser comercializado a um preço inferior ao AIA sintético purificado. Assim, o produto foi registrado junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) sob o registro BR 10 2018 007927 1.

A aplicação do produto em estado sólido (PES) se destaca em relação ao produto em estado líquido (PEL), por apresentar resultados semelhantes e uma etapa a menos de processamento. A ação bioestimulante do PES ocorre na faixa de 5 a 15% (40 a 120 mg kg<sup>-1</sup> de AIA), sendo recomendada a aplicação da menor dose pela maior facilidade de preparo, menor necessidade de mão-de-obra e menores custos de produção.

Além das vantagens econômicas, o produto não é tóxico para fibroblastos (NIH/3t3), enquanto o AIA sintético apresentou toxidez a partir de 120 mg kg<sup>-1</sup>, e pode ser considerado ambientalmente sustentável, tendo em vista o aproveitamento de resíduos agroindustriais para a sua produção.

## 6. Referências bibliográficas

AGROLINK. **Cotações - farelo de soja.** Disponível em: <<https://www.agrolink.com.br/cotacoes/diversos/farelo-de-soja>>.

ARBORGEN. **Clone IPB2 – H15.** Disponível em: <[http://supertreeseedlings.com.br/wp-content/uploads/2015/03/GS-0001-14T\\_Laminas-Arborgen\\_IPB2.pdf](http://supertreeseedlings.com.br/wp-content/uploads/2015/03/GS-0001-14T_Laminas-Arborgen_IPB2.pdf)>. Acesso em: 22 jan. 2018.

BARKAWI, L. S.; TAM, Y. Y.; TILLMAN, J. A.; NORMANLY, J.; COHEN, J. D. A high-throughput method for the quantitative analysis of auxins. **Nature protocols**, v. 5, n. 10, p.

1609–1618, 2010.

BARROS-NETO, B.; SCARMINIO, I. S. E.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4th. ed. [s.l.] Bookman Editora, 2010.

BASON, M. M.; GORDON, V.; MAIBACH, H. I. Skin irritation: in vitro assays. **International Journal of Dermatology**, v. 30, n. 9, p. 623–626, 1991.

BOIVIN, S.; FONOUNI-FARDE, C.; FRUGIER, F. How auxin and cytokinin phytohormones modulate root microbe interactions. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1–12, 2016.

BORTOLOZZI, A.; DUFFARD, A. M. E.; DAJAS, F.; DUFFARD, R.; SILVEIRA, R. Intracerebral administration of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid induces behavioral and neurochemical alterations in the rat brain. **NeuroToxicology**, v. 22, n. 2, p. 221–232, 2001.

BRIC, J. M.; BOSTOCK, R. M.; SILVERSTONE, S. E. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 535–538, 1991.

BUKOWSKA, B. Toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid – molecular mechanisms. **Review Literature And Arts Of The Americas**, v. 15, n. 3, p. 365–374, 2006.

CALVO, P.; NELSON, L.; KLOEPPER, J. W. Agricultural uses of plant biostimulants. **Plant and Soil**, v. 383, p. 3–41, 2014.

CHANCLUD, E.; LACOMBE, B. Plant Hormones: key players in gut microbiota and human diseases? **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 9, p. 754–758, 2017.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.; CORTÉS-PENAGOS, C.; LÓPEZ-BUCIO, J. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 149, n. 3, p. 1579–1592, 2009.

DAYAN, F. E.; DUKE, S. O.; GROSSMANN, K. Herbicides as Probes in Plant Biology. **Weed Science**, v. 58, n. 3, p. 340–350, 2010.

DU JARDIN, P. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 3–14, 2015.

ECKERT, S. E.; HOFFMANN, B.; WANKE, C.; BRAUS, G. H. Sexual development of *Aspergillus nidulans* in tryptophan auxotrophic strains. **Archives of Microbiology**, v. 172, n. 3, p. 157–166, 1999.

FLASIŃSKI, M.; PAULINA, S. Phytohormone behavior in the model environment of plant and human lipid membranes. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 121, p. 6175–6183, 2017.

FREIRE, R. R. SCHMILDT, E. R.; LOPES, J. C.; CHAGAS, K.; MARQUES, H. I. P.; FILHO, J. C.; OLIVEIRA, J. P. B.; OTONI, W. C.; RODRIGO SOBREIRA ALEXANDRE, R. S. Rooting responses of black pepper (*Piper nigrum* cv. Bragantina) as affected by chemical, physical and microbiological properties of substrates and auxin. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n. 2, p. 126–133, 2017.

GEHLOT, A.; TRIPATHI, A.; ARYA, I. D.; ARYA, S. Influence of cutting diameter, auxin and rooting substrate on adventitious rooting from hardwood cuttings of *Azadirachta indica* A. Juss (Neem). **Advances in Forestry Science**, v. 2, n. 3, p. 49–61, 2015.

GRANDI, V.; BALDI, I.; CAPPUGI, P.; MORI, M.; PIMPINELLI, N. Indole 3-acetic acid-photodynamic therapy in the treatment of multiple actinic keratoses: A proof of concept pilot study. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 16, p. 17–22, 2016.

GROSSMANN, K. Auxin herbicides: Current status of mechanism and mode of action. **Pest Management Science**, v. 66, n. 2, p. 113–120, 2010.

GUMIERE, T.; RIBEIRO, C. M.; VASCONCELLOS, R. L. F.; CARDOSO, E. J. B. N. Indole-3-acetic acid producing root-associated bacteria on growth of Brazil Pine (*Araucaria angustifolia*) and Slash Pine (*Pinus elliottii*). **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 105, n. 4, p. 663–669, 2014.

GUPTA, V.; KUMAR, M.; BRAHMBHATT, H.; REDDY, C. R. K.; SETH, A.; JHA, B. Simultaneous determination of different endogenous plant growth regulators in common green seaweeds using dispersive liquid-liquid microextraction method. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, n. 11, p. 1259–1263, 2011.

HOYOS-CARVAJAL, L.; ORDUZ, S.; BISSETT, J. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. **Biological Control**, v. 51, n. 3, p. 409–416, 2009.

HUSSEIN, K. A.; KADHUM, H.; YASSER, K. The role of bacteria *Bacillus subtilis* in improving rooting response of Mung bean (*Vigna radiata*) cuttings. **Journal of Contemporary Medical**, v. 2, n. 7, p. 88–92, 2016.

JANG, M. S.; DOH, K.S.; KANG, J.S.; JEON, Y.S.; SUH, K.S.; KIM, S.T. A comparative split-face study of photodynamic therapy with indocyanine green and indole-3-acetic acid for the treatment of acne vulgaris. **British Journal of Dermatology**, v. 165, n. 5, p. 1095–1100, 2011.

KARADENIZ, A.; TOPCUOĞLU, Ş. F.; INAN, S. Auxin, gibberellin, cytokinin and abscisic acid production in some bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22,

n. 10, p. 1061–1064, 2006.

KIM, D. S.; JEON, S. E.; PARK, K. C. Oxidation of indole-3-acetic acid by horseradish peroxidase induces apoptosis in G361 human melanoma cells. **Cellular Signalling**, v. 16, n. 1, p. 81–88, 2004.

KWON, S. H.; JEONG, M. Y.; PARK, K. C.; YOUN, S. W.; HUH, C. H.; NA, J. I. A new therapeutic option for facial seborrheic dermatitis: Indole-3-acetic acid photodynamic therapy. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 28, n. 1, p. 94–99, 2014.

LEE, J. K.; KIM, D. B.; KIM, J. I.; KIM, P. Y. In vitro cytotoxicity tests on cultured human skin fibroblasts to predict skin irritation potential of surfactants. **Toxicology in Vitro**, v. 14, n. 4, p. 345–349, 2000.

LU, Q.; CHEN, L.; LU, M.; CHEN, G.; ZHANG, L. Extraction and analysis of auxins in plants using dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 5, p. 2763–2770, 2010.

MADRIGAL-BUJADAR, E.; HERNÁNDEZ-CERUELOS, A.; CHAMORRO, G. Induction of sister chromatid exchanges by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in somatic and germ cells of mice exposed in vivo. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 39, n. 9, p. 941–6, 2001.

MALUSÁ, E.; SAS-PASZT, L.; CIESIELSKA, J. Technologies for beneficial microorganisms inocula used as biofertilizers. **The Scientific World Journal**, p. 1–12, 2012.

MARKETS & MARKETS. **Top 10 Trends in Agricultural Biologicals Market Industry (Biopesticides, Biostimulants, Biofertilizers, Agricultural Inoculants, Agricultural Microbials, and Biological Seed Treatment) - Global Forecast to 2022**. Disponível em: <<http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/top-10-trend-agricultural-biological-market-139215554.html>>. Acesso em: 17 abr. 2017.

MELO, M. P.; LIMA, T. M.; PITHON-CURI, T. C.; CURI, R. The mechanism of indole acetic acid cytotoxicity. **Toxicology Letters**, v. 148, n. 1–2, p. 103–111, 2004.

PACURAR, D. I.; PERRONE, I.; BELLINI, C. Auxin is a central player in the hormone cross-talks that control adventitious rooting. **Physiologia plantarum**, v. 151, n. 1, p. 83–96, 2014.

PERALTA, K. D. ARAYA, T.; VALENZUELA, S.; SOSSA, K.; MARTÍNEZ, M.; PEÑA-CORTÉS, H.; SANFUENTES, E. Production of phytohormones, siderophores and population

fluctuation of two root-promoting rhizobacteria in *Eucalyptus globulus* cuttings. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 2003–2014, 2012.

SALAS-MARINA, M. A. SILVA-FLORES, M. A.; CERVANTES-BADILLO, M. G., ROSALES-SAAVEDRA, M. T.; ISLAS-OSUNA, M. A.; CASAS-FLORES, S. The plant growth-promoting fungus *Aspergillus ustus* promotes growth and induces resistance against different lifestyle pathogens in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 7, p. 686–696, jul. 2011.

SARWAR, M.; ARSHAD, M.; MARTENS, D. A.; FRANKENBERGER, W. T. Tryptophan-dependent biosynthesis of auxins in soil. **Plant and Soil**, v. 147, n. 2, p. 207–215, 1992.

SAUER, M.; ROBERT, S.; KLEINE-VEHN, J. Auxin: simply complicated. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 9, p. 2565–2577, 2013.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Auxin and plant-microbe interactions. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, p. 1–13, 2010.

SUKUMAR, P.; LEGUÉ, V.; VAYSSIÈRES, A.; MARTIN, F.; TUSKAN, G. A.; KALLURI, U. C. Involvement of auxin pathways in modulating root architecture during beneficial plant-microorganism interactions. **Plant, Cell and Environment**, v. 36, n. 5, p. 909–919, 2013.

TAYEB, W.; NAKBI, A.; TRABELSI, M.; ATTIA, N.; MILED, A.; HAMMAMI, M. Hepatotoxicity induced by sub-acute exposure of rats to 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid based herbicide “Désormone lourde”. **Journal of Hazardous Materials**, v. 180, n. 1–3, p. 225–233, 2010.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 146–161, 2013.

UYANIKGIL, Y.; ATES, U.; BAKA, M.; BIÇER, S.; ÖZTAS, E.; ERGEN, G. Immunohistochemical and histopathological evaluation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-induced changes in rat kidney cortex. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 82, n. 6, p. 749–755, 2009.

WONG, W. S.; TAN, S. N.; GE, L.; CHEN, X.; LETHAM, D. S.; YONG, J. W. H. The importance of phytohormones and microbes in biostimulants: Mass spectrometric evidence and their positive effects on plant growth. **Acta Horticulturae**, v. 1148, p. 49–60, 2016.

ZAMIR, R. RAB, A.; SAJID, M.; KHATTAK, G. S. S.; KHALIL, S. A.; SHAH, S. T. Effect of different auxins on rooting of semi hard and soft wood cuttings of guava (*Psidium guajava* L.) CV . Safeda. **The Nucleous**, v. 54, n. 1, p. 46–51, 2017.

ZHAO, L.; ZHANG, Y. Q. Effects of phosphate solubilization and phytohormone production of *Trichoderma asperellum* Q1 on promoting cucumber growth under salt stress. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 14, n. 8, p. 1588–1597, 2015.

ZHAO, Y. Auxin biosynthesis and its role in plant development. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 49–64, 2010.

## Capítulo 4: Influência de *Aspergillus niger*, produtor de fitases, no desenvolvimento de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*

### Resumo

A deficiência de fósforo é um problema recorrente nos solos tropicais e subtropicais. As fitases podem solucionar este problema de forma sustentável, degradando o fosfato na forma orgânica e liberando fosfato na forma inorgânica, disponível para a absorção radicular. As fitases podem ser produzidas de forma exógena por fungos do gênero *Aspergillus* e incrementar o crescimento e a nutrição vegetal. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da inoculação de *A. niger* cultivado por fermentação em estado sólido em farelo de trigo no desenvolvimento de mudas de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. O produto foi misturado, nas formas sólida e líquida ao substrato Carolina I® nas doses 85, 170, 255 e 340 U de fitase por kg<sup>-1</sup> de substrato. O plantio das estacas foi realizado nos substratos tratados e no controle. Foram realizadas avaliações de sobrevivência após 30 dias, determinados a porcentagem de enraizamento, comprimento da parte aérea e das raízes e as massas fresca e seca das raízes 40 dias pós-plantio, e após 5 meses, 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 por planta. A inoculação de fitases de *A. niger*, na maioria das variáveis, não alterou ou atuou prejudicando o desenvolvimento de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. Os tratamentos na forma líquida exerceram maior efeito prejudicial. Assim, nossos resultados indicam que, nas condições testadas, o micro-organismo produziu metabólitos fitotóxicos, causando danos às células vegetais. Em estudos futuros, sugerimos que a fitase produzida por *A. niger* seja testada em *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* na forma purificada.

Palavras-chave: fitases, fermentação em estado sólido, fósforo, fitato.

## 1. Introdução

O *Eucalyptus* é o gênero florestal mais plantado no Brasil, ocupando 5,6 milhões de hectares, 73% do total da área de árvores plantadas. A produtividade média das florestas lidera o ranking global, atingindo 35,7 m<sup>3</sup>/ha ao ano (IBA, 2017). Para o estabelecimento das populações de *Eucalyptus*, nas fases iniciais de desenvolvimento e no primeiro ano pós-plantio, há grande necessidade de fósforo (P) (FERNANDEZ et al., 2000). No entanto, a deficiência de fósforo (P) é considerada o fator mais limitante na produção de culturas vegetais, em geral, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais (RAMAEKERS et al., 2010).

A fixação de fosfato na fase sólida do solo é considerada importante para a disponibilidade do macronutriente e, frequentemente, atribuída à forte ligação de ânions ortofosfato. No entanto, a fixação e subsequente imobilização de fitato e ácido fítico no solo é muitas vezes mais frequente do que a dos ânions de ortofosfato, tornando o fitato, forma indisponível para absorção radicular, a principal forma de P no solo (GERKE, 2015).

Para atender a demanda da agricultura, fertilizantes convencionais com base de P são usados, e quando em excesso, têm o potencial de causar a poluição de água, eutrofização da via fluvial, diminuição da fertilidade do solo e acumulação de elementos tóxicos, como selênio (Se) e arsênico (As) no solo (ALORI et al., 2017). Assim, a utilização de biofertilizantes que promovam o incremento de P é promissora do ponto de vista ecológico, possibilitando a substituição dos produtos químicos pelos biológicos e solucionando os problemas de infertilidade dos solos (BABALOLA & GLICK, 2012).

A função de biofertilizante pode ser exercida pelas enzimas fitases (EC 3.1.3.8). Essas enzimas correspondem a um sub grupo das fosfatases que contribuem para a disponibilização de P, iniciando a desfosforilação gradual do ácido fítico (ou fitato, quando em forma de sal) para libertar fósforo inorgânico (HIGGINS & CRITTENDEN, 2015). As fitases vêm sendo foco de pesquisas nas últimas duas décadas, devido às aplicações na nutrição, proteção ambiental e saúde humana (LEI et al., 2007).

Todos organismos, incluindo plantas, produzem fitases para funções intra e intercelulares, porém, os fungos geralmente produzem maiores quantidades da enzima e entre os gêneros fúngicos, o *Aspergillus* é relatado como capaz de produzir quantidades extracelulares significativas (HUNG & LEE RUTGERS, 2016). Por outro lado, a aplicação comercial e manutenção de tratamentos fúngicos com propriedades específicas podem ser dificultadas

devido à natureza diversa e adaptativa do crescimento. Pequenas diferenças nas condições do ambiente e do solo podem modificar drasticamente os processos metabólicos do fungo de uma área para outra, tornando essas aplicações imprevisíveis (HUNG & LEE RUTGERS, 2016).

Entre as espécies de *Aspergillus* produtoras de fitase, a inoculação de *Aspergillus niger*, cultivado por fermentação líquida, vêm sendo relatada como eficiente para aumentar a absorção de P em espécies vegetais (GUJAR et al., 2013; MENDES et al., 2017), porém, até o momento não há relatos sobre a inoculação de *A. niger*, cultivado por fermentação em estado sólido (FES), como biofertilizante.

A FES é uma técnica de cultivo microbiano que possui como vantagem a utilização de resíduos agro-industriais e subprodutos como substratos para o crescimento de micro-organismos, contribuindo para solucionar descartes excedentes e reduzindo problemas de poluição (SINGH NEE NIGAM; PANDEY, 2009). Além das vantagens ambientais, a produção de fitases por FES não necessita de grandes investimentos, resultando num produto final de baixo custo, o que difere das fitases comerciais que possuem alto valor (REDDY; KIM; KAUL, 2017).

Entre os substratos utilizados na FES para produção de fitase, o farelo de trigo apresenta os resultados mais promissores (GULL et al., 2013), o que pode ser justificado pelas quantidades significativas de fitato presentes neste resíduo (DOST & TOKUL, 2006). Assim, a utilização do farelo de trigo no processo fermentativo pode proporcionar, além do crescimento fúngico, a liberação P adicional na presença das fitases.

Dessa forma, este trabalho objetivou avaliar, pela primeira vez, a ação do micro-organismo *Aspergillus niger* 01 cultivado por fermentação em estado sólido em farelo de trigo, com alta produtividade de fitase, no desenvolvimento de mudas de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1. Preparação do inóculo

O micro-organismo *Aspergillus niger* 01 (CBMAI 2084) cultivado por 120 h a 30°C em farelo de trigo, foi confirmado como produtor de aproximadamente 1000 U mL<sup>-1</sup> de fitase, a unidade de fitase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μmol de

*p*-nitrofenol por minuto de reação. As condições de cultivo foram replicadas em maior escala para a inoculação em *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (clone IPB2).

A produção consistiu no cultivo do micro-organismo em *slants* com meio *potato dextrose agar* (PDA) por 96 h a 30°C. Após o crescimento, o conteúdo do *slant* foi suspenso em 6 mL de água, cuja suspensão foi ajustada a  $10^7$  de esporos mL<sup>-1</sup> e 4 mL foram utilizados para inocular o meio de cultivo. O meio utilizado para a FES foi composto de 50% de farelo de trigo e 50% de água destilada (m/m). Os substratos (20 g) foram inoculados em frascos Erlenmeyer (500 mL) e incubados a 30°C por 120 h.

Após este período, foram preparados dois tipos de tratamentos para a aplicação às plantas, na forma sólida e na forma líquida. A forma sólida (S) consistiu no produto resultante da fermentação contendo resíduo e micro-organismo. Já para a preparação da forma líquida (L) foram adicionados 100 mL de água destilada aos frascos e o conteúdo homogeneizado por agitação manual e filtrado em duas camadas de gaze de algodão.

## 2.2. Implantação do experimento

Ambas formas de aplicação foram misturadas ao substrato Carolina I® (turfa *Sphagnum*, casca de arroz torrefada e vermiculita) com auxílio de betoneira e ajustadas para as doses 85, 170, 255 e 340 U de fitase por kg<sup>-1</sup> de substrato. Para o controle foi utilizado apenas o substrato comercial. Os substratos foram depositados em tubetes plásticos de 55 m<sup>3</sup> e umedecidos com o auxílio de nebulizadores.

O experimento foi conduzido no viveiro pertencente à empresa Avam Flora, localizado no município de Águas de Santa Bárbara-SP nas coordenadas, 22°52'50'' S e 49° 14'20'' O. Estacas caulinares, de 3 a 6 cm de comprimento e 1,5 a 2,5 mm de diâmetro do clone de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (clone IPB2 da ArborGen) foram plantadas nos substratos tratados e no controle.

O experimento foi instalado em delineamento experimental inteiramente casualizado em arranjo fatorial diferenciado 2 x 4, sendo duas formas de aplicação (sólida e líquida) e quatro doses (85, 170, 255 e 340 U kg<sup>-1</sup> de substrato) mais o controle. Cada unidade experimental correspondeu a 88 mudas do clone IPB2.

As bandejas contendo os tubetes foram levadas à casa de vegetação, onde permaneceram por 30 dias. Após este período, as estacas permaneceram 10 dias em casa de sombra para

aclimatação e foram transferidas para a área a pleno sol por mais 4 meses e meio, totalizando 5 meses de experimento. O manejo hídrico foi realizado de acordo com a necessidade de irrigação, observando a saturação de água do substrato.

### 2.3. Avaliações morfológicas

A avaliação da porcentagem de sobrevivência foi realizada na transição da casa de vegetação para a casa de sombra, após 30 dias de experimento. Após os 40 dias de experimento foram coletadas 15 mudas centrais de cada unidade experimental para a realização das avaliações destrutivas. As plantas foram seccionadas na interface entre raiz e parte aérea e foram determinados, imediatamente após o corte, a porcentagem de enraizamento e o comprimento médio das raízes com auxílio de fita métrica e massa fresca média radicular com auxílio de balança analítica. Tais avaliações foram propostas neste período, a fim de verificar as condições do sistema radicular recém-formado.

O experimento foi transferido para área a pleno sol e conduzido até totalizar 5 meses, quando foi realizada nova avaliação destrutiva em mais 15 plantas e determinados o comprimento médio da parte aérea com auxílio de fita métrica, diâmetro médio do colo com auxílio de paquímetro, a massa seca média total com auxílio de balança analítica, a intensidade de coloração verde das folhas com auxílio do clorofilômetro SPAD e a contagem do número de folhas por planta.

### 2.4. Análise estatística

Os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e às médias comparadas pelos testes de Dunnett ( $p \leq 0,05$ ), a fim de comparar as médias dos tratamentos com o grupo controle. As médias dos fatores (formas de aplicação e doses), bem como sua interação, foram comparadas pelo teste de Scott Knott ( $p \leq 0,05$ ). As análises foram realizadas no software Assistat 7.7.

### 3. Resultados

Os tratamentos proporcionaram modificações morfológicas em relação ao controle (Tabelas 1 e 2). Em relação às avaliações realizadas no meio do ciclo de produção, houve redução da massa fresca radicular pela ação do tratamento com 255 U kg<sup>-1</sup> de S e por todas as doses de L em relação ao controle. Não houve diferenças para as porcentagens de sobrevivência e enraizamento e para o comprimento médio das raízes (Tabela 1).

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.

Dose (U kg <sup>-1</sup> )	Forma de aplicação	Sobrevivência (%)	Enraizamento (%)	Comprimento das raízes (cm)	Massa fresca radicular (mg)
Controle		93,94 ± 0,66	62,22 ± 13,88	6,66 ± 1,22	14,05 ± 1,99
85	S	90,91 ± 4,10	75,56 ± 13,88	8,14 ± 4,50	11,87 ± 3,41
170	S	90,91 ± 1,14	66,67 ± 11,55	6,06 ± 1,25	12,86 ± 4,71
255	S	91,67 ± 2,37	57,78 ± 10,18	5,03 ± 0,49	8,00 ± 1,59*
340	S	83,71 ± 4,59	71,11 ± 3,85	6,58 ± 3,09	12,73 ± 3,49
85	L	85,98 ± 8,68	37,74 ± 3,82	2,93 ± 1,67	4,05 ± 0,78*
170	L	93,94 ± 1,74	40,00 ± 13,33	4,60 ± 1,77	6,21 ± 1,65*
255	L	97,35 ± 1,31	53,33 ± 6,67	2,09 ± 0,80	3,09 ± 0,93*
340	L	96,59 ± 1,14	37,78 ± 10,18	2,69 ± 1,41	3,26 ± 0,51*

\*Médias estatisticamente diferentes do controle pelo Teste de Dunnett ( $p \leq 0,05$ ).

Para as avaliações ao fim do experimento, as alterações morfológicas foram mais evidentes (Tabela 2). O tratamento com 85 U kg<sup>-1</sup> de S, quando comparado ao controle, aumentou comprimento da parte aérea e a intensidade de coloração verde das plantas, porém, também provocou a redução da massa seca total e do número de folhas das plantas. Os tratamentos com 170 e 255 U kg<sup>-1</sup> de S incrementaram o diâmetro do colo e o SPAD do clone IBP2 em relação ao controle. Porém, o tratamento com 170 U kg<sup>-1</sup> também promoveu a redução da massa seca total e do número de folhas; enquanto o tratamento com 255 U kg<sup>-1</sup> não alterou a massa seca total e aumentou o número de folhas em relação ao controle. A maior dosagem de S (340 U kg<sup>-1</sup>) atuou reduzindo a massa seca total aumentando o índice de coloração verde das plantas e mantendo os demais fatores inalterados em relação ao controle.

Com exceção do índice de coloração verde, que foi incrementado, todos os tratamentos com L mantiveram inalteradas ou prejudicaram as variáveis relativas ao desenvolvimento vegetal (Tabela 2). Houve redução no comprimento da parte aérea em razão dos tratamentos com 85, 170 e 255 U kg<sup>-1</sup>, redução da massa seca total para todas as doses aplicadas e redução do número de folhas com o tratamento de 255 U kg<sup>-1</sup>.

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.

Dose (U kg <sup>-1</sup> )	Forma de aplicação	Comprimento parte aérea (cm)	Diâmetro do colo (mm)	Massa seca total (g)	SPAD	Nº de folhas
Controle		24,27 ± 0,60	3,92 ± 0,12	6,97 ± 0,42	41,87 ± 1,70	51,00 ± 7,00
85	S	27,34 ± 1,20*	3,98 ± 0,17	5,19 ± 0,35*	56,43 ± 7,20*	42,67 ± 5,00*
170	S	25,47 ± 1,00	4,20 ± 0,14*	6,15 ± 0,37*	68,11 ± 3,30*	43,40 ± 4,00*
255	S	24,67 ± 1,50	4,31 ± 0,15*	6,95 ± 0,68	65,31 ± 3,20*	57,27 ± 3,00*
340	S	25,10 ± 0,90	4,04 ± 0,15	6,07 ± 1,30*	62,65 ± 1,30*	49,87 ± 4,00
85	L	20,20 ± 2,30*	3,79 ± 0,32	5,19 ± 0,96*	61,34 ± 10,50*	52,33 ± 9,00
170	L	21,44 ± 0,80*	3,76 ± 0,22	4,87 ± 0,98*	58,09 ± 5,70*	50,33 ± 5,00
255	L	21,26 ± 1,30*	3,75 ± 0,20	5,26 ± 0,71*	54,13 ± 10,30*	43,07 ± 7,00*
340	L	24,23 ± 1,00	3,76 ± 0,17	6,03 ± 0,77*	62,33 ± 1,50*	47,40 ± 5,00

\*Médias estatisticamente diferentes do controle pelo Teste de Dunnett ( $p \leq 0,05$ ).

Houve interação entre as doses e formas de aplicação para as variáveis sobrevivência, comprimento da parte aérea, diâmetro do colo, massa seca total, índice de coloração verde e número de folhas (Tabela 3) e respostas diversas às doses aplicadas em cada uma das variáveis.

A porcentagem de sobrevivência de *E. grandis* x *E. urophylla* foi reduzida pela aplicação da menor dose de L (85 U kg<sup>-1</sup>) e pela maior dose de S (340 U kg<sup>-1</sup>), os demais tratamentos não apresentaram diferenças entre si. Já para a massa seca total, as doses intermediárias causaram as maiores modificações, a variável foi reduzida com as doses 170 e 255 U kg<sup>-1</sup> de L em comparação com S e a dose 255 U kg<sup>-1</sup> de S e a dose 340 U kg<sup>-1</sup> de L produziram as maiores massas secas.

A menor dose de S resultou em maior comprimento da parte aérea, já nos tratamentos com L, a menor dose promoveu a maior redução no comprimento da parte aérea, enquanto a maior dose induziu o maior comprimento. Houve redução do comprimento da parte aérea quando aplicadas 85, 170 e 255 U kg<sup>-1</sup> de L quando comparados a S.

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<sup>-1</sup> 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.

Dose (U kg <sup>-1</sup> )	Sobrevivência (%)		Comp. da parte aérea (cm)		Diâmetro do colo (mm)	
	Forma de aplicação					
	S	L	S	L	S	L
85	90,91 aA	85,98 bA	27,37 aA	20,20 cB	3,98 bA	3,79 aB
170	90,91 aA	93,94 aA	25,47 bA	21,44 bB	4,20 aA	3,76 aB
255	91,67 aA	97,35 aA	24,67 bA	21,26 bB	4,31 aA	3,75 aB
340	83,71 aB	96,59 aA	25,10 bA	24,23 aA	4,04 bA	3,76 aB
Dose (U kg <sup>-1</sup> )	Massa seca total (g)		SPAD		Nº de folhas	
	S	L	S	L	S	L
	85	5,19 cA	5,19 bA	56,43 bB	61,34 aA	42,67 cB
170	6,15 bA	4,87 bB	68,11 aA	58,09 bB	43,40 cB	50,33 aA
255	6,95 aA	5,26 bB	65,31 aA	54,13 bB	57,27 aA	43,07 bB
340	6,07 bA	6,03 aA	62,65 aA	62,33 aA	49,87 bA	47,40 bA

Letras minúsculas comparam médias entre colunas. Letras maiúsculas comparam médias entre linhas. Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott Knott ( $p \leq 0,05$ ).

Houve aumento do diâmetro do colo das mudas pela aplicação das doses intermediárias, 170 e 255 U kg<sup>-1</sup> de S, em relação às demais doses e diminuição pela aplicação de L em comparação com o S em todas as doses do produto.

O índice de cor verde, determinado pelo clorofilômetro SPAD, foi aumentado nas doses de 170 a 340 U kg<sup>-1</sup> em relação à menor dose de S; enquanto para L, os menores índices ocorreram nas doses 170 e 255 U kg<sup>-1</sup>. A aplicação de S reduziu o SPAD em relação a L na dose 85 U kg<sup>-1</sup> e o oposto ocorreu para as doses 170 e 255 U kg<sup>-1</sup>. Para dose 340 U kg<sup>-1</sup> não houve diferença entre as formas de aplicação.

Os maiores números de folhas ocorreram com a aplicação de 255 U kg<sup>-1</sup> de S e 85 e 170 U kg<sup>-1</sup> de L. A aplicação de S reduziu o número de folhas em relação a L na dose 85 e 170 U kg<sup>-1</sup>, e o oposto ocorreu para 255 U kg<sup>-1</sup>. Para dose 340 U kg<sup>-1</sup> não houve diferença entre as formas de aplicação.

Não houve interação entre os fatores doses e formas de aplicação na porcentagem de enraizamento, comprimento médio das raízes e massa fresca radicular, no entanto, a forma de aplicação foi significativa para as três variáveis. Em todos os casos, o desenvolvimento das mudas foi prejudicado pelo tratamento com L em relação a S (Figura 1).

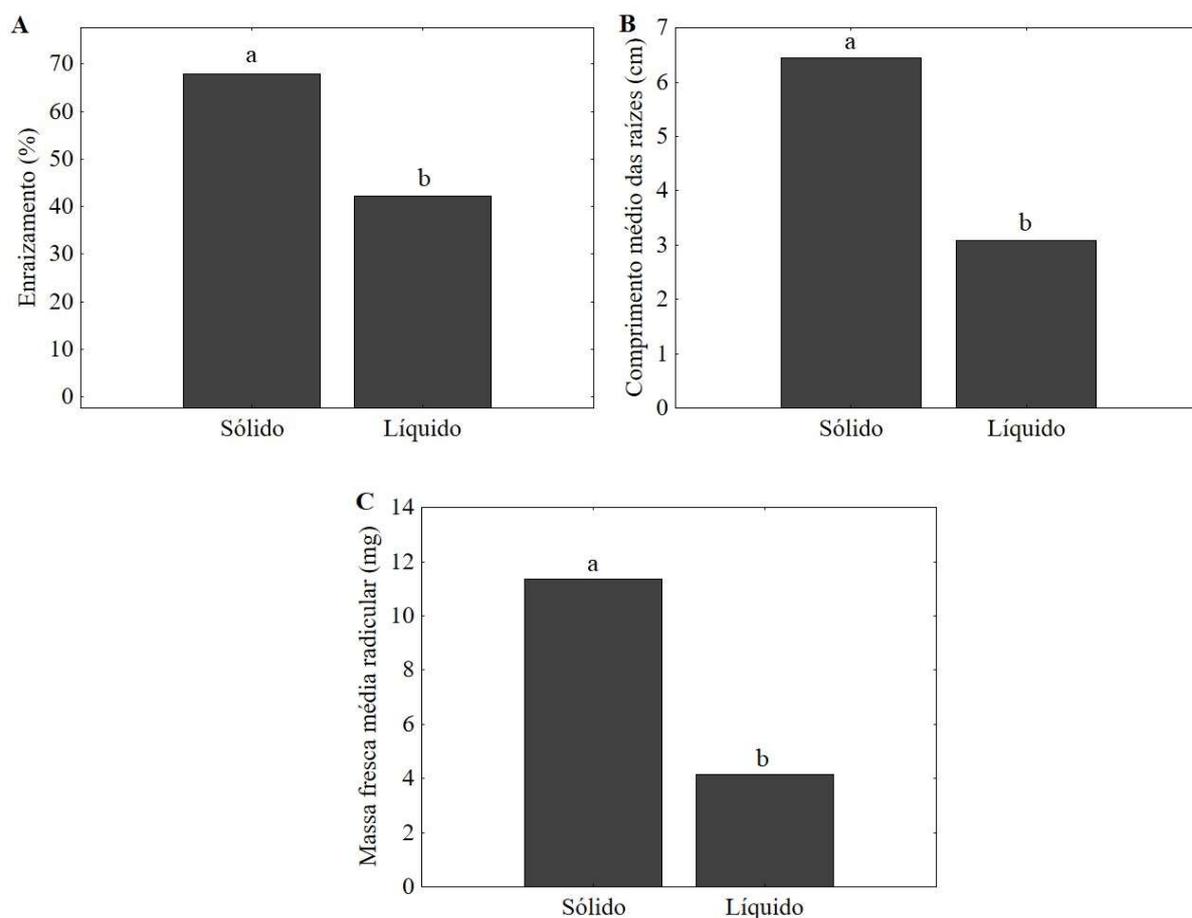


Figura 1. Efeito das formas de aplicação do produto, sólido e líquido, na porcentagem de enraizamento (A), no comprimento médio das raízes (B) e na massa fresca média radicular (C), 40 dias após a aplicação dos tratamentos.

Médias comparadas pelo teste de Scott Knott ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4. Discussão

Os efeitos da aplicação de *A. niger* em *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (clone IPB2), ao contrário do esperado, resultaram em poucas alterações positivas relacionadas ao desenvolvimento vegetal, opostamente a outros estudos em que a atividade das fitases de origem microbiana tem contribuído para melhorar o desenvolvimento de diversas espécies.

A espécie fúngica não patogênica *Candida tropicalis* (NCIM 3321) foi relatada como capaz de produzir fitase extracelular e estimular o crescimento vegetal, aumentando o P disponível no solo (PUPPALA et al., 2018). Dez isolados de *Trichoderma* derivados da rizosfera de *A. marina* foram testados quanto à sua capacidade *in vitro* de solubilização de

fosfato utilizando  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  como fosfato insolúvel, todos os isolados foram capazes de solubilizar o fosfato, demonstrando o potencial do gênero fúngico em aumentar a fertilidade do solo e o crescimento vegetal em zonas de mangue (SARAVANAKUMAR; ARASU; KATHIRESAN, 2013). Em milho, a ação de fitases produzidas por *B. amyloliquefaciens* FZB45 quebraram as ligações orgânicas, solubilizando fosfatos, e, assim, auxiliando o crescimento das plântulas (IDRISS et al., 2002).

A utilização de *Aspergillus niger* diretamente nas culturas vegetais e para a transformação de plantas também promoveu resultados satisfatórios para aumentar a absorção vegetal de fósforo em estudos anteriores. A aplicação de *Aspergillus niger* produzido por fermentação líquida promoveu o crescimento e a absorção de P de *Trifolium repens* (MENDES et al., 2017). Em condições controladas, a co-inoculação de *A. niger* e *Trichoderma harzianum* contribuíram para o crescimento de grão-de-bico (*Cicer arietinum*) incluindo alterações nos comprimentos da parte aérea e das raízes e nas massas secas da parte aérea e das raízes (YADAV; VERMA; TIWARI, 2011). Plantas de *Arabidopsis thaliana* geneticamente modificadas por *Aspergillus niger* (com expressão de genes de fitase extracelular) absorveram 16 vezes mais fósforo de meios estéreis em relação ao controle (RICHARDSON et al., 2001). Em milho com expressão de fitase extracelular de *Aspergillus niger* e ferritina de soja foi relatada maior absorção tanto de fósforo quanto de ferro (DRAKAKAKI et al., 2005).

Apesar dos efeitos positivos em outros estudos, a inoculação ou tratamentos fúngicos podem apresentar algumas dificuldades e culminar em efeitos indesejáveis. Esses efeitos adversos podem ocorrer devido à natureza diversa e a adaptativa do crescimento fúngico a diferentes ambientes, alterando os processos metabólicos do fungo e tornando as aplicações microbianas imprevisíveis (HUNG & LEE RUTGERS, 2016).

Em nosso trabalho, esses efeitos adversos foram relatados. Na maioria das variáveis não houve diferença entre os tratamentos ou o desenvolvimento vegetal foi prejudicado com relação ao controle. Os efeitos prejudiciais ocorreram com maior intensidade nos tratamentos com L, em que a forma de aplicação favorece o rápido fornecimento dos metabólitos disponíveis.

O *Aspergillus niger* é um dos micro-organismos com maior importância na biotecnologia, com uso há muitas décadas na produção de enzimas extracelulares e ácido cítrico na indústria de alimentos e considerado GRAS (geralmente reconhecido com seguro) pela United States Food and Drug Administration. No entanto, as cepas de *A. niger* podem produzir mais uma

série de metabólitos secundários, entre eles micotoxinas como as malforminas, terreína e ocratoxina A (OTA) (SCHUSTER et al., 2002).

A ocratoxina A é uma toxina nefrotóxica, hepatotóxica, teratogênica, imunotóxica e fitotóxica. Em testes fisiológicos, proteômicos e transcricionais em folhas *Arabidopsis thaliana* infectadas por *Aspergillus ochraceus* 3,4412, um alto produtor de OTA, foram descritos diminuição da concentração de clorofila, acúmulo de espécies reativas de oxigênio, maior expressão de genes de defesa e supressão das vias metabólicas primárias, sugerindo a possibilidade de danos estruturais e disfunção das mitocôndrias (HAO et al., 2015). As malforminas, família de produtos metabólicos de *A. niger*, induziram curvatura das raízes em milho e a malformação de feijão (CURTIS, 1958). A produção de terreína por *A. terreus* foi altamente induzida pelo meio de cultivo, exercendo atividade fitotóxica no crescimento vegetal de beterraba e lesões na superfície dos frutos de banana e pera (ZAEHLE et al., 2014). Assim, nossos resultados sugerem que o metabolismo micro-organismo foi modificado nas condições de cultivo, produzindo metabólitos fitotóxicos e prejudicando o desenvolvimento de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*.

Os problemas ocasionados pelos metabólitos fitotóxicos podem ser solucionados pela purificação enzimática, por esse processo há a remoção de metabólitos de efeitos adversos e a otimização da utilização enzimática, resultando em um processo mais específico. No entanto, extratos enzimáticos purificados tendem a ser mais onerosos em relação aos brutos, encarecendo o processo produtivo.

## 5. Conclusão

Os efeitos da alta produtividade de fitase por *Aspergillus niger* cultivado em farelo de trigo, em geral, não ocasionou incrementos no desenvolvimento de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. O desenvolvimento vegetal foi prejudicado, principalmente, nos tratamentos com o composto líquido, sugerindo que o metabolismo fúngico, nas condições testadas, produziu metabólitos fitotóxicos, causando danos às células vegetais. Assim, devido aos efeitos adversos causados pela inoculação fúngica, sugerimos que a fitase produzida por *A. niger* 01 seja testada em *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em menores doses e na forma purificada.

## 6. Referências Bibliográficas

- ALORI, E. T.; GLICK, B. R.; BABALOLA, O. O. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–8, 2017.
- BABALOLA, O. O.; GLICK, B. R. The use of microbial inoculants in African agriculture: current practice and future prospects. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, v. 10, n. 3–4, p. 540–549, 2012.
- DRAKAKAKI, G.; MARCEL, S.; GLAHN, R.P.; LUND, E.K.; PARIAGH, S.; FISCHER, R.; CHRISTOU, P.; STOGER, E. Endosperm-specific co-expression of recombinant soybean ferritin and *Aspergillus* phytase in maize results in significant increases in the levels of bioavailable iron. **Plant Molecular Biology**, v.59, p. 869–880, 2005.
- FERNANDEZ, J. Q. P.; DIAS, L. E.; BARROS, N. F.; NOVAIS, R. F.; MORAES, E. J. Productivity of *Eucalyptus camaldulensis* affected by rate and placement of two phosphorus fertilizers to a Brazilian Oxisol. **Forest Ecology and Management**, v. 127, n. 1–3, p. 93–102, 2000.
- GERKE, J. Phytate (inositol hexakisphosphate) in soil and phosphate acquisition from inositol phosphates by higher plants. A review. **Plants**, v. 4, n. 2, p. 253–266, 2015.
- GUJAR, P. D.; BHAVSAR, K. P.; KHIRE, J. M. Effect of phytase from *Aspergillus niger* on plant growth and mineral assimilation in wheat (*Triticum aestivum* Linn.) and its potential for use as a soil amendment. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 9, p. 2242–2247, 2013.
- GULL, I.; HAMEED, A.; ASLAM, M.S.; ATHAR, M.A. Optimization of phytase production in solid state fermentation by different fungi. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, p. 5207–5212, 2013.
- HAO, J.; WU, W.; WANG, Y.; YANG, Z.; LIU, Y.; LV, Y.; ZHAI, Y.; YANG, J.; LIANG, Z.; HUANG, K.; XU, W. *Arabidopsis thaliana* defense response to the ochratoxin A-producing strain (*Aspergillus ochraceus* 3.4412). **Plant Cell Reports**, v. 34, n. 5, p. 705–719, 2015.
- HIGGINS, N.F.; CRITTENDEN, P.D. Phytase activity in lichens. **New Phytologist**, v. 208, p. 544–554, 2015.
- HUNG, R.; LEE RUTGERS, S. Applications of *Aspergillus* in plant growth promotion. In: GUPTA, V. **New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering**. Amsterdã: Elsevier. 2016, p. 215-219.

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

IDRISS, E.E.; MAKAREWICZ, O.; FAROUK, A.; ROSNER, K.; GREINER, R.; BOCHOW, H.; RICHTER, T.; BORRISS, R. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. **Microbiology**, v. 148, p. 2097–2109, 2002.

LEI, G.X.; PORRES, J.M.; MULLANEY, E.J.; BRINCH-PEDERSEN, H. Phytase: source, structure and application. In: POLAINA, J; MACCABE, A.P. **Industrial enzymes**. The Netherlands:Springer. 2007, p. 505-529.

MENDES, G. D. O.; GALVEZ, A.; VASSILEVA, M.; VASSILEV, N. Fermentation liquid containing microbially solubilized P significantly improved plant growth and P uptake in both soil and soilless experiments. **Applied Soil Ecology**, v. 117–118, p. 208–211, 2017.

SINGH NEE NIGAM, P.; PANDEY, A. **Biotechnology for agro-industrial residues utilisation: Utilisation of agro-residues**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2009.

PUPPALA, K. R.; NAIK, T.; SHAIK, A.; DASTAGER, S.; KUMAR V, R.; KHIRE, J.; DHARNE, M. Evaluation of *Candida tropicalis* (NCIM 3321) extracellular phytase having plant growth promoting potential and process development. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 13, p. 225–235, 2018.

RAMAEKERS, L.; REMANS, R.; RAO, I. M.; BLAIR, M. W.; VANDERLEYDEN, J. Strategies for improving phosphorus acquisition efficiency of crop plants. **Field Crops Research**, v. 117, p. 169-176, 2010.

REDDY, C. S.; KIM, S. C.; KAUL, T. Genetically modified phytase crops role in sustainable plant and animal nutrition and ecological development: a review. **3 Biotech**, v. 7, n. 3, 2017.

RICHARDSON, A.E.; HADOBAS, P.A.; HAYES, J.E. Extracellular secretion of *Aspergillus* phytase from *Arabidopsis* roots enables plants to obtain phosphorus from phytate. **The Plant Journal**, v. 25, p. 641–649, 2001.

SARAVANAKUMAR, K.; ARASU, V. S.; KATHIRESAN, K. Effect of *Trichoderma* on soil phosphate solubilization and growth improvement of *Avicennia marina*. **Aquatic Botany**, v.104, p. 101-105, 2013.

SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J. C.; VAN DIJCK, P. W. M. On the safety of *Aspergillus niger* - A review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 4–5, p. 426–435, 2002.

YADAV, J.; PRAKASH, J.; TIWARI, K. N. Plant growth promoting activities of fungi and

their effect on chickpea plant growth. **Asian Journal of Biological Sciences**, v. 4, n. 3, p. 291–299, 2011.

YAN, Y.; XIANG, LI.; WANG, G.; GUI, X.; LI, G.; SU, F.; WANG, X.; LIU, T. Biotechnological preparation of biodiesel and its high-valued derivatives: A review. **Applied Energy**, v. 113, p. 1614–1631, 2014.

ZAEHLE, C.; GRESSLER, M.; SHELEST, E.; GEIB, E.; HERTWECK, C.; BROCK, M. Terrein biosynthesis in *Aspergillus terreus* and its impact on phytotoxicity. **Chemistry and Biology**, v. 21, n. 6, p. 719–731, 2014.

**Atividades complementares:** período sanduíche na Universidade Técnica de Dresden (TU Dresden), de julho a outubro de 2017 com auxílio da bolsa PDSE/CAPES.

Supervisora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Jutta Ludwig-Müller

## 1. Introdução

Micro-organismos presentes na rizosfera, benéficos e prejudiciais, podem penetrar o sistema radicular e outros tecidos vegetais e desencadear modificações à nível morfológico, celular e molecular, por modificações do equilíbrio de fitohormônios (BOIVIN; FONOUNI-FARDE; FRUGIER, 2016).

O ácido indol-3-acético (AIA) é um fitohormônio também produzido por micro-organismos. A manipulação do AIA por micro-organismos pode acontecer de diversas formas: 1 - micro-organismos benéficos podem aumentar a disponibilidade de AIA, estimulando o crescimento vegetal, provavelmente para benefício próprio, porém sem causar danos ao hospedeiro; 2 - a concentração de auxina pode ser ajustada por micro-organismos de modo que possam colonizar a planta e explorar a auxina disponível para benefício próprio, causando efeito patogênico e usando a auxina como sinalizador para regular genes de patogenicidade; 3 - a auxina pode ser usada para aumentar a expressão de genes necessários na reação de defesa, assim baixas concentrações de AIA indicam aumento da susceptibilidade vegetal à colonização de micro-organismos; 4 - a auxina pode gerar facilitar a entrada de patógenos, também pela alta produção de expansinas, facilitando a penetração da parede celular; 5 - O AIA é tóxico para diversos micro-organismos colonizadores, no entanto, altas concentrações de AIA são inibitórias ao crescimento vegetal, assim pode haver um desequilíbrio nos níveis de AIA vegetal, porém, provavelmente, o desenvolvimento vegetal não é afetado por mecanismos de produção de AIA em defesa contra patógenos. Dentro dessas possibilidades existem muitas variações, que podem ser exploradas pelas plantas para controlar a colonização microbiana (LUDWIG-MÜLLER, 2015).

## 2. Objetivo

No estágio financiado pela bolsa PDSE (processo 88881.133019/2016-01) o objetivo foi avaliar a expressão de genes relacionados à produção de AIA e verificar se houve colonização do micro-organismo em raízes *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (clone IBP2) decorrente da inoculação do bioestimulante descrito na patente BR 10 2018 007927 1, produzida durante o doutorado da aluna.

## 3. Materiais e métodos

Os experimentos foram realizados no Instituto de Botânica pertencente à Universidade Técnica de Dresden, Dresden, Alemanha. As amostras foram liofilizadas a -60°C por 24h para serem transportadas para a Alemanha.

### 3.1. Extração e quantificação de RNA e DNA

Para a extração do RNA das raízes foram utilizados os kits RNazol® RT e NucleoSpin RNA Plant®. O RNA foi quantificado pelo espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific), e em seguida foi procedida a eletroforese em gel agarose (1,5 %) com tampão MOPS (3-N-morfolino ácido propanosulfônico).

O DNA microbiano foi extraído usando o kit E.Z.N.A.® Fungal DNA e o DNA vegetal foi extraído usando o kit innuPREP Plant DNA®. Os DNAs foram quantificados pelo espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific).

### 3.2. qPCR e sequenciamento

Como gene de referência, para o DNA microbiano, foram testados os primers inespecíficos ITS, NS e LS e também delineado um par de primers utilizando as sequências do micro-organismo disponíveis no NCBI (National Center for Biotechnology Information), processadas pelos softwares Primer3Plus e Geneious®. As sequências cruzadas com o banco disponível no Blast. Para o primer vegetal foi selecionado o Elongation Factor 1 $\alpha$  (EF1 $\alpha$ ) como gene de referência. Para o PCR em tempo real foi utilizado o qPCRBIO SyGreen Mix (PCR

Biosystems). O programa do qPCR utilizado foi composto por 95 °C por 2 min; 35 ciclos de 95 °C por 45'', 50-70°C por 30'' e 72°C por 20'', com ciclo final de 72 °C por 30''. A eficiência da qPCR foi avaliada por curva padrão para cada gene com dez pontos de diluição, cada um com três repetições. As bandas resultantes dos alinhamento dos primers inespecíficos foram enviadas para sequenciamento.

#### 4. Resultados e discussão

A extração de RNA vegetal obteve maior sucesso com o kit RNeasy® RT em relação ao NucleoSpin RNA Plant®. Para a extração de RNA foram testados 10 e 20 mg de raízes. Para a menor massa, a quantificação de RNA não foi suficiente, sendo recomendada para a extração 20 mg, as quais resultaram em 75,25 a 89,66 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  de RNA (Figura 1). Porém, ao realizar a eletroforese, não houve indício da presença de RNA (Figura 2), assim, o material foi considerado degradado, tal quadro provavelmente foi provocado devido ao longo período de transporte e a instabilidade do RNA. Assim sendo, os estudos de expressão gênica foram impossibilitados.

O par de primers delineado para o DNA microbiano (5' CTACTGTACCACTGTTGCTTCG3' e 5' CAGAAACAGTGTTTCGTGTTGGG 3') e o EF1  $\alpha$  (5' CCTGTCCTTGATTGTCACACTTCC3' e 5' CCATTCCAGCATCACCGTTCTTC3') foram testados em ambos DNAs (microbiano e vegetal) a fim de verificar a especificidade dos primers. O primer EF1 ligou-se apenas ao DNA vegetal, no entanto, o primer microbiano ligou-se tanto ao DNA microbiano quanto ao DNA vegetal (Figura 1). Assim, o par de primers delineado para o micro-organismo foi considerado inadequado para a continuidade do estudo.

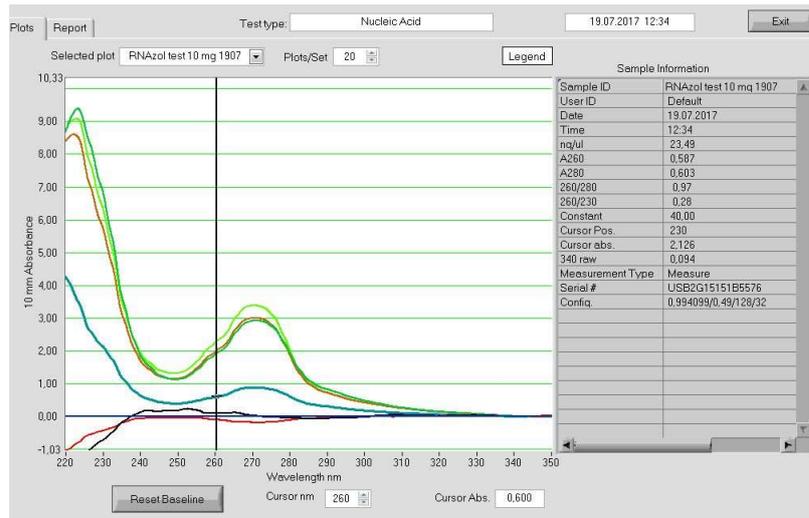


Figura 1. Extração de RNA de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (IPB2) (10 e 20 mg), utilizando o kit RNAzol® RT.

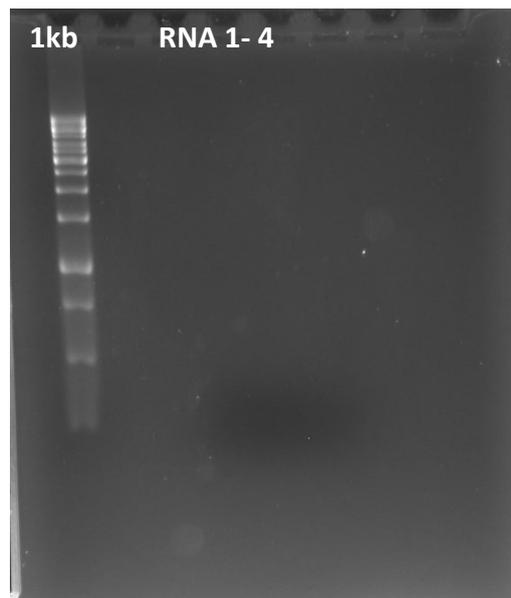


Figura 2. Corrida de quatro amostras de RNA vegetal extraído conforme às instruções do kit RNAzol® RT em gel de agarose (1,5%) com tampão MOPS (3-N-morfolino ácido propanosulfônico).



Figura 3. DNA vegetal testado com EF1 (1-1), DNA vegetal testado com o primer delineado para o micro-organismo (1-2), DNA microbiano testado com EF1 (2-1) e DNA microbiano testado com o primer delineado para o micro-organismo (2-2) nas temperaturas de anelamento de 62 e 64°C.

O par de primers da região ITS foi o único, entre os primers inespecíficos, que se ligou ao DNA microbiano (Figura 2). Assim, os produtos do qPCR foram purificados e enviados para sequenciamento. Após o sequenciamento, os pares de primers F1(CTA CTG TAC CAC TGT TGC TTC G) e R1 (CCT ACA GAG CGG GTG ACA AAG C) e F2 (CCC AAC ACG AAC ACT GTT TCT G) e R2 (CAG AAA CAG TGT TCG TGT TGG G) foram delineados e deverão ser utilizados na continuidade do estudo.

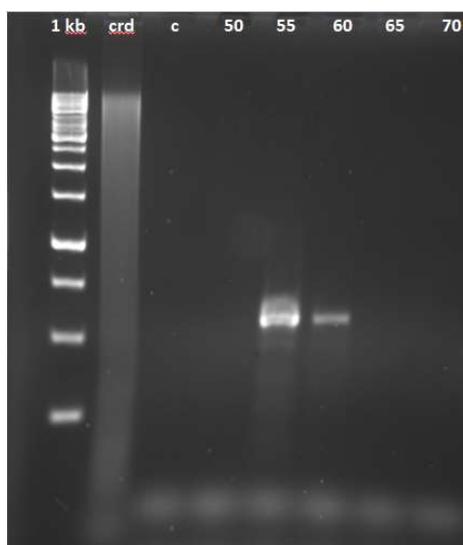


Figura 4. DNA cru (crd), controle (c) e DNA microbiano testado com os primers inespecíficos ITS1 e ITS4 com temperaturas de anelamento de 50-70°C.

## 5. Considerações finais

O estágio na TU Dresden foi de extrema importância na formação acadêmica da aluna, durante este período foi possível aprender técnicas de biologia molecular e iniciar um novo trabalho a fim de desvendar o tipo de interação exercida pelo micro-organismo descrito pela patente BR 10 2018 007927 1 com o clone IPB2. Além de estabelecer parceria com forte grupo de pesquisa na área de fisiologia e biologia molecular de plantas, aprimorar a língua inglesa e iniciar os estudos na língua alemã.

## 6. Referências bibliográficas

BOIVIN, S.; FONOUNI-FARDE, C.; FRUGIER, F. How auxin and cytokinin phytohormones modulate root microbe interactions. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1–12, 2016.

LUDWIG-MÜLLER, J. Bacteria and fungi controlling plant growth by manipulating auxin: Balance between development and defense. **Journal of Plant Physiology**, v. 172, p. 4–12, 2015.

## 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 CIENCIAS*, 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.

### **Entrevistas**

1. PRADO, D. Z.; FLEURI, L. F. Unesp Notícias | Hormônio vegetal desenvolvido em Botucatu auxilia no cultivo do eucalipto. 2018.
2. PRADO, D. Z.; FLEURI, LUCIANA F.; PEREIRA, M. S.; ZANUTTO, MIRELLA R.; DA SILVA, JOÃO VITOR INÁCIO; LOPES, P. H. Ciência Sem Limites | Valorização de resíduos. 2018.
3. PRADO, D. Z.; FLEURI, L. F. Produto propõe melhoramento na cultura de eucalipto. 2018.

### **Curso de curta duração ministrado**

1. PRADO, D.Z. Obtenção de Biomoléculas de Interesse Industrial por Fermentação em Estado Sólido. Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), 2017.

### **Patente**

1. PRADO, D. Z.; FLEURI, L. F. Produção de ácido indol-3-acético por fermentação em estado sólido. 2018, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020180079271, Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 19/04/2018

### **Organização de eventos**

1. PRADO, D. Z.; ZANUTTO, MIRELLA R.; LOPES, P. H.; DA SILVA, JOÃO VITOR INÁCIO; HELIODORO, JULIA C.A.; FLEURI, LUCIANA F. Valorização de resíduos para fins biotecnológicos, XXXII Seab - Semana de Estudos Agropecuários e Florestais de Botucatu. 2018.
2. FLEURI, L. F.; PRADO, D. Z.; DELGADO, C. H. O.; ZANUTTO, M. R.; FRANCISCO, V. B. CAPOVILLE, B. L.; PEREIRA, M. S.; NOVELLI, P. K.; PIVETTA, M. R. I Workbio - Workshop de Biotecnologia. 2015.

## Anexo I

Registro de depósito da patente BR 10 2018 007927 1



### Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2018 007927 1

#### Dados do Depositante (71)

---

Depositante 1 de 1

**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA

FILHO

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 48031918000124

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** Rua Quirino de Andrade, 215

**Cidade:** São Paulo

**Estado:** SP

**CEP:** 01049-010

**Pais:** Brasil

**Telefone:** 11 56270217

**Fax:** 11 56270103

**Email:** auin@unesp.br

---

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 19/04/2018 às 15:44, Petição 870180031902

## Dados do Pedido

---

**Natureza Patente:** 10 - Patente de Invenção (PI)

**Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):** PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

**Resumo:** A presente patente de invenção descreve um processo de obtenção de ácido indol-3-acético (AIA) através de fermentação em estado sólido (FES), utilizando o fungo *Aspergillus flavipes*, obtendo um preparado em estado sólido (PES) e um extrato fonte de biomoléculas proveniente desta interação, utilizados como fonte de AIA para auxiliar o crescimento de plantas ou atuar como herbicida, em substituição ao 2,4-D e outros herbicidas auxínicos.

**Figura a publicar:** 1

## Dados do Procurador

---

### Procurador:

**Nome ou Razão Social:** Sérgio Victor Mastrorocco

**Numero OAB:** 296946SP

**Numero API:** 1705

**CPF/CNPJ:** 02990560823

**Endereço:** Rua Amaral Gama, 333 - Conjunto 164 - Santana

**Cidade:** São Paulo

**Estado:** SP

**CEP:** 02018-001

**Telefone:** (11) 2639-7200

**Fax:** (11) 2973-5032

**Email:** sergio@mastrorocco.com.br

---

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 19/04/2018 às 15:44, Petição 870180031902