



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS DE CERRO LARGO
CURSO DE AGRONOMIA**

RODRIGO FERRAZ RAMOS

**BIOPROSPECÇÃO FUNCIONAL DE RIZOBACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS DO
MORANGUEIRO (*Fragaria X ananassa* Duch.)**

CERRO LARGO

2017

RODRIGO FERRAZ RAMOS

**BIOPROSPECÇÃO FUNCIONAL DE RIZOBACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS DO
MORANGUEIRO (*Fragaria X ananassa* Duch.)**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado como requisito para obtenção de grau de
Bacharel em Agronomia da Universidade Federal da
Fronteira Sul.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Joner Daroit
Coorientadora: Profa. Dra. Juliane Ludwig

CERRO LARGO

2017

PROGRAD/DBIB - Divisão de Bibliotecas

Ramos, Rodrigo Ferraz
BIOPROSPECÇÃO FUNCIONAL DE RIZOBACTÉRIAS
HETEROTRÓFICAS DO MORANGUEIRO (Fragaria X ananassa
Duch.)/ Rodrigo Ferraz Ramos. -- 2017.
62 f.:il.

Orientador: Daniel Joner Daroit.
Co-orientador: Juliane Ludwig.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Agronomia , Cerro Largo, RS, 2017.

1. Morangueiro. 2. Rizosfera. 3. Bactéria. 4.
Potencial hidrolítico. 5. Solubilização de fosfatos. I.
Daroit, Daniel Joner, orient. II. Ludwig, Juliane,
co-orient. III. Universidade Federal da Fronteira Sul.
IV. Título.

RODRIGO FERRAZ RAMOS

**BIOPROSPECÇÃO FUNCIONAL DE RIZOBACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS DO
MORANGUEIRO (*Fragaria X ananassa* Duch.)**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Agronomia da Universidade Federal da Fronteira Sul.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Joner Daroit

Coorientadora: Profa. Dra. Juliane Ludwig

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em

29 / 11 / 2017

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Daniel Joner Daroit


Prof. Dr. Douglas Rodrigo Kaiser


Esp. Caroline Badzinski

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, especialmente a minha mãe, Leonida Ferraz da Silva, pela paciência, compreensão, apoio e incentivo prestados.

Ao orientador, Dr. Daniel Joner Daroit, pela dedicação, confiança, incentivo prestados durante a graduação e a realização deste e demais trabalhos. Ainda, por ser um orientador zeloso e uma inspiração para aqueles que desejam seguir os caminhos da ciência, da vida acadêmica e da excelência profissional.

A co-orientadora, Dra. Juliane Ludwig, pela amizade, atenção e incentivo dedicados à minha pessoa.

A colega e amiga Lisiane Sobucki, pelo auxílio na execução e condução das atividades de pesquisa e de cunho intelectual durante a graduação, bem como, pela amizade e confiança.

A Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), por ser uma entidade pública, popular e gratuita, que possibilitou-me obter uma educação emancipatória e uma formação profissional de qualidade.

Enfim, agradeço com sinceridade a todos aqueles, que de uma forma ou outra, auxiliaram-me durante a graduação e na concretização desse trabalho.

Parece inevitável que complexos inteiramente novos de bactérias esperem ser descobertos no chão do fundo do mar, nas bainhas de orquídeas das florestas pluviais, em meio à espuma de algas de lagos e montanhas e em milhares de locais de todo o mundo em que não costumamos nem reparar (WILSON, 2012, p. 182)

RESUMO

O solo apresenta elevada biodiversidade e a rizosfera é reconhecida como uma zona de intensa atividade microbiana e enzimática, apresentando uma complexa diversidade estrutural e funcional. As transformações bioquímicas no sistema solo-planta são altamente dependentes ou relacionadas à presença de microrganismos e suas enzimas. Ainda, na rizosfera podem atuar microrganismos solubilizadores de fosfato, capazes de disponibilizar fósforo no solo passível de absorção pelas plantas. Este estudo objetivou avaliar, em meios de cultura sólidos, os potenciais hidrolítico e de solubilização de fosfato de rizobactérias isoladas da cultura do morangueiro (*Fragaria X ananassa* Duch.). O solo rizosférico apresentou uma contagem bacteriana de $2,75 \pm 0,7 \times 10^7$ UFC g⁻¹ solo seco (n = 3), apresentando diferença significativa em relação solo não-rizosférico, que atingiu $1,99 \pm 0,9 \times 10^7$ UFC g⁻¹ solo seco (n = 3). No total, 30 rizobactérias foram isoladas em culturas puras, sendo que 60,0% (18) apresentaram morfologia de coco e 40,0% (12) morfologia de bastonete. Em relação à coloração de Gram, 86,7% (26) dos isolados foram classificados como Gram-positivos e 13,3% (4) como Gram-negativos. Dos 30 isolados bacterianos avaliados quando ao potencial proteolítico e celulolítico, 56,7% (17) e 33,3% (10) apresentaram capacidade de produção de proteases e celulases, respectivamente. Ao longo de sucessivos repiques, alguns isolados não apresentam mais crescimento, impossibilitando a realização dos testes subsequentes. Dos 26 isolados bacterianos avaliados quanto ao potencial amilolítico, 19,2% (5) apresentaram a capacidade de produção de amilases. Dos 24 isolados bacterianos avaliados quanto ao potencial lipolítico e de solubilização de fosfato inorgânico, 100,0% apresentaram capacidade de produção de lipases e 16,7% (4) produziram halo de solubilização. Dos 24 isolados bacterianos avaliados para as cinco atividades, todos apresentaram ao menos uma atividade, onde 29,2% (7) dos isolados demonstraram somente uma das cinco atividades avaliadas. Ainda, 37,5% (9) apresentaram duas atividades, com a combinação protease + lipase (66,7%) sendo a mais frequentemente observada; 20,8% (5) apresentam três atividades combinadas e 12,5% (3) apresentaram quatro das cinco atividades investigadas, onde a combinação protease + celulase + amilase + lipase representou 100,0%. Nenhum isolado bacteriano no presente estudo apresentou a combinação das cinco atividades avaliadas. Os resultados obtidos indicam a potencial versatilidade funcional dos isolados bacterianos, que podem ser importantes nas perspectivas agrônômica, ecológica e biotecnológica.

Palavras-Chave: Microbiota do solo. Diversidade funcional. Enzimas. Potencial hidrolítico. Solubilização de fosfato.

ABSTRACT

Soil presents a high biodiversity, and the rhizosphere is acknowledged as a zone of intense microbial and enzymatic activities, presenting a complex structural and functional diversity. Biochemical transformations on the soil-plant system are highly dependent or related to the presence of microorganisms and their enzymes. Also, phosphate-solubilizing microorganisms might act in the rhizosphere, providing phosphorus (P) to the soil that might be absorbed by plants. This study aimed to evaluate, in solid culture media, the hydrolytic and phosphate-solubilizing potentials of rhizobacteria isolated from strawberry crop (*Fragaria X ananassa* Duch.). Rhizospheric soil presented bacterial counts of $2.75 \pm 0.7 \times 10^7$ CFU g⁻¹ dry soil (n = 3), which was significantly different from that of non-rhizospheric soil, which reached $1.99 \pm 0.9 \times 10^7$ CFU g⁻¹ dry soil (n = 3). In total, 30 rhizobacteria were isolated in pure cultures, with 60.0% (18) being cocci and 40.0% (12) being bacilli. As for Gram staining, 86.7% (26) of the isolates were classified as Gram-positive, and 13.3% (4) classified as Gram-negative. From the 30 bacterial isolates evaluated for proteolytic and cellulolytic potentials, 56.7% (17) and 33.3% (10) presented the capacity of producing proteases and cellulases, respectively. Through successive plating, some isolates no longer grew, making it impossible to carry out subsequent tests. From 26 isolates evaluated for amylolytic potential, 19.2% (5) demonstrated the ability to produce amylases. Considering the 24 isolates assessed for lipolytic potential and solubilization of inorganic phosphate, 100.0% presented the capacity to produce lipases and 16.7% (4) produced solubilization haloes. As for the 24 bacterial isolates assessed for the five activities, all presented at least one of the activities, and 29.2% (7) demonstrated a single activity. In addition, 37.5% (9) presented two of the evaluated activities, with the combination protease + lipase (66.7%) being the most frequently observed; 20.8% (5) displayed three combined activities and 12.5% (3) presented four out of five activities investigated, being the combination protease + cellulase + amylase + lipase representing 100.0%. None of the bacterial isolates in the present study displayed the five evaluated activities. Obtained results indicate the potential functional versatility of the bacterial isolates, which may be important from agronomic, ecological and biotechnological perspectives.

Keywords: Soil microbiota. Functional diversity. Enzymes. Hydrolytic potential. Phosphate solubilization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Planta adulta do morangueiro.....	15
Figura 2. Microrganismos e sua distribuição nos Domínios Archaea, Bacteria e Eucarya.....	20
Figura 3. Técnicas tradicionais para o estudo da diversidade/dinâmica dos microrganismos do solo	25
Figura 4. Diâmetro médio de halo de hidrólise (DMH) e diâmetro médio de colônia (DMC) de 17 isolados bacterianos proteolíticos.....	33
Figura 5. Índice Enzimático (IE) para 17 isolados bacterianos proteolíticos.....	34
Figura 6. Diâmetro médio de halo de hidrólise (DMH) e diâmetro médio de colônia (DMC) de 10 isolados bacterianos cultivados em Ágar CMC (pH 7,0) a 30 °C por 96 h.....	35
Figura 7. Índice Enzimático (IE) para 10 isolados bacterianos celulolíticos	36
Figura 8. Diâmetro médio de halo de hidrólise (DMH) e diâmetro médio de colônia (DMC) de cinco isolados bacterianos amilolíticos	38
Figura 9. Índice Enzimático (IE) para cinco isolados bacterianos amilolíticos	39
Figura 10. Diâmetro médio da colônia (DMC) e diâmetro médio do halo de solubilização (DMS) de quatro isolados bacterianos solubilizadores de fosfato inorgânico	42
Figura 11. Índice de Solubilização (IS) para quatro isolados bacterianos solubilizadores de fosfato inorgânico	43
Figura 12. Síntese da bioprospecção funcional realizada para as rizobactérias isoladas do morangueiro.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Morfologia e coloração de Gram de rizobactérias do morangueiro.	31
Tabela 2. Diâmetro médio de halo de hidrólise (DMH), diâmetro médio de colônia (DMC) e índice enzimático (IE) de 24 isolados bacterianos lipolíticos.	40
Tabela 3. Atividades hidrolíticas e de solubilização de fosfato inorgânico detectadas para 24 rizobactérias do morangueiro.	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AL – Ágar Leite

CMC - Carboximetil Celulose

DMC – Diâmetro médio da colônia

DMH – Diâmetro médio do halo de hidrólise

IE – Índice Enzimático

IS – Índice de Solubilização

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

PCA – Ágar Padrão Contagem

PI – Produção Integrada

SCP – Sistema Convencional de Produção

SOP – Sistema Orgânico de Produção

TBA – Ágar Tributirina

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
1.1.	OBJETIVOS.....	13
1.1.1	Objetivo geral.....	13
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	MORFOLOGIA, DESCRIÇÃO BOTÂNICA E ASPECTOS GERAIS DO MORANGUEIRO	15
2.1.1	Aspectos econômicos.....	16
2.1.2	Sistemas de produção	17
2.2	DIVERSIDADE MICROBIANA E SUAS FUNÇÕES NO SOLO	19
2.2.1	Microrganismos e enzimas microbianas.....	21
2.2.2	Solubilização de fosfatos.....	23
2.3	PROSPECÇÃO FUNCIONAL E BIOTECNOLOGIA	24
3	MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1	COLETA DE SOLO RIZOSFÉRICO E MANIPULAÇÃO DAS AMOSTRAS	26
3.2	CONTAGEM E ISOLAMENTO DE RIZOBACTÉRIAS	26
3.3	MORFOLOGIA CELULAR E COLORAÇÃO DE GRAM	27
3.4	DETECÇÃO DO POTENCIAL CELULOLÍTICO DAS RIZOBACTÉRIAS	27
3.5	DETECÇÃO DO POTENCIAL AMIOLÍTICO DAS RIZOBACTÉRIAS	28
3.6	DETECÇÃO DO POTENCIAL PROTEOLÍTICO DAS RIZOBACTÉRIAS.....	28
3.7	DETECÇÃO DO POTENCIAL LIPOLÍTICO DAS RIZOBACTÉRIAS	28
3.8	DETECÇÃO DA CAPACIDADE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO INORGÂNICO DAS RIZOBACTÉRIAS	29
3.9	ANÁLISE DOS DADOS	29

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 CONTAGEM, ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E COLORAÇÃO DE GRAM	30
4.2. AVALIAÇÃO FUNCIONAL DOS ISOLADOS DE SOLO RIZOSFÉRICO	32
4.2.1 Potencial proteolítico	32
4.2.2 Potencial celulolítico	34
4.2.3 Potencial amilolítico	37
4.2.4 Potencial lipolítico	39
4.2.5 Avaliação do potencial de solubilização de fosfato	41
4.2.6 Atividades hidrolíticas e de solubilização de fosfato combinadas.....	44
4.2.7 Potenciais aplicações biotecnológicas e industriais de enzimas hidrolíticas e microrganismos solubilizadores de fosfato inorgânico	47
5 CONCLUSÕES.....	49
REFERÊNCIAS	50

1. INTRODUÇÃO

Solos são coleções de corpos naturais, constituídos por partes sólidas, líquidas e gasosas, dinâmicos e heterogêneos, constituídos por frações minerais e orgânicas, água, ar e seres vivos (SANTOS et al., 2013). Sob o enfoque funcional agrícola, o solo constitui o ambiente natural onde se desenvolvem as plantas, atuando como elemento de suporte e de disponibilização de água e nutrientes, e determinante da produtividade do sistema produtivo em função de limitações de sua fertilidade (DENARDIN et al., 2014). Assim, na agricultura o solo é o principal recurso explorado, e sua fertilidade, historicamente, foi estudada como o resultado de parâmetros químicos. Contudo, o conceito de qualidade do solo envolve também fatores biológicos. De fato, os serviços ambientais prestados pelos solos nos (agro)ecossistemas são, em grande parte, realizados por organismos vivos. Neste sentido, a biota e a biodiversidade dos solos vêm recebendo crescente atenção por sua participação na funcionalidade e sustentabilidade dos solos (ARIAS et al., 2005; JEFFERY et al., 2010).

No solo, a microbiota desempenha diversas atividades, como a decomposição de compostos orgânicos, fixação de nitrogênio atmosférico, produção de fitohormônios, solubilização de minerais, degradação de xenobióticos, produção de substâncias antimicrobianas, entre outras (COTTA, 2016). Pelo caráter insolúvel e macromolecular da maioria dos componentes orgânicos no solo, as etapas iniciais da decomposição requerem a produção de enzimas hidrolíticas extracelulares, como celulasas, amilases, proteases e lipases (MAKOI & NDAKIDEMI, 2008; BURNS et al., 2013). A microbiota também pode afetar indiretamente a fertilidade dos solos, podendo atuar na disponibilização de fósforo (P) às plantas, através de processos de solubilização e mineralização (SHARMA et al., 2013).

O conhecimento da diversidade microbiana e o potencial enzimático e funcional da microbiota adquirem importância no contexto da qualidade do solo, visto que estão associados à estabilidade do ecossistema frente a distúrbios ambientais naturais ou antrópicos (JURBURG & SALLES, 2015), bem como o potencial solubilizador de fosfatos de microrganismos do solo pode implicar em sua utilização na disponibilização de P às plantas através de estratégias no manejo de sistemas agrícolas sustentáveis (GYANESHWAR et al., 2002).

Os microrganismos representam também uma importante fonte de recursos genéticos, com potencial aplicação biotecnológica (OLIVEIRA; SETTE; FANTINATTI-GARBOGGINI, 2006). Neste contexto, a prospecção funcional de microrganismos quanto ao seu potencial hidrolítico e solubilização de fosfato inorgânico, além de contribuir para a ampliação do

conhecimento sobre sua participação na ciclagem de nutrientes nos solos e na dinâmica e ecologia de populações no sistema solo, pode indicar futuras aplicações biotecnológicas no campo do bioprocessamento de resíduos, produção de enzimas de interesse industrial e disponibilização de P no solo. Contudo, observa-se um reduzido número de estudos sobre a diversidade e funcionalidade dos microrganismos do ambiente solo e suas relações com as plantas nos agro(ecossistemas), devido ao fato de grande parte dos estudos serem dirigidos principalmente as culturas agrícolas cultivadas em larga escala, como o milho (*Zea mays*) (PEDRINHO et al., 2010), soja (*Glicine max*) (NOGUEIRA & CARDOSO, 2002), cana-de-açúcar (LEITE et al., 2014) entre outros.

Porém, igualmente importante para a economia nacional, encontra-se o grupo das pequenas frutas, onde o morangueiro (*Fragaria X ananassa* Duch.) é uma das espécies de maior expressão econômica nesse grupo (MADAIL et al., 2007; FACHINELLO et al., 2011). Contudo, apesar de alguns trabalhos demonstrarem que na cultura do morangueiro o manejo do solo afeta indicadores microbianos (TEIXEIRA & VIEIRA, 2008), são escassos os estudos que abordam a diversidade funcional dos microrganismos ou outros indicadores microbianos na cultura do morangueiro.

Devido ao crescente reconhecimento da importância dos microrganismos no solo e suas relações ecossistêmicas com plantas cultivadas, aliado aos escassos estudos sobre biodiversidade e funcionalidade desses microrganismos em culturas de elevada importância econômica, como o grupo das pequenas frutas, o objetivo do presente trabalho foi isolar bactérias heterotróficas da rizosfera da cultura do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) conduzido em sistema de produção orgânica, e posterior biocaracterização do potencial hidrolítico e solubilizador de fosfato inorgânico.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Isolar bactérias heterotróficas da rizosfera da cultura do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) conduzido em sistema de produção orgânica visando biocaracterizar seu potencial hidrolítico e solubilizador de fosfato inorgânico.

1.1.1.1 Objetivos específicos

- Isolar rizobactérias da cultura do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) conduzido em sistema de produção orgânica;
- Comparar a contagem de bactérias heterotróficas cultiváveis entre o solo rizosférico e solo não-rizosférico.
- Avaliar o potencial de produção de proteases pelas rizobactérias;
- Avaliar o potencial de produção de celulasas pelas rizobactérias;
- Avaliar o potencial de produção de amilases pelas rizobactérias;
- Avaliar o potencial de produção de lipases pelas rizobactérias;
- Avaliar o potencial de solubilização de fosfato inorgânico pelas rizobactérias;

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MORFOLOGIA, DESCRIÇÃO BOTÂNICA E ASPECTOS GERAIS DO MORANGUEIRO

O morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch) (Figura 1) pertence à família Rosaceae, que engloba grande número de espécies de clima temperado, economicamente importantes em fruticultura (QUEIROZ-VOLTAN et al., 1996). É uma planta rasteira, composta por folhas, um caule modificado (conhecido como coroa), e sistema radicular que alcança cerca de 20 cm de profundidade (ANTUNES & HOFFMAN, 2012).

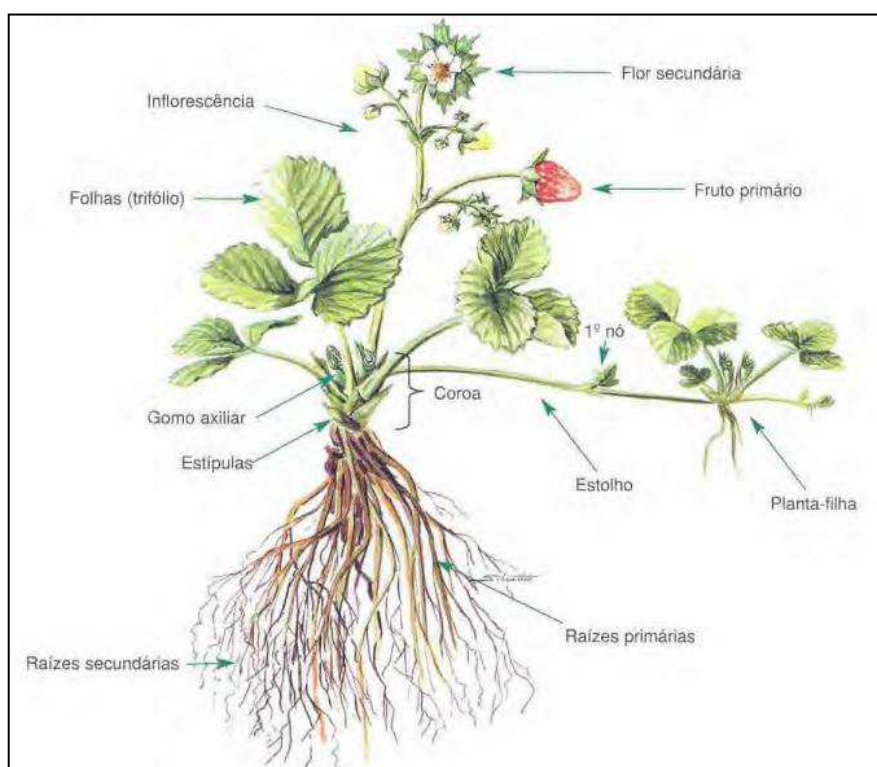


Figura 1. Planta adulta do morangueiro (Fonte: PALHA, 2005).

O caule de uma planta de morangueiro é reduzido a um rizoma curto, com um gomo terminal foliar que assegura seu prolongamento e dá origem às folhas, cada uma delas composta de três folíolos, sendo que ao agregado de rizomas curtos resultantes da ramificação do rizoma inicial dá-se o nome de coroa, sendo esse conjunto que imprime às plantas de morangueiro adultas a forma de tufo característico (CAMARGO; SCARANARI; IGUE, 1974).

Possui inflorescência terminal, com flores pentâmeras e hermafroditas, com 20 a 30 estames e de 60 a 600 pistilos, sendo que a fecundação dos óvulos é feita pelo pólen da mesma flor, de flores da mesma planta ou de flores de diferentes plantas (PALHA, 2005). Botanicamente, o morango é um receptáculo carnosos no qual estão aderidos numerosos aquênios, que são os verdadeiros frutos, onde o receptáculo é de coloração vermelho-viva, suculento e atrativo (ANTUNES & HOFFMAN, 2012). Assim, o morango é um pseudofruto, pois se origina de uma única flor com vários ovários, onde o desenvolvimento de cada ovário produz uma fruta, e cada um dos pequenos pontos escuros do morango (chamados popularmente de sementes) é cientificamente conhecido como aquênio, que, na verdade, é o verdadeiro fruto (ANTUNES; CARVALHO; SANTOS, 2011).

O morangueiro produz melhor em solos de textura argilo-arenoso, bem drenados, ricos em matéria orgânica e com adequada estrutura física, com preferência a uma faixa de pH ideal entre 5,5 e 6,0, sendo uma cultura exigente tanto em macronutrientes, como nitrogênio e fósforo, como em micronutrientes (SOUZA et al., 1977; ANTUNES & HOFFMAN, 2012).

Em relação ao fotoperíodo e temperatura, as cultivares de morangueiro são classificadas em cultivares de dia curto (DC), de dia longo (DL) e neutras (N) ou indiferentes ao fotoperíodo (ID). Nas cultivares DC a iniciação floral ocorre em fotoperíodos inferior a 14 horas ou a temperaturas inferiores a 15 °C em condições de dia longo, enquanto as cultivares DL a iniciação floral ocorrem em fotoperíodos superiores a 12 horas e as cultivares ID são bastante flexíveis, podendo iniciar a floração em qualquer altura do ano, exceto a temperaturas acima de 30 °C (PALHA, 2005).

O morangueiro possui diversas cultivares comerciais. No Brasil, o padrão varietal concentra-se em um número reduzido de cultivares, sendo predominante as cultivares ‘Oso Grande’ na região Sudeste e ‘Camarosa’, ‘Aromas’ e ‘Albion’ na região Sul (ANTUNES; CARVALHO; SANTOS, 2011), sendo ‘Oso Grande’ e ‘Camarosa’ cultivares de dia curto, e ‘Aromas’ e ‘Albion’ de dia neutro.

2.1.1 Aspectos econômicos

Economicamente, o morangueiro é uma das espécies de maior expressão econômica entre as pequenas frutas, se destacando pela sua coloração atraente e agradável sabor (ANTUNES; CARVALHO; SANTOS, 2011; MADAIL et al., 2007). No grupo das pequenas

frutas, o morangueiro é o mais representativo, encontrando-se em regiões de clima temperado e subtropical (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2005) com produção de aproximadamente 105 mil toneladas anualmente, distribuídas em quatro mil hectares no Brasil (REISSER JUNIOR et al., 2014). O interesse pelo cultivo do morango é justificado pela alta rentabilidade da cultura, o amplo conhecimento e a aceitação da fruta pelo consumidor e pela diversidade de opções de comercialização e processamento (polpa, sorvetes, geleias, compotas e sucos) (FACHINELLO et al., 2011).

No Brasil, o principal estado produtor é São Paulo (SP), seguido do Rio Grande do Sul (RS), Minas Gerais (MG) e Paraná (PR), representando 30%, 29%, 22% e 19% da produção nacional de morango, respectivamente (REISSER JUNIOR et al., 2014). No ano de 2014, foram exportados 28.913 kg de morango, representando uma receita de US\$ 218.000,00 e, em 2015, foram exportados 37.244 kg de morango, representando uma receita de US\$ 319.258,00, com 28,8% e 46,4% de aumento no volume de produção e na receita, respectivamente (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2016). No ano de 2016, ocorreu uma queda de 17,1% e 17,2% no volume e receita, respectivamente, porém, atingindo uma exportação de 30.847 kg e gerando uma receita equivalente a US\$ 264.481,00 (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2017).

2.1.2 Sistemas de produção

No Brasil, para a produção de morangos são adotados ao menos três sistemas de produção, que remetem a diferentes manejos adotados pelos agricultores: sistema convencional de produção (SCP), a produção integrada (PI) e o sistema orgânico de produção (SOP).

O SCP é um dos sistemas de produção agrícola, cujo processo de produção está baseado no emprego de adubos de síntese industrial e agrotóxicos (MARIANI & HENKES, 2015), e em geral, não obedece a regras específicas para a produção, onde o produtor que o pratica utiliza-se de insumos químicos na etapa de fertilização e nos tratamentos preventivos e curativos contra doenças e pragas, sem obedecer a regras técnicas pré-estabelecidas (MADAIL et al., 2007). Em geral, para a cultura no morangueiro, o plantio convencional implica em aração ou gradagem, incorporação de calcário, preparo de canteiros, aplicação de adubos solúveis e aplicações de pesticidas agrícola (ANTUNES; CARVALHO; SANTOS, 2011).

No Brasil, a PI é focada na adequação dos processos produtivos para obtenção de produtos de origem vegetal de qualidade, onde os níveis de resíduos de agrotóxicos e contaminantes encontram-se em conformidade com o que estabelece a legislação sanitária, apresentando também rastreabilidade da produção e com certificação pelo selo oficial “Brasil Certificado” (BRASIL, 2017b). Atualmente a Produção Integrada é válida para todas as cadeias do agronegócio, ficando a cargo dos colegiados específicos a apresentação de propostas de normas para cada cultura (BRASIL, 2017a). Assim, existe normas específicas para diversas culturas, incluindo o morangueiro, ao qual possui normas técnicas específicas para a Produção Integrada, regidas pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), via Instrução Normativa nº 14, de 03 de abril de 2008 (BRASIL, 2008) e, pela Instrução Normativa nº 24, de 04 de agosto de 2010 (BRASIL, 2010).

Outro sistema de produção em expansão no território brasileiro é o SOP. Pela legislação brasileira, considera-se produto orgânico, seja ele *in natura* ou processado, aquele que é obtido em um sistema orgânico de produção agropecuária ou oriundo de processo extrativista sustentável e não prejudicial ao ecossistema local (BRASIL, 2017c). Em território nacional, as atividades pertinentes ao desenvolvimento da agricultura orgânica foram definidas pela Lei Nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003 (BRASIL, 2003) e a sua regulamentação ocorreu através do Decreto Nº 6.323, de 27 de dezembro de 2007 (BRASIL, 2007). Assim, a produção orgânica, defende a adoção de práticas conservacionistas tradicionais de manejo do solo, como plantio em curva de nível, formação de faixas de retenção e cordões, priorizando práticas que proporcionem a manutenção e melhoria da qualidade do solo, por meio do revolvimento mínimo e do aumento dos teores de matéria orgânica e da atividade biológica no solo, priorizando fontes orgânicas de nutrientes, não usando fertilizantes químicos de alta solubilidade (ALCÂNTARA & MADEIRA, 2008).

Em relação ao morangueiro, a produção orgânica tem potencial para ser bastante competitiva, quando equiparada com o sistema de produção convencional (DONADELLI; KANO; JUNIOR, 2012), encontrando-se em expansão no território nacional, contudo, com produção principalmente em pequena escala (MADAIL et al., 2007). Prioriza-se a adoção das seguintes práticas no cultivo do morango orgânico: adubações orgânicas, como esterco bovino curtido, “húmus de minhoca”, cama de aviário curtida, adubações verdes, adubos de baixa solubilidade, produtos biológicos para os tratamentos fitossanitários; rotação de culturas, entre outras (ALCÂNTARA & MADEIRA, 2008; FALCÃO et al., 2013; SILVA JUNIOR et al., 2014).

2.2 DIVERSIDADE MICROBIANA E SUAS FUNÇÕES NO SOLO

A grande diversidade de solos gera uma série de particularidades que se refletem na constante busca por conhecimento e entendimento de seus processos (TURETTA; CASTRO; POLIDORO, 2017). Cientificamente, um maior conhecimento sobre a diversidade microbiana no solo possibilita uma melhor compreensão das funções exercidas pelas comunidades microbianas nos ambientes e o conhecimento das suas interações com outros componentes da biodiversidade (OLIVEIRA; SETTE; FANTINATTI-GARBOGGINI, 2006). Atualmente a classificação filogenética dos microrganismos está dividida em diferentes grupos dentro de três grandes domínios (Fig. 2).

O solo é uma das principais fontes de diversidade microbiana na natureza (SILVA et al., 2015a), sendo os microrganismos os principais responsáveis pelas reações bioquímicas relacionadas não só com a transformação da matéria orgânica, mas também com o intemperismo das rochas, participando assim na gênese do solo e atuando como reguladores de nutrientes, pela decomposição da matéria orgânica e ciclagem dos elementos, operando como fonte e dreno de nutrientes para o crescimento de vegetais (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006; ANDREOLA & FERNANDES, 2007).

A decomposição de materiais orgânicos no solo, realizada por microrganismos, resulta na liberação de nutrientes, que ficam disponíveis para absorção pelas plantas. Assim, a microbiota influencia direta e indiretamente a fertilidade do solo. Os fluxos de energia e ciclo do carbono, nitrogênio, entre outros nutrientes, através do sistema decompositor do solo são dominados pelos microrganismos. A despolimerização do material orgânico, seguida pela mineralização dos produtos lábeis pela microbiota cria a base trófica das teias alimentares associadas aos detritos orgânicos no solo, dirige os ciclos globais do carbono e nutrientes, e intermedia a produção vegetal e composição atmosférica (BURNS et al., 2013). Assim, no solo, o conjunto de componentes orgânicos oriundo de plantas, animais e microrganismos são constituídos por estruturas diversas e complexas, onde a decomposição e reciclagem destes compostos no solo usualmente necessitam da atuação combinada de diferentes mecanismos e microrganismos (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

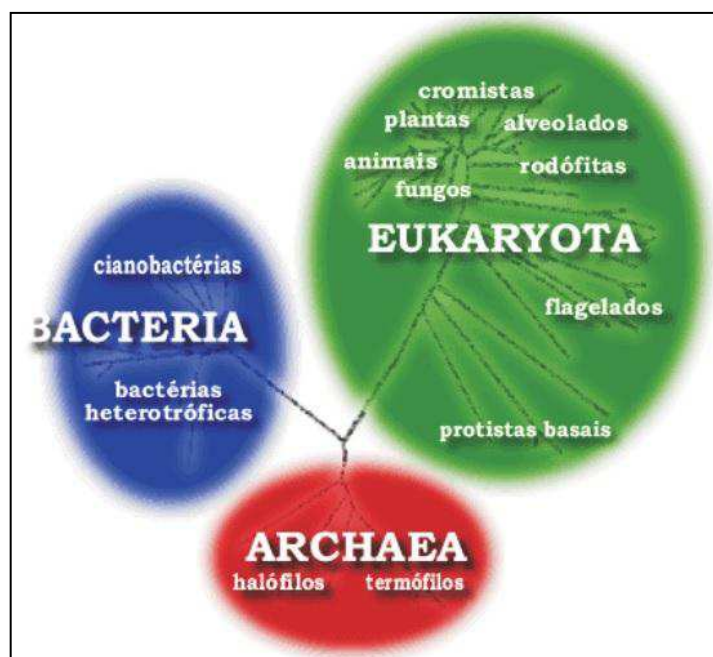


Figura 2. Microrganismos e sua distribuição nos Domínios Archaea, Bacteria e Eucarya (Fonte: MANFIO, 2002).

As relações ecológicas estabelecidas pelos microrganismos são importantes tanto na manutenção da qualidade e diversidade biológica dos solos, como na sanidade e nutrição das plantas nos (agro)ecossistemas (BERENDSEN et al., 2012; BALOTA, 2017). Assim, um nicho ecológico com ampla biodiversidade de microrganismos e atividades bioquímicas é a rizosfera das plantas. A rizosfera é o ambiente formado pelo solo que sofre influência de raízes, sendo reconhecida como uma zona de elevada atividade microbiana e enzimática em comparação com solos sem estas influências (BANDICK & DICK, 1999; MANHÃES & FRANCELINO, 2013; ROMAGNOLI & ANDREOTE, 2016). O aumento significativo no número e diversidade de bactérias no solo rizosférico é consequência do denominado efeito rizosférico, caracterizado pela estimulação da atividade da comunidade microbiana devido à liberação, pelas raízes, de exsudatos, mucilagens, secreções e lisados celulares contendo açúcares, aminoácidos, vitaminas, ácidos orgânicos, entre outros (CARDOSO & NOGUEIRA, 2007; CORDEIRO; CORÁ; NAHAS, 2012).

Apesar da compreensão da importância da microbiota nos processos biológicos no solo, observa-se ainda um reduzido número de estudos sobre a diversidade e funcionalidade dos microrganismos do ambiente solo e suas relações com as plantas nos agro(ecossistemas),

devido tanto a sua diversidade e complexidade, como pela heterogeneidade dos solos, bem como devido aos diferentes manejos do solo nas culturas agrícolas.

Considerando o fato de o solo ser uma das principais fontes de diversidade microbiana, a prospecção funcional é uma ferramenta essencial para a compreensão das funções e interações ecológicas exercidas pelos microrganismos nos (agro)ecossistemas, além contribuir para a pesquisa e desenvolvimento biotecnológico com potencial aplicação em diversos setores comerciais e industriais. Assim, observa-se que pesquisas com estas abordagens vêm crescendo mundialmente e, o Brasil ocupa importante posição com relação a publicações na área da bioprospecção (LIMA; VELHO; FARIA, 2007; MARQUES et al., 2013).

2.2.1 Microrganismos e enzimas microbianas

As transformações bioquímicas no sistema solo-planta são dependentes ou relacionadas à presença de microrganismos e suas enzimas (BRANDANI & SANTOS, 2016), como celulases, proteases, amilases e lipases, sendo a maioria de origem microbiana (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006; CENCIANI et al., 2011). Portanto, as enzimas são parte integral da ciclagem de nutrientes nos solos, sendo consideradas indicadores potenciais da qualidade do solo devido à sua relação com a biologia do solo, facilidade de medição e resposta rápida às mudanças no manejo do solo (DORAN, 1980; BANDICK & DICK, 1999).

O material celulósico ou a lignocelulose é um termo genérico para descrever os constituintes principais da biomassa vegetal, composta por celulose, hemicelulose e lignina (OGEDA & PETRI, 2010). A celulose é um biopolímero linear de moléculas de glicose associadas por ligações β -1,4 glicosídicas, constituinte da parede celular de plantas, sendo o componente mais abundante da biomassa vegetal na Terra (OGEDA & PETRI, 2010; BEHERA et al., 2017). As celulases constituem um grupo de enzimas que catalisam a clivagem das ligações nas moléculas de celulose, sendo sintetizadas por diversos microrganismos (LYND et al., 2002; MAKI; LEUNG; QIN, 2009). Assim, entre os microrganismos responsáveis pela degradação de celulose no solo, encontram-se, por exemplo, bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Chromobacterium*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Streptomyces*, *Cytophaga*, *Vibrio*, *Polyangium*, *Cellulomonas*, *Streptomyces* e *Nocardia* (SIQUEIRA et al., 1994; KUHAD; GUPTA; SINGH, 2011).

O amido é o principal componente de reserva das plantas. Estruturalmente, o amido é um homopolissacarídeo composto por cadeias de amilose, formada por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas α -1,4, originando cadeias lineares; e amilopectina, formada por unidades de glicose unidas em α -1,6 formando uma estrutura ramificada (DENARDIN & SILVA, 2009). A clivagem das ligações glicosídicas nas moléculas de amido é desencadeada pelas enzimas amilases, liberando dextrinas e pequenos polímeros compostos por unidades de glicose (GUPTA et al., 2003a; SUNDARRAM & MURTHY, 2014). Bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Chromohalobacter*, *Caldimonas*, *Halomonas*, *Rhodothermu*, *Nocardiopsis* e *Lactobacillus*, bem como fungos e leveduras dos gêneros *Thermomyces*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Penicillium* e *Saccharomyces* são microrganismos produtores de amilases (SOUZA & MAGALHÃES, 2010).

Enzimas amilolíticas e celulolíticas, atuam na degradação de resíduos e biomassa vegetais. Logo, a atividade destas enzimas e de seus microrganismos produtores está diretamente associada à ciclagem do carbono nos solos (GUNDI et al., 2007; SHAN et al., 2008; CORDEIRO; CORÁ; NAHAS, 2012).

As proteases, também conhecidas como enzimas proteolíticas, são enzimas que catalisam a quebra de proteínas por hidrólise de ligações peptídicas (TURK, 2006). Podem ser divididas em exopeptidases, que catalisam a hidrólise do aminoácido terminal das cadeias polipeptídicas e, endopeptidases, que catalisam a hidrólise das ligações peptídicas internas (KASANA; SALWAN; YADAV, 2011). No solo participam da proteólise, sendo um processo importante relacionado à ciclagem de nitrogênio nos ecossistemas (VRANOVA; REJSEK; FORMANEK, 2013). Logo, após a proteólise pode ocorrer a desaminação de aminoácidos, disponibilizando NH_4^+ no solo, que pode então ser oxidado por bactérias nitrificantes, resultando em nitrato, que é a principal forma de nitrogênio absorvida pelos vegetais (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Diversos microrganismos são responsáveis pela produção de proteases no solo, como bactérias do gênero *Bacillus* e *Pseudomonas*, além de fungos como *Pythium* sp., *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Trychophyton* sp., incluindo colonizadores de raízes (VRANOVA; REJSEK; FORMANEK, 2013).

Lipases e esterases são hidrolases capazes de catalisar a clivagem e formação de ligações éster. As lipases são enzimas hidrolíticas que atuam, em condições aquosas, nas ligações éster carboxílicas presentes em triglicerídeos para liberar ácidos graxos e glicerol, onde os substratos naturais das lipases são triglicerídeos compostos por ácidos graxos de cadeia longa (usualmente

maiores que 10 carbonos), que têm solubilidade muito baixa em água, e a reação é catalisada na interface óleo-água (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004; HASAN; SHAH; HAMMED, 2009). As esterases hidrolisam substratos de menor hidrofobicidade e triglicerídeos com ácidos graxos de cadeia usualmente menor que seis carbonos (LOPES et al., 2011).

Enzimas lipolíticas estão entre as enzimas que apresentam envolvimento com as transformações e decomposição de materiais orgânicos nos solos (BURNS & DICK, 2002; NANNIPIERI et al., 2003) e diversos microrganismos são responsáveis pela produção de lipases no solo, como por exemplo bactérias dos gêneros *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia* e *Staphylococcus* ou fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Colletotrichum* e *Geotrichum* (TREICHEL et al., 2010).

2.2.2 Solubilização de fosfatos

O fósforo (P) é o segundo nutriente mais limitante ao crescimento vegetal e, com isso, da produtividade agrícola (EPSTEIN & BLOOM, 2006). Em relação aos demais macronutrientes no solo o fósforo apresenta menor disponibilidade para absorção pelos vegetais (KHAN; ZAIDI; WANI, 2007; ZAIDI et al., 2009). No solo, microrganismos podem atuar na disponibilização de fósforo, através da capacidade de solubilizar fosfatos naturais, existentes ou adicionados solo, e os compostos de baixa solubilidade formados após a adição de fosfatos solúveis (ALVES; MENDOZA; SILVA FILHO, 2002). O principal mecanismo de solubilização de fosfato inorgânico insolúvel é a produção de ácidos orgânicos, enquanto que as fosfatases ácidas desempenham um papel importante na mineralização do fósforo complexado na matéria orgânica no solo (RODRÍGUEZ & FRAGA, 1999; KHAN; ZAIDI; WANI, 2007).

Bactérias solubilizadoras de formas insolúveis de P inorgânico vêm sendo encontradas em diferentes nichos nos solos, sendo grande parte isolada a partir de ambientes rizosféricos (GYANESHWAR et al., 2002; SHARMA et al., 2013), onde alguns estudos apontam para possibilidade de manejo das populações de microrganismos solubilizadores desses fosfatos no solo ou a aplicação de bactérias solubilizantes de fosfato inorgânico insolúvel como inoculantes na agricultura, aumentando assim a absorção de P pelas culturas (RODRÍGUEZ & FRAGA, 1999; ZAIDI et al., 2009; BALOTA, 2017). No solo, diversas bactérias foram reportadas com a capacidade de solubilização de fosfato inorgânico insolúvel no solo, como bactérias do gênero

Bacillus, *Burkholderia*, *Citrobacter* *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Xanthobacter* (RODRÍGUEZ & FRAGA, 1999; SHARMA et al., 2013).

2.3 PROSPECÇÃO FUNCIONAL E BIOTECNOLOGIA

As enzimas são proteínas altamente especializadas na catálise de reações em sistemas biológicos, possuindo alto grau de especificidade por seus substratos e acelerando reações químicas (NELSON & COX, 2005). Estes biocatalisadores são comumente usados em diversas aplicações industriais, visto que a demanda por enzimas mais estáveis, específicas e altamente ativas está crescendo rapidamente (BHAT, 2000), sendo que a maior parte do mercado de enzimas industriais é ocupada por enzimas hidrolíticas, tais como proteases, amilases, celulasas e lipases (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004). O uso de enzimas pela indústria deve-se ao fato delas serem bastante ativas e versáteis, não requerem altas temperaturas e valores extremos de pH e executam uma variedade de transformações de modo seletivo e rápido em condições brandas de reação, o que torna altamente desejável o seu uso como catalisadores (ORLANDELLI, et al., 2012).

Em 1983, May e Padgett anunciaram que a variedade de transformações químicas catalisadas por enzimas fazem destes catalisadores um alvo principal para a exploração pelas indústrias biotecnológicas emergentes (MAY & PADGETTE, 1983). Diversos processos industriais utilizam enzimas como biocatalisadores e, desta forma, a busca por microrganismos que possam produzir essas enzimas é constante (MONTEIRO & SILVA; 2009).

Nesse contexto, o conhecimento da biodiversidade e bioprospecção de novos microrganismos tornaram-se um dos focos principais da era biotecnológica, visto que a utilização destes organismos na busca de soluções nas áreas de alimento, saúde, meio ambiente e indústria vêm crescendo de forma acelerada no atual cenário mundial (OLIVEIRA; SETTE; FANTINATTI-GARBOGGINI, 2006). Tradicionalmente, as técnicas estrategicamente adotadas envolvem a coleta e isolamento de espécimes, na observação do sistema e experimentação em laboratório (BULL; WARD; GOODFELLOW, 2000). Portanto, os métodos utilizados nos estudos em microbiologia do solo, são, em sua maioria, dependentes do cultivo de microrganismos em laboratório (SILVA et al., 2015a) (Fig. 3).

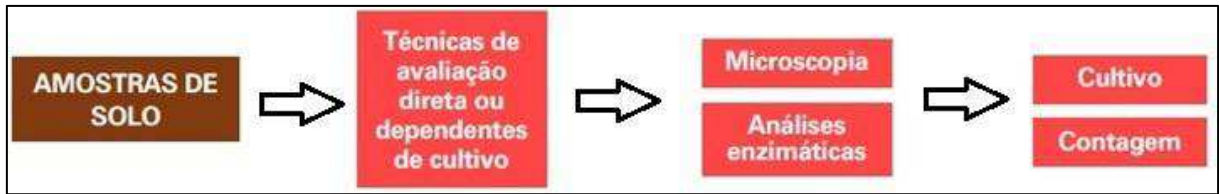


Figura 3. Técnicas tradicionais para o estudo da diversidade/dinâmica dos microrganismos do solo (Adaptado de SILVA et al., 2015a).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA DE SOLO RIZOSFÉRICO E MANIPULAÇÃO DAS AMOSTRAS

A coleta de amostras de solo de ambiente rizosférico de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch) cv. Camarosa (cultivar de fotoperíodo curto) foi realizada em propriedade com certificação para sistema de produção orgânica na Linha Santa Bárbara, município de Cerro Largo, região Noroeste do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Para as amostras de solo rizosférico, as plantas (n = 10) foram cuidadosamente removidas com as raízes intactas e o solo frouxamente aderido às raízes foi removido por agitação manual (TURNBULL; LIU; LAZAROVITS, 2012). Considerando-se como solo de ambiente rizosférico o solo firmemente aderido as raízes. Através do auxílio de espátulas estéreis, o solo do ambiente rizosférico foi coletado, acondicionado em frascos de vidro estéreis, e encaminhado ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) campus Cerro Largo/RS, para processamento das amostras.

Uma amostra composta e homogeneizada (10 g) de solo foi adicionada, assepticamente, em um Erlenmeyer contendo 90 mL de solução salina (0,85% NaCl, m v⁻¹) estéril. O Erlenmeyer foi submetido à agitação orbital (200 rpm) por 20 min em temperatura ambiente. Após a agitação, seguiu-se as diluições decimais em série, realizadas em solução salina estéril. Foram inoculados 100 µL de cada diluição por espalhamento, em triplicata para cada diluição, em placas de Petri contendo Ágar Padrão Contagem (PCA). Seguiu-se a incubação das placas inoculadas a 30 °C por 72 h.

Com o intuito de realizar a comparação entre contagens de bactérias heterotróficas cultiváveis, realizou-se simultaneamente a coleta e avaliação de solo rizosférico e não-rizosférico nos canteiros com cultivo de morangueiros. O solo não-rizosférico foi coletado a uma profundidade de 0 a 5 cm em dez pontos aleatórios nos canteiros, adotando-se posteriormente a mesma metodologia empregada para o solo rizosférico.

Para determinação da umidade do solo, parte das amostras de solo foi alocada em estufa para secagem a 105 °C, até atingir massa constante.

3.2 CONTAGEM E ISOLAMENTO DE RIZOBACTÉRIAS

Após a incubação (30 °C por 72 h) das placas inoculadas, aquelas contendo de 20 a 200 colônias foram utilizadas para contagem de bactérias cultiváveis. Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônia por grama de solo seco (UFC g⁻¹ solo seco). Somente para as placas inoculadas com solo rizosférico realizou-se a avaliação da morfologia das colônias bacterianas e posterior isolamento, descartando-se as placas inoculadas com solo não-rizosférico. Assim, para o solo rizosférico realizou-se a avaliação da morfologia das colônias bacterianas em todas as placas com diferentes diluições, onde as colônias com aspecto morfológico visualmente distinto foram selecionadas para isolamento em culturas puras através da técnica de esgotamento em placas de PCA. Os isolados bacterianos foram mantidos a 4 °C em PCA, e semeadas em novas placas a cada 45 dias.

3.3 MORFOLOGIA CELULAR E COLORAÇÃO DE GRAM

Realizou-se a confecção de esfregaços em lâminas para microscopia com as bactérias isoladas, submetendo-as ao protocolo de coloração de Gram (FREITAS & PICOLI, 2007). Avaliou-se o perfil tintorial após coloração de Gram e a morfologia celular bacteriana, utilizando microscópio óptico de campo claro, com aumento total de 1.000 vezes.

3.4 DETECÇÃO DO POTENCIAL CELULOLÍTICO DAS RIZOBACTÉRIAS

Cultivos em placas de Ágar Carboximetil Celulose (Ágar CMC) foram realizadas para a detecção da capacidade de produção de celulases pelos isolados bacterianos. O Ágar CMC foi composto por CMC (5,0 g L⁻¹), NaNO₃ (2,0 g L⁻¹), K₂HPO₄ (1,0 g L⁻¹), KCl (0,5 g L⁻¹), MgSO₄ (0,5 g L⁻¹), peptona (0,5 g L⁻¹) e ágar (15,0 g L⁻¹). Os meios foram inoculados através de picadas com os respectivos isolados bacterianos, seguindo-se de incubação a 30 °C por 96 h. Após esse período, foram adicionadas nas placas uma solução de lugol de Gram (iodeto de potássio e iodo metálico), seguindo-se de incubação por 3-5 min. As placas foram visualizadas quanto à presença de halos transparentes visíveis ao redor das colônias bacterianas, indicando a produção e atuação de celulases (KASANA et al., 2008). Estes experimentos foram realizados em triplicata (n = 3).

3.5 DETECÇÃO DO POTENCIAL AMIOLÍTICO DAS RIZOBACTÉRIAS

Cultivos em placas contendo meio de cultura Ágar Amido foram realizadas para a detecção da capacidade de produção de amilases pelos isolados bacterianos. O Ágar Amido foi composto por amido solúvel (10 g L^{-1}), extrato de levedura (2 g L^{-1}), peptona (5 g L^{-1}), MgSO_4 ($0,5 \text{ g L}^{-1}$), NaCl ($0,5 \text{ g L}^{-1}$), CaCl_2 ($0,15 \text{ g L}^{-1}$) e ágar (20 g L^{-1}) (SANTOS & MARTINS, 2003). Os isolados bacterianos foram inoculados através de picadas nas placas e, após incubação a 25°C por 96 h, adicionou-se solução de lugol de Gram nas placas por 3-5 min. A presença de halos transparentes visíveis ao redor das colônias bacterianas indicou a produção de amilases pelos isolados no meio de cultura sólido. Estes experimentos foram realizados em triplicata ($n = 3$).

3.6 DETECÇÃO DO POTENCIAL PROTEOLÍTICO DAS RIZOBACTÉRIAS

Cultivos em placas contendo meio de cultura Ágar Leite (AL) foram realizadas para a detecção da capacidade de produção de proteases pelos isolados bacterianos. O AL foi composto por peptona ($5,0 \text{ g L}^{-1}$), extrato de levedura ($3,0 \text{ g L}^{-1}$), leite UHT desnatado (10%, v v⁻¹) e ágar ($15,0 \text{ g L}^{-1}$). Os isolados bacterianos foram inoculados através de picadas nestas placas e, após incubação a 30°C por 72 h, as placas foram visualizadas quanto à presença de halos transparentes ao redor das colônias bacterianas, que indicam a produção de proteases (RIFFEL & BRANDELLI, 2006). Estes experimentos foram realizados em triplicata ($n = 3$).

3.7 DETECÇÃO DO POTENCIAL LIPOLÍTICO DAS RIZOBACTÉRIAS

A capacidade de produção de esterases/lipases foi investigada através de cultivos em Ágar Tributirina (TBA), composto por peptona (5 g L^{-1}), extrato de levedura (3 g L^{-1}), tributirina (10 mL L^{-1}) e ágar (15 g L^{-1}) (ERTUGRUL et al., 2007). Os isolados foram inoculados em picada nestas placas e, após incubação a 30°C por 48 h, as placas foram visualizadas quanto à presença de halos transparentes ao redor das colônias bacterianas, que indicam a produção de esterases/lipases. Os isolados bacterianos que apresentaram atividade positiva em Ágar

Tributirina foram classificados como lipolíticos (OLIVEIRA et al., 2017). Estes experimentos foram realizados em triplicata ($n = 3$).

3.8 DETECÇÃO DA CAPACIDADE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO INORGÂNICO DAS RIZOBACTÉRIAS

Os isolados bacterianos foram inoculados por picadas em placas com meio de cultura sólido contendo glicose (10 g L^{-1}), extrato de levedura ($0,5 \text{ g L}^{-1}$), $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (fosfato tricálcico, 4 g L^{-1}) e ágar (15 g L^{-1}) (SOUCHIE e ABBoud, 2007). Após a inoculação, seguiu-se a incubação a 30°C por 10 dias. Após esse período, as placas foram visualizadas quanto à presença de halos transparentes ao redor das colônias bacterianas, indicativos da capacidade de solubilizar fosfato. Estes experimentos foram realizados em triplicata ($n = 3$).

3.9 ANÁLISE DOS DADOS

A atividade enzimática dos isolados bacterianos foi estimada semiquantitativamente, sendo representada pelo Índice Enzimático (IE), de acordo com metodologia proposta por Oliveira et al. (2006a,b). O IE expressa a relação entre o diâmetro total do halo de hidrólise ($\text{DMH} = \text{halo} + \text{colônia}$, em mm) e o diâmetro das colônias bacterianas (DMC , em mm), sendo obtido pela equação: $\text{IE} = \text{DMH}/\text{DMC}$. O DMC e DMH foram mensurados utilizando paquímetro digital.

Similarmente, foi mensurado, com auxílio de paquímetro digital, o diâmetro das colônias bacterianas (DMC , em mm) e o diâmetro total do halo de solubilização ($\text{DMS} = \text{halo} + \text{colônia}$, em mm) no ensaio para detecção da capacidade solubilizadora de fosfato inorgânico pelos isolados bacterianos. A partir destes dados, estimou-se o Índice de Solubilização (IS), calculado através da seguinte equação: $\text{IS} = \text{DMS}/\text{DMC}$.

Os resultados das repetições foram empregados para cálculo de médias e erro padrão, utilizando o *software* Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft). Para o IE e o IS, realizou-se análise estatística através do teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando o Sistema para Análise e Separação de Médias em Experimentos Agrícolas (SASM-Agri, versão 8.2 demo) (CANTERI et al., 2001).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CONTAGEM, ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E COLORAÇÃO DE GRAM

A contagem de microrganismos no solo, apesar de ser vista com ressalvas, ajuda a entender os processos que nele ocorrem e pode servir como um indicador do impacto de diferentes atividades antrópicas, onde a determinação das densidades populacionais na comunidade microbiana dos solos é importante, tanto na identificação de fatores que influenciam o equilíbrio microbiológico dos solos como na caracterização das relações entre grupos e espécies de microrganismos (PREVIATI et al., 2012). Observa-se que o contraste entre o solo rizosférico e não rizosférico é marcante, podendo ser avaliado pela relação entre a densidade das populações de microrganismos (BARBOSA et al., 2015).

O solo rizosférico apresentou uma contagem bacteriana de $2,75 \pm 0,7 \times 10^7$ UFC g⁻¹ solo seco (n = 3), enquanto a contagem de bactérias no solo não-rizosférico atingiu $1,99 \pm 0,9 \times 10^7$ UFC g⁻¹ solo seco (n = 3), apresentando diferença significativa pelo teste *t* (*p* < 0,05).

Maior contagem de bactérias em solo rizosférico em comparação ao solo não-rizosférico também foi relatada na cultura do milho (*Zea mays*) (RAMOS; SOBUCKI; DAROIT, 2015) e de repolho (*Brassica* sp.) (NAHAS et al., 1997), enquanto que outros trabalhos não observaram a mesma tendência, como na cultura do amendoim (*Arachis hypogaea* L.) (MÜLLER et al., 2010) e na gramínea *Aristida adscensionis* L. (GORLACH-LIRA & COUTINHO, 2007).

O ambiente rizosférico é reconhecido como uma zona de elevada atividade microbiana e enzimática, devido principalmente à produção exsudatos radiculares (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006; BARBOSA et al., 2015). Ainda, na rizosfera, os microrganismos podem apresentar funcionalidades distintas daquelas que possuem quando no ambiente solo (ROMAGNOLI & ANDREOTE, 2016).

As colônias com aspecto morfológico distinto foram selecionadas e isoladas em culturas puras através da técnica de esgotamento em placas de PCA. Realizou-se a caracterização morfológica e coloração de Gram para os isolados rizosféricos (Tabela 1).

Tabela 1. Morfologia e coloração de Gram de rizobactérias do morangueiro.

Isolado	Morfologia	Gram	Isolado	Morfologia	Gram
LABM01	Coco	+	LABM16	Coco	-
LABM02	Bastonete	+	LABM17	Coco	+
LABM03	Bastonete	+	LABM18	Bastonete	-
LABM04	Coco	+	LABM19	Bastonete	+
LABM05	Coco	+	LABM20	Bastonete	+
LABM06	Coco	+	LABM21	Coco	+
LABM07	Coco	+	LABM22	Coco	+
LABM08	Bastonete	+	LABM23	Coco	+
LABM09	Coco	+	LABM24	Bastonete	+
LABM10	Coco	+	LABM25	Coco	+
LABM11	Bastonete	+	LABM26	Bastonete	+
LABM12	Coco	+	LABM27	Bastonete	-
LABM13	Coco	+	LABM28	Coco	+
LABM14	Coco	+	LABM29	Bastonete	+
LABM15	Bastonete	-	LABM30	Coco	+

Em relação à morfologia colonial, observou-se 30 isolados distintos (Tabela 1). Destes 30 isolados, 60,0% (18) apresentaram-se como cocos, enquanto que 40,0% (12) apresentaram a morfologia de bastonete. Em relação à coloração de Gram, 86,7% (26) dos isolados foram classificados como Gram-positivos e 13,3% (4) como Gram-negativos. Dos isolados com forma de bastonetes, 75,0% demonstraram perfil tintorial Gram-positivo e 25,0% demonstraram perfil tintorial Gram-negativo; enquanto que dos isolados com forma de coco, 94,4% apresentaram perfil de coloração Gram-positiva e 5,6% apresentaram perfil Gram-negativo.

Observa-se que as espécies de plantas, bem como os tipos de comunidades vegetais, podem afetar a diversidade estrutural e funcional da comunidade microbiana da rizosfera, principalmente devido a variações na composição dos exsudatos radiculares e dos sinais bioquímicos neles contidos, que influenciam diretamente o comportamento das bactérias na rizosfera (ROMAGNOLI & ANDREOTE, 2016). Nesse sentido, a variação nos grupos bacterianos presentes na rizosfera é relatada em diferentes estudos.

Ramos & Daroit (2016), analisando solo rizosférico na cultura do milho (*Zea mays*), observaram que 60,0% dos isolados apresentaram morfologia de bastonete, e destes, 72,2% demonstraram perfil tintorial Gram-positivo, demonstrando o predomínio de bastonetes Gram-positivos. Em solo rizosférico da caatinga, Gorlach-Lira & Coutinho (2007) observaram igualmente predomínio de perfil tintorial Gram-positivo (83,0%). Contrariamente, Carvalho et al. (2016) estudando isolados bacterianos de raízes da cactácea *Cereus* sp., observaram que 73,0% dos isolados apresentaram morfologia de bastonetes Gram-negativos.

Em solo do Pará observou-se predominância de bastonetes Gram-positivos, seguidos de cocos Gram-positivos, bastonetes Gram-negativos e cocos Gram-negativos (BATISTA et al., 2010). Santos e Batista (2015) reportaram que 44% dos isolados bacterianos obtidos de solo do Mato Grosso, foram classificados como bastonetes Gram-positivos, 19% como bastonetes Gram-negativos, 35% como cocos Gram-positivos e 2% como cocos Gram-negativos. Também em solo do Mato Grosso, Stieven et al. (2009) indicaram predomínio de bactérias Gram-negativas em pastagem cultivada, pastagem natural e mata nativa. Em solo com aporte de vinhaça, 45,1% das bactérias isoladas foram classificadas como bastonetes Gram-negativos, 51,6% como bastonetes Gram-positivos, e 3,3% como cocos Gram-positivos (SILVA et al., 2012).

Batista et al. (2010) avaliando o efeito do estresse hídrico sob as populações microbianas, observaram predomínio de bactérias bastonetes Gram-positivos, com 47,0% em solo de floresta primária e 62,0% em solo de floresta sob estresse hídrico. Correia et al. (2014), estudando bactérias autóctones de sedimentos de mangue, observaram que 83,3% dos isolados apresentaram perfil tintorial Gram-positivo. Assim, diferentes manejos do solo e de cobertura vegetal podem alterar a densidade e grupos funcionais da microbiota (RAMOS et al., 2012).

4.2. AVALIAÇÃO FUNCIONAL DOS ISOLADOS DE SOLO RIZOSFÉRICO

4.2.1 Potencial proteolítico

Enzimas proteolíticas são conhecidas por catalisarem a hidrólise de proteínas, liberando uma mistura de aminoácidos. No solo as enzimas proteolíticas extracelulares de fontes bacterianas normalmente apresentam maior atividade em faixa de pH próxima a neutralidade (KAMIMURA & HAYANO, 2000).

A partir dos 30 isolados bacterianos avaliados quanto à capacidade de produção de proteases, 56,7% (17) produziram halo de hidrólise (Figura 4). Dos 17 isolados bacterianos proteolíticos, 52,9% (9) foram cocos gram-positivo, 41,2% (7) bastonetes gram-positivos e 5,9% (1) bastonetes gram-negativos. Os DMCs variaram de $2,5 \pm 0,03$ mm (isolado LABM05) a $29,3 \pm 0,02$ mm (isolado LABM11); os DMHs variaram de $5,2 \pm 0,02$ mm (isolado LABM05) a $48,9 \pm 0,18$ mm (isolado LABM11) (Figura 4). Os IEs para a atividade proteolítica variaram de 1,0 (isolado LABM14) a 4,4 (isolado LABM03) (Figura 5). Observa-se que, apesar do isolado LABM11 apresentar os maiores DMC e DMH, respectivamente, foi o isolado LABM03

que apresentou o maior IE, apresentando um DMC de $7,3 \pm 0,03$ mm e DMH de $32,4 \pm 1,2$ mm.

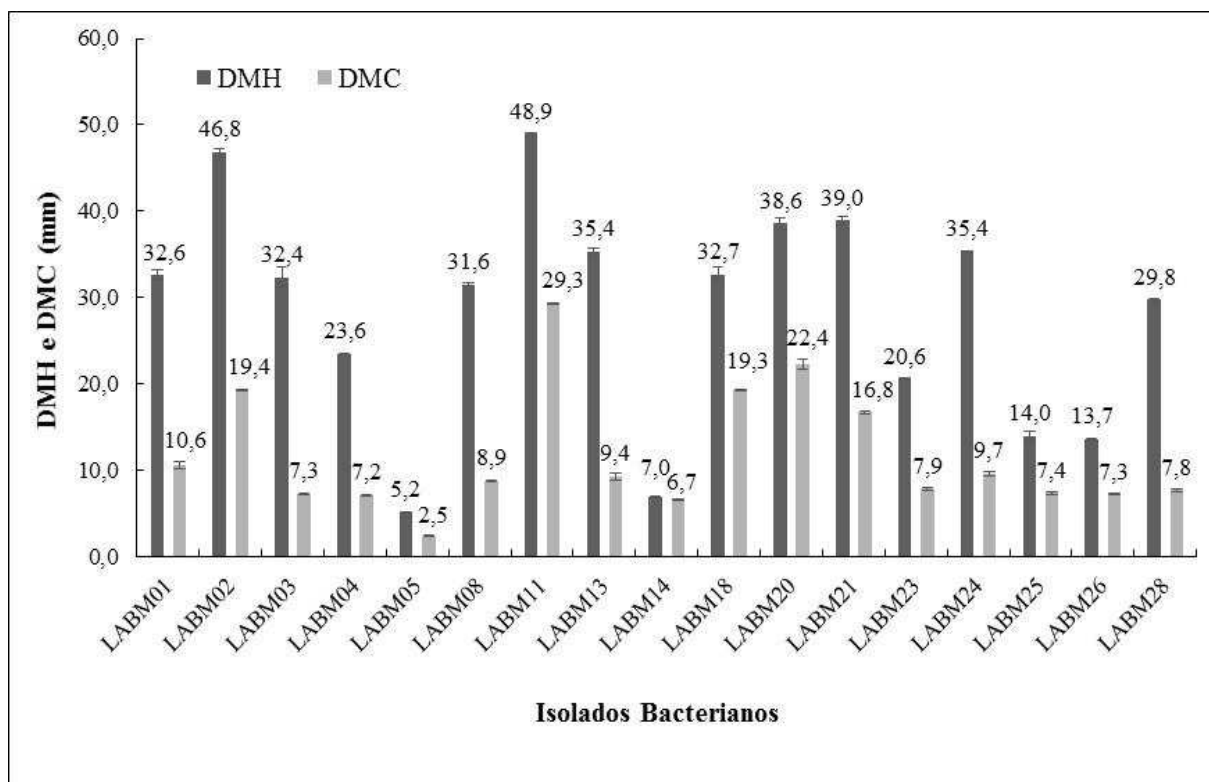


Figura 4. Diâmetro médio de halo de hidrólise (DMH) e diâmetro médio de colônia (DMC) de 17 isolados bacterianos proteolíticos. Os isolados foram inoculados Ágar Leite (pH 7,0), incubados 30 °C por 72 h. Os resultados indicam a média e desvio padrão de ensaios realizados em triplicata (n = 3).

Martins et al. (2016), analisando solo amostrado no bioma Caatinga, observaram que 21,0% dos isolados apresentaram atividade proteolítica. Oliveira et al. (2006a) investigando a atividade enzimática de rizóbios nativos da Amazônia Central, observaram que 37,0% dos isolados bacterianos do feijão-caupi e 33,3% dos isolados da cultura da soja apresentaram atividade proteolítica. De 15 isolados bacterianos oriundos de solos da floresta Amazônica, nove isolados (60%) foram capazes de produzir halos de proteólise em AL (BACH et al., 2011). Contrariamente, Oliveira et al. (2017) analisando solo amostrado em área urbana em zona de transição entre os biomas Mata Atlântica e Pampa, observaram elevada atividade proteolítica dos isolados, com 78,0% dos isolados bacterianos apresentando atividade proteolítica em meio AL e, Ramos & Daroit (2016) analisando solo rizosférico na cultura do milho (*Zea mays*), observaram que 68,9% dos isolados bacterianos apresentaram atividade proteolítica em meio AL.

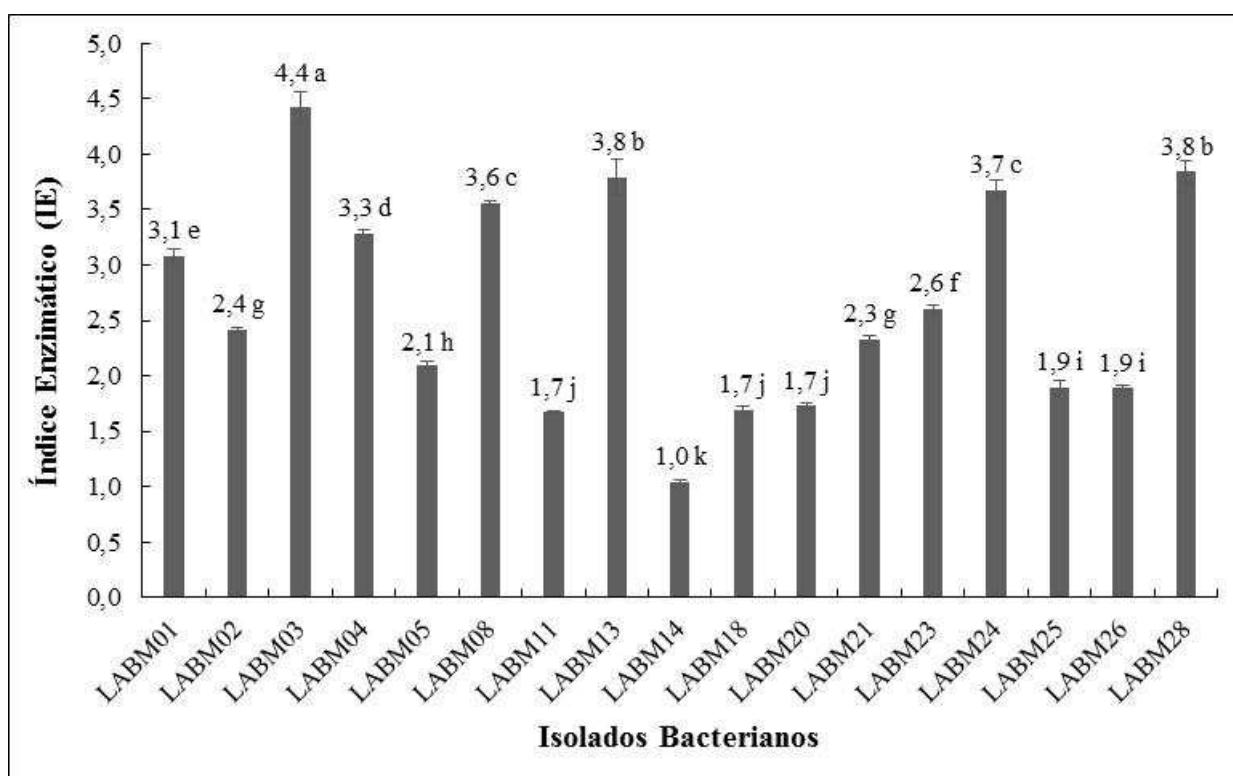


Figura 5. Índice Enzimático (IE) para 17 isolados bacterianos proteolíticos. As médias e desvios foram calculados a partir de três repetições ($n = 3$) para cada isolado bacteriano. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Scott-Knott.

No solo, a maior parte do aporte de nitrogênio orgânico se dá na forma de polímeros, contidos em restos culturais, adubos e na biomassa de organismos mortos, que primeiro devem ser divididos em unidades menores por um conjunto de enzimas extracelulares para serem usadas no metabolismo microbiano (BALOTA, 2017). As proteases, por serem as principais enzimas extracelulares envolvidas na hidrólise de proteínas (GEISSELER et al., 2010), são essenciais para o processo de mineralização do nitrogênio proteico, estando assim relacionadas ao ciclo do nitrogênio no solo (SANOMIYA & NAHAS, 2003).

4.2.2 Potencial celulolítico

A capacidade de produção de celulasas foi investigada através de cultivos em placas contendo o meio Ágar CMC. A carboximetilcelulose (CMC) é um polímero derivado da celulose, no entanto, ao contrário da celulose, a CMC é solúvel em água e quimicamente reativa (PENSINI et al., 2013). Por ser um substrato macromolecular, a CMC não é passível de absorção direta pelas células bacterianas, sendo necessária à sua biodegradação pelas células

microbianas. Assim, a biodegradação da carboximetilcelulose envolve a produção de celulasas extracelulares que realizam a hidrólise enzimática de ligações glicosídicas no substrato (MENEZES & BARRETO, 2015).

Dos 30 isolados bacterianos avaliados quanto à capacidade de produção de celulasas, 33,3% (10) produziram halo de hidrólise (Figura 6).

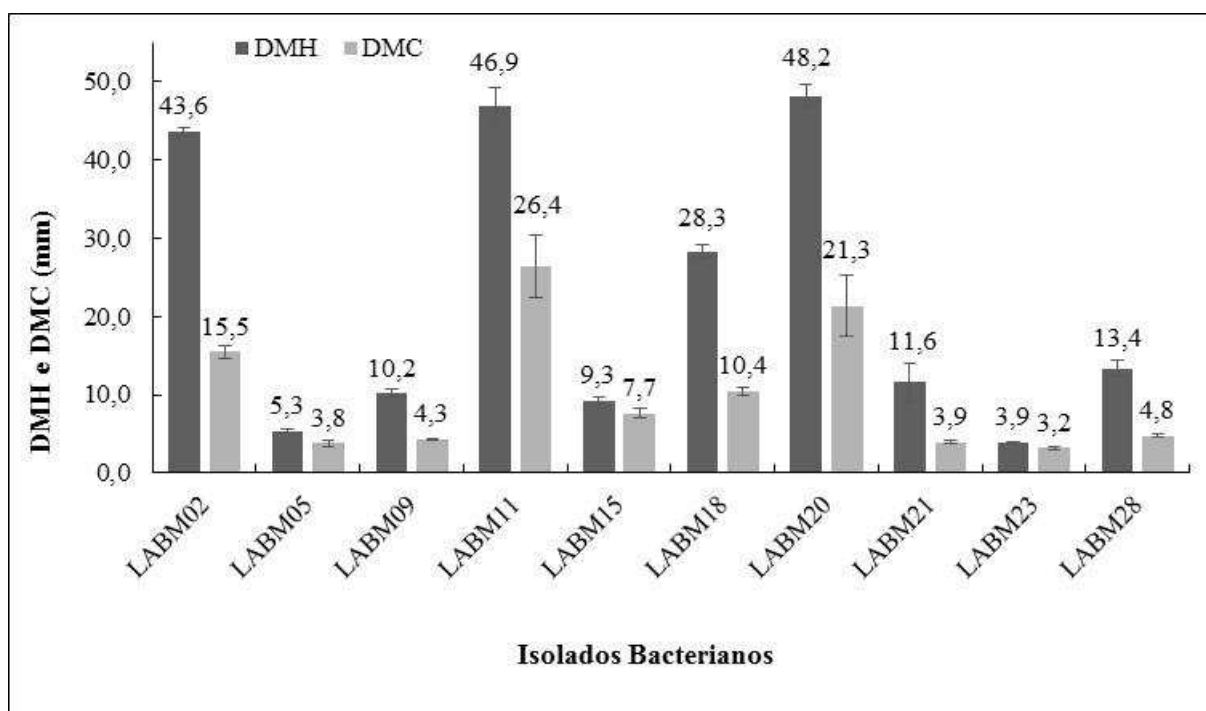


Figura 6. Diâmetro médio de halo de hidrólise (DMH) e diâmetro médio de colônia (DMC) de 10 isolados bacterianos cultivados em Ágar CMC (pH 7,0) a 30 °C por 96 h. Os resultados indicam a média e desvio padrão de ensaios realizados em triplicata (n = 3).

Considerando os 10 isolados com atividade celulolítica positiva, 50,0% (5) foram cocos Gram-positivos, 30,0% (3) bastonetes Gram-positivos e 20% bastonetes Gram-negativos. Os diâmetros médios das colônias (DMC) variaram de $3,2 \pm 0,17$ mm para o isolado LABM23 até $26,4 \pm 4,02$ mm para o isolado LABM11; os diâmetros médios das colônias (DMH) variaram de $3,9 \pm 0,12$ mm para o isolado LABM23 até $48,2 \pm 1,39$ mm para o isolado LABM20 (Figura 6). Os IEs para a atividade celulolítica variaram de 1,2 para os isolados LABM15 e LABM23 a 2,9 para o isolado LABM21 (Figura 7).

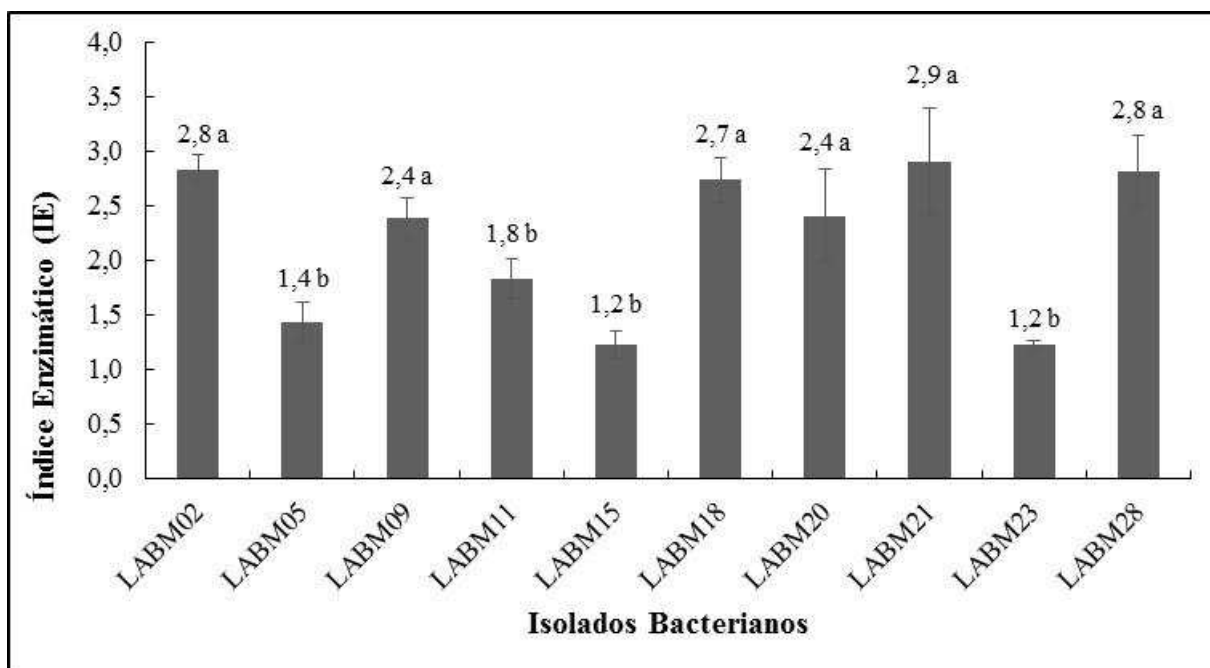


Figura 7. Índice Enzimático (IE) para 10 isolados bacterianos celulolíticos. As médias e desvios foram calculados a partir de três repetições ($n = 3$) para cada isolado bacteriano. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Scott-Knott.

Estudando 28 isolados de actinobactérias (bactérias Gram-positivas) isoladas da região semiárida do Ceará, Silva et al. (2015b) observaram que 75,0% dos isolados apresentaram atividade celulolítica. Oliveira et al. (2017), analisando solo amostrado em área urbana em zona de transição entre os biomas Mata Atlântica e Pampa, observaram que 61,0% dos isolados bacterianos apresentaram atividade celulolítica, enquanto que Ramos & Daroit (2016) analisando solo rizosférico na cultura do milho (*Zea mays*), observaram que 65,5% dos isolados bacterianos demonstraram tal atividade. A partir de 43 isolados bacterianos de solo e rizosfera, 32,5% demonstraram perfil positivo para a produção de celulasas (GORLACH-LIRA & COUTINHO, 2007).

A celulose é o polissacarídeo de maior ocorrência natural e representando a maior parte do CO_2 fixado pelas plantas. No solo, a fração carbono encontra-se principalmente sob a forma de carbono orgânico, sendo suscetível de utilização nos processos nutricionais dos organismos que ocupam esse nicho (BRANDANI & SANTOS, 2016). Para promover a hidrólise da celulose, os microrganismos secretam enzimas celulolíticas e usam as unidades de glicose resultantes desse processo para o seu metabolismo. Como grande parte da vegetação adicionada ao solo é celulósica, a decomposição desse material apresenta-se como um importante processo biológico. A atividade celulolítica promovida pelos microrganismos representa uma atividade

importante para a ciclagem de carbono no solo (SANOMIYA & NAHAS, 2003). Logo, atenção especial tem sido dada aos microrganismos que participam desta decomposição no solo (ALEXANDER, 1991).

4.2.3 Potencial amilolítico

As amilases podem ser divididas em endoamilases, que catalisam a hidrólise de forma aleatória no interior da molécula de amido, resultando em oligossacarídeos lineares e ramificados de vários comprimentos de cadeia, e exoamilases, que hidrolisam a extremidade não-redutora, resultando em produtos de cadeia curta, onde uma ação combinada de várias enzimas é necessária para hidrolisar completamente o amido (GUPTA et al., 2003a).

No solo, as amilases (α -amilases, β -amilases, γ -amilases) hidrolisam as ligações glicosídicas da molécula de amido, liberando unidades de maltose e, no estágio final de hidrólise, moléculas de glicose, que são fonte de energia para os microrganismos do solo (BALOTA, 2017). O isolamento de microrganismos amilolíticos pode contribuir para a compreensão do papel da microbiota e sua contribuição na qualidade biológica do solo. A atividade amilolítica, juntamente com a atividade celulolítica, estão relacionadas com o ciclo do carbono, sendo assim, atividades importantes para a ciclagem de carbono no solo (SANOMIYA & NAHAS, 2003).

Após os testes de atividade celulolítica, os isolados bacterianos identificados pelas siglas LABM18, LABM19, LABM23 e LABM27 não apresentaram mais crescimento em meio de cultura. Assim, 26 isolados bacterianos foram empregados na avaliação do potencial amilolítico. Destes 26 isolados bacterianos avaliados quanto à capacidade de produção de amilase, 19,2% (5) produziram halo de hidrólise (Figura 8), sendo 60,0% (3) bastonetes Gram-positivos e 40,0% (2) cocos Gram-positivos.

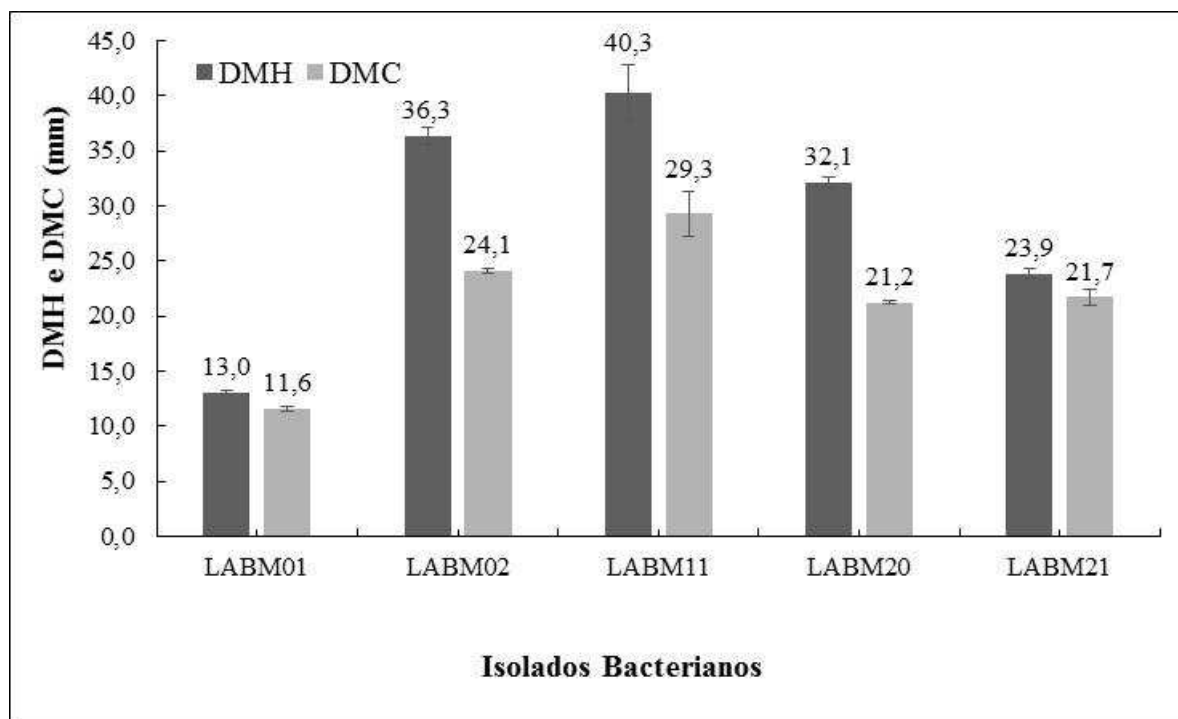


Figura 8. Diâmetro médio de halo de hidrólise (DMH) e diâmetro médio de colônia (DMC) de cinco isolados bacterianos amilolíticos. Os isolados foram inoculados em meio de cultura sólido contendo amido (pH 7,0), incubados 30 °C por 96 h. Os resultados indicam a média e desvio padrão de ensaios realizados em triplicata (n = 3).

Os diâmetros médios de colônia (DMC) variaram de $11,6 \pm 0,17$ mm para o isolado LABM01 até $29,3 \pm 2,07$ mm para o isolado LABM11; os diâmetros médios de halos de hidrólise (DMH) variaram de $13,0 \pm 0,15$ mm para o isolado LABM01 até $40,3 \pm 2,56$ mm para o isolado LABM11. Os isolados LABM02 e LABM20 apresentaram IE de 1,5, apresentando significância estatística em relação aos demais isolados bacterianos (Figura 9).

Oliveira et al. (2006b) avaliando o a atividade hidrolítica de rizóbios nativos da Amazônia central, observaram que 32,8% dos isolados apresentaram atividade amilolítica. Bastos-Neto et al. (2012) estudando isolados bacterianos da rizosfera de mandioca (*Manihot esculenta*) e batata-doce (*Ipomea batatas*) observaram que 40,0% dos isolados apresentaram atividade amilolítica. Similarmente, aproximadamente 30% das bactérias isoladas de solo em Minas Gerais apresentaram esta atividade (SANOMIYA & NAHAS, 2003). Em estudo de bactérias autóctones de sedimentos de mangue, 59,0% dos isolados apresentaram atividade amilolítica (CORREIA et al., 2014). A investigação de bactérias isoladas do solo e rizosfera de couve-flor indicou que 16% dos isolados foram capazes de secretar amilase; contudo, nenhuma bactéria rizosférica apresentou atividade amilolítica (SILVA et al., 2009).

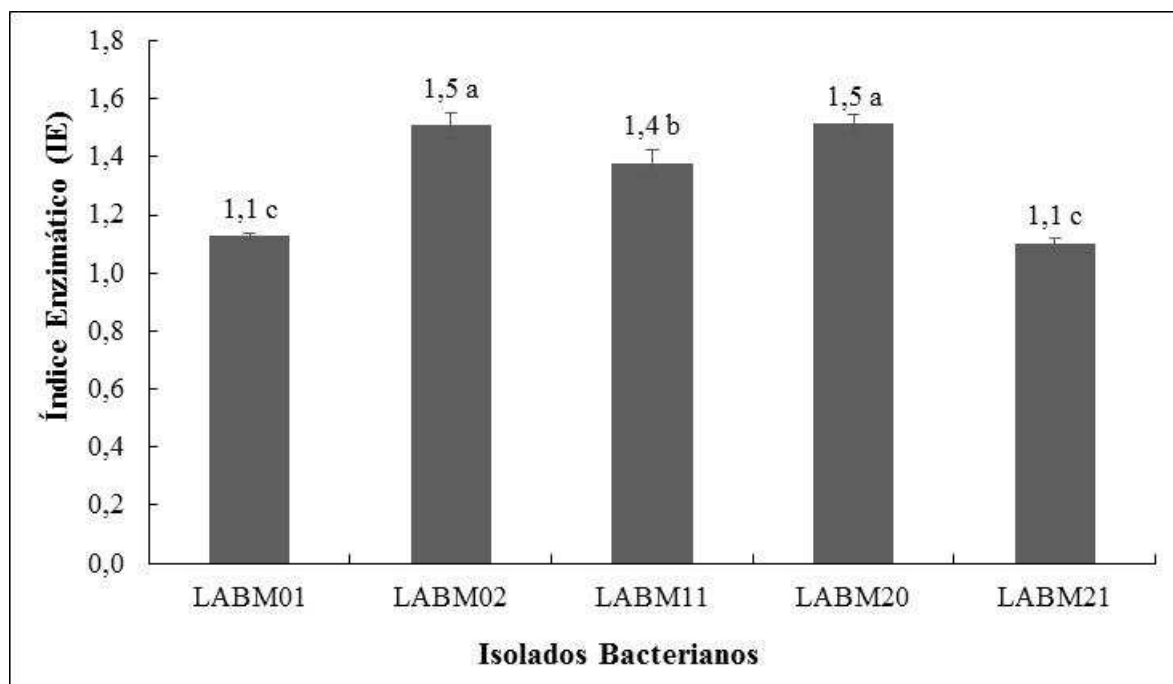


Figura 9. Índice Enzimático (IE) para cinco isolados bacterianos amilolíticos. As médias e desvios foram calculados a partir de três repetições ($n = 3$) para cada isolado bacteriano. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Scott-Knott.

4.2.4 Potencial lipolítico

No solo, os lipídios, sejam os de ocorrência natural ou resíduos adicionados, encontram-se principalmente na forma de triacilgliceróis (ou triglicerídeos), sendo esta a principal gordura de armazenamento no tecido vegetal e animal, onde a sua degradação envolve enzimas denominadas de lipases (COOPER & MORGAN, 1981). As lipases catalisam a hidrólise e transesterificação de outros ésteres, bem como a síntese de ésteres e exibem propriedades enantiosseletivas, podendo ser produzidas por animais, plantas e microrganismos (TREICHEL et al., 2010).

Na literatura científica, diversos são os métodos relatados para avaliação da atividade lipolítica (HASAN; SHAH; HAMMED, 2009). No presente estudo, a capacidade de produção de lipases foi investigada através de cultivos em Agar Tributirina (TBA) (ERTUGRUL et al., 2007), onde os isolados bacterianos que apresentaram atividade positiva neste meio, caracterizado pela presença de halo translúcido, foram classificados enquanto lipolíticos (OLIVEIRA et al., 2017).

Após os testes de atividade amilolítica, os isolados LABM15 e LABM20 não apresentaram mais crescimento em meio de cultura. Assim, 24 isolados bacterianos foram empregados na avaliação do potencial lipolítico. Dos 24 isolados bacterianos avaliados quanto à capacidade de produção de lipases/esterases, 100,0% (24) produziram halo de hidrólise (Tabela 2), sendo 66,7% (16) cocos Gram-positivos, 29,1% (7) bastonetes Gram-positivos e 4,2% (1) cocos Gram-negativos.

Os diâmetros médios de colônia (DMC) variaram de $1,8 \pm 0,02$ mm para o isolado LABM10 até $13,3 \pm 0,07$ mm para o isolado LABM11; os diâmetros médios do halo de hidrólise (DMH) variaram de $2,3 \pm 0,04$ mm para o isolado LABM10 até $15,7 \pm 0,14$ mm para o isolado LABM11. O isolado LABM05 apresentou o maior IE (3,7), apresentando significância estatística em relação aos demais isolados bacterianos (Tabela 2).

Tabela 2. Diâmetro médio de halo de hidrólise (DMH), diâmetro médio de colônia (DMC) e índice enzimático (IE) de 24 isolados bacterianos lipolíticos.

Isolado ^A	DMH (mm) ^B	DMC (mm) ^B	IE ^C
LABM01	$10,0 \pm 0,6$	$7,9 \pm 0,5$	1,3 ^f
LABM02	$14,3 \pm 0,3$	$11,5 \pm 0,4$	1,2 ^f
LABM03	$9,6 \pm 0,6$	$6,0 \pm 0,2$	1,6 ^e
LABM04	$10,6 \pm 0,2$	$4,7 \pm 0,1$	2,3 ^c
LABM05	$7,3 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,1$	3,7 ^a
LABM06	$3,3 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,1$	1,7 ^e
LABM07	$12,4 \pm 0,6$	$3,9 \pm 0,1$	3,2 ^b
LABM08	$11,3 \pm 0,4$	$5,5 \pm 0,7$	2,1 ^d
LABM09	$3,9 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,1$	1,6 ^e
LABM10	$2,3 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,1$	1,3 ^f
LABM11	$15,7 \pm 0,1$	$13,3 \pm 0,1$	1,2 ^f
LABM12	$3,1 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,1$	1,2 ^f
LABM13	$3,0 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,1$	1,2 ^f
LABM14	$3,7 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,1$	1,6 ^e
LABM16	$3,6 \pm 0,6$	$2,8 \pm 0,3$	1,3 ^f
LABM17	$4,7 \pm 0,8$	$2,8 \pm 0,5$	1,7 ^e
LABM21	$3,6 \pm 0,6$	$2,8 \pm 0,3$	1,3 ^f
LABM22	$8,1 \pm 0,3$	$3,6 \pm 0,2$	2,3 ^c
LABM24	$12,8 \pm 0,2$	$5,4 \pm 0,3$	2,4 ^c
LABM25	$3,8 \pm 0,1$	$2,7 \pm 0,1$	1,4 ^f
LABM26	$7,0 \pm 0,2$	$5,4 \pm 0,2$	1,3 ^f
LABM28	$3,4 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,1$	1,5 ^e
LABM29	$4,1 \pm 1,3$	$2,4 \pm 0,8$	1,7 ^e
LABM30	$4,4 \pm 0,6$	$2,0 \pm 0,2$	2,1 ^d

^A Os isolados foram inoculados em Ágar Tributirina (pH 7,0), incubados 30 °C por 48 h.

^B Os resultados indicam a média e desvio padrão de ensaios realizados em triplicata (n = 3).

^C Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Scott-Knott.

Oliveira et al. (2017), em avaliação de isolados bacterianos de solo, observaram resultados semelhantes ao presente estudo, onde 100,0% dos isolados bacterianos (18) demonstraram potencial lipolítico em Ágar Tributirina. Em estudo com 66 isolados bacterianos de solo contaminado com óleo vegetal residual, observou-se que todos os isolados apresentaram resultados positivos em Ágar Tributirina (CARVALHO; DIAS; GORLACH-LIRA, 2012). Willerding et al. (2011) analisando amostras de solo coletados no bioma Amazônia, reportaram que 41,0% dos isolados bacterianos apresentaram atividade positiva para lipases em meio de cultura sólido contendo óleo de oliva. No mesmo sentido, Oliveira et al. (2006a) investigando a atividade enzimática de rizóbios nativos da Amazônia Central, observaram que 6,5% dos rizóbios isolados do feijão-caupi apresentaram atividade lipolítica em meio de cultura sólido contendo óleo de oliva como substrato de carbono.

4.2.5 Avaliação do potencial de solubilização de fosfato

Os microrganismos afetam diretamente a habilidade das plantas em adquirirem P do solo por meio de vários mecanismos, estimulando processos metabólicos que são efetivos na solubilização e mineralização do fósforo a partir de formas pouco disponíveis de P inorgânico e orgânico, como a excreção de íons de hidrogênio, liberação de ácidos orgânicos, produção de sideróforos e, a produção de enzimas fosfatases que são capazes de hidrolisar o P orgânico (MENDES & REIS JUNIOR, 2003).

Microrganismos podem apresentar a capacidade de solubilizar o P inorgânico insolúvel presente em fontes naturais de P-inorgânico. Particularmente, bactérias solubilizadoras de fosfato dissolvem o material de origem, liberando fosfato solúvel através de diversos mecanismos (BARBOSA et al., 2010). Assim, a solubilização de fosfato inorgânico pode ser realizada, em grande parte, pela redução do pH do solo através da produção de ácidos orgânicos e extrusão de prótons no solo (BALOTA, 2017). Os microrganismos solubilizadores apresentam potencial para serem empregados enquanto promotores de crescimento de plantas na agricultura (FREITAS, 2007), seja através da adoção de sistemas de manejo que modulem as populações nativas no solo ou através do uso desses microrganismos como inoculantes (SOUCHIE & ABOUD, 2007; BALOTA, 2017).

Na avaliação do potencial de solubilização de fosfato inorgânico insolúvel, dos 24 isolados bacterianos avaliados, 16,7% (4) produziram halo de solubilização (Figura 10), sendo 75,0% (3) bactérias cocos Gram-positivos e 25,0% (1) bastonetes Gram-positivos.

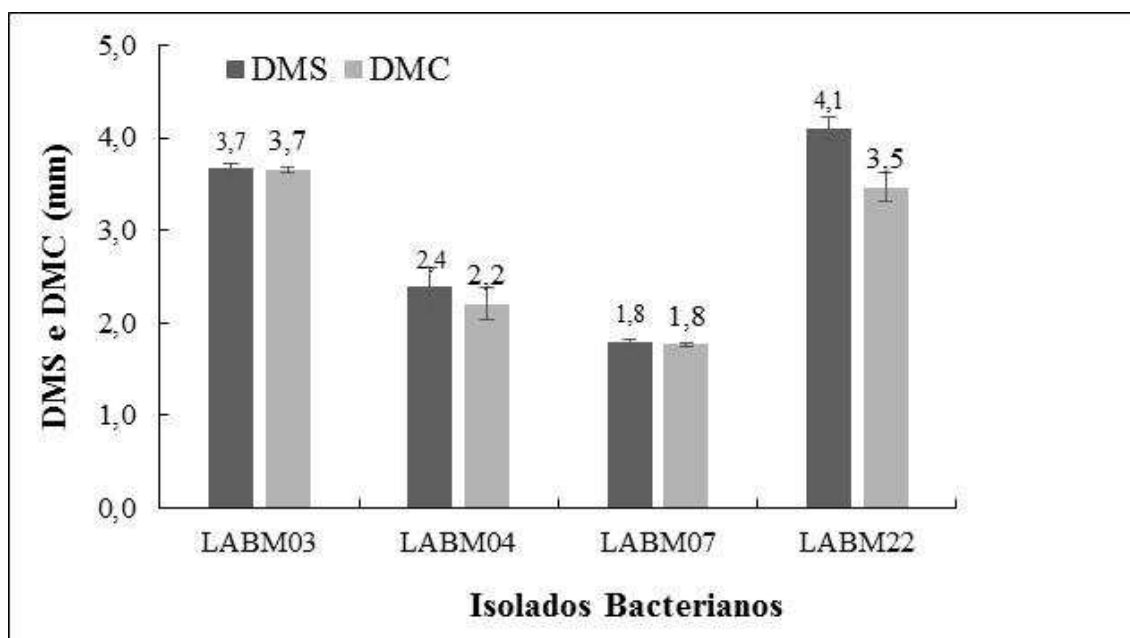


Figura 10. Diâmetro médio da colônia (DMC) e diâmetro médio do halo de solubilização (DMS) de quatro isolados bacterianos solubilizadores de fosfato inorgânico. Os isolados foram inoculados em placas contendo fosfato tricálcico (pH 7,0) e as incubações ocorreram a 30 °C por 10 dias. Os resultados indicam a média e desvio padrão de ensaios realizados em triplicata (n = 3).

Os diâmetros médios de colônia (DMC) variaram de $1,8 \pm 0,02$ mm para o isolado LABM07 até $3,7 \pm 0,03$ mm para o isolado LABM03; os diâmetros médios do halo de solubilização (DMS) variaram de $1,8 \pm 0,03$ mm para o isolado LABM07 até $4,1 \pm 0,13$ mm para o isolado LABM22. Em relação ao índice de solubilização (IS), os isolados LABM03 e LABM07 apresentaram um índice igual a 1,0 e, o isolado LABM22 apresentou IS de 1,2, não havendo diferença significativa entre os isolados (Figura 11).

Silva et al. (2011), em estudo de bactérias solubilizadoras de fosfato na rizosfera de diferentes culturas, observaram baixa atividade geral para solubilização de fosfato de cálcio, com 2,0%, 7,0%, 8,0%, 10,0%, 21,0% e 32,0% dos isolados bacterianos da rizosfera de manga, urucum, cupuaçu, pupunha, ingá e café, respectivamente. No mesmo sentido, Barroso & Oliveira (2001), estudando bactérias solubilizadoras de fosfato isoladas das raízes de diferentes espécies vegetais no bioma Amazonas, observaram baixa presença de bactérias solubilizadoras de fosfato de cálcio, variando de 0 a 10%. Contrariamente, Leite et al. (2014) estudando

isolados bacterianos de cana-de-açúcar, observaram que 75,5% dos isolados apresentaram capacidade de solubilização de P. Carvalho et al. (2016), avaliando bactérias de raízes da cactácea *Cereus* sp., também observaram que 75,0% dos isolados apresentaram esta capacidade.

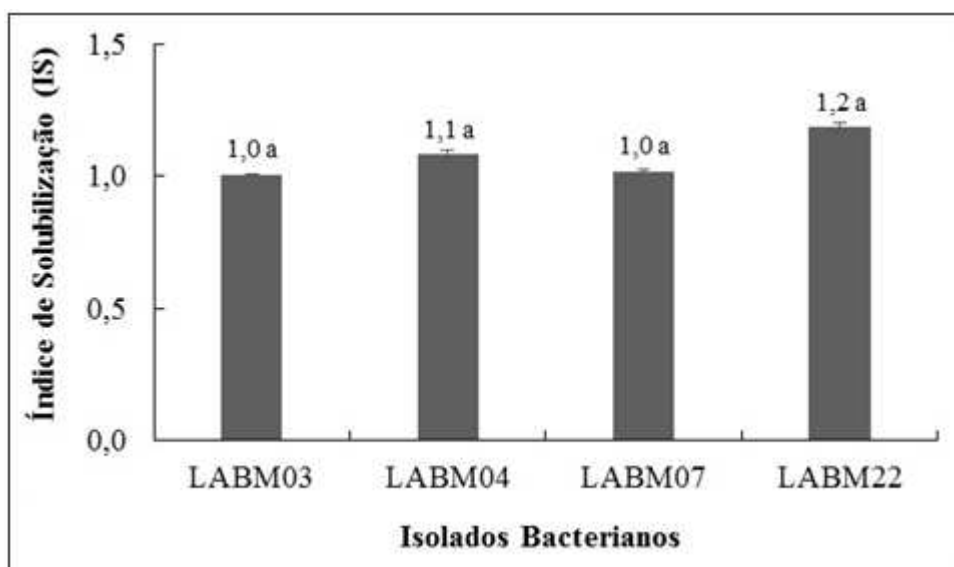


Figura 11. Índice de Solubilização (IS) para quatro isolados bacterianos solubilizadores de fosfato inorgânico. Médias e desvios foram calculados a partir de triplicatas ($n = 3$) para cada isolado. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Scott-Knott.

Sob uma perspectiva agrônômica, o estudo de microrganismos solubilizadores de fosfato apresenta especial importância para a compreensão da dinâmica do fósforo no solo, principalmente para solos ácidos com baixos níveis de fósforo lábil. Observa-se que diversos estudos buscam compreender as consequências dos diferentes manejos do solo sobre propriedades microbianas, particularmente em solos tropicais e subtropicais (Latosolos), onde a baixa disponibilidade de P, muitas vezes, limita a produção de culturas (BALOTA et al., 2013). Nesse sentido, investigações de microrganismos solubilizadores de fosfato podem auxiliar no planejamento do manejo das populações nativas do solo, sendo um caminho com potencial para diminuir a dependência de fertilizantes fosfatados solúveis, através do melhor aproveitamento dos fosfatos inorgânicos insolúveis presentes no solo (BALOTA, 2017).

4.2.6 Atividades hidrolíticas e de solubilização de fosfato combinadas

Diversos isolados bacterianos demonstraram atividades combinadas, ou seja, foram capazes de usar diferentes substratos para o seu desenvolvimento e/ou solubilizar fosfato inorgânico. Através da avaliação das atividades hidrolíticas e de solubilização de fosfato das rizobactérias isoladas do morangueiro, observou-se que, dos 24 isolados bacterianos avaliados para as cinco atividades, todos apresentaram ao menos uma atividade (Tabela 3). Sete isolados (29,2%) demonstraram somente uma atividade, sendo esta a atividade lipolítica (Figura 12A).

Tabela 3. Atividades hidrolíticas e de solubilização de fosfato inorgânico detectadas para 24 rizobactérias do morangueiro.

Isolado	Atividade avaliada ^a					Isolado	Atividade avaliada ^a				
	P	C	A	L	S		P	C	A	L	S
LABM01	+ ^b	-	+	+	-	LABM13	+	-	-	+	-
LABM02	+	+	+	+	-	LABM14	+	-	-	+	-
LAMB03	+	-	-	+	+	LABM16	-	-	-	+	-
LABM04	+	-	-	+	+	LABM17	-	-	-	+	-
LABM05	+	+	-	+	-	LABM21	+	+	+	+	-
LABM06	-	-	-	+	-	LABM22	-	-	-	+	+
LABM07	-	-	-	+	+	LABM24	+	-	-	+	-
LABM08	+	-	-	+	-	LABM25	+	-	-	+	-
LABM09	-	+	-	+	-	LABM26	+	-	-	+	-
LABM10	-	-	-	+	-	LABM28	+	+	-	+	-
LABM11	+	+	+	+	-	LABM29	-	-	-	+	-
LABM12	-	-	-	+	-	LABM30	-	-	-	+	-

^a P: protease; C: celulase, A: amilase; L: lipase; S: solubilização de fosfato tricálcico.

^b O sinal “+” indica resultado positivo e o sinal “-” indica resultado negativo para a atividade avaliada.

Ainda, das 24 rizobactérias, 37,5% (9) apresentaram duas atividades (Figura 12A), com a combinação protease + lipase (66,7%) sendo a mais frequentemente observada (Figura 12B). Cinco isolados bacterianos (20,8%) (Figura 12A) apresentam três atividades, sendo 40,0% (2) a combinação protease + lipase + solubilização; 40,0% (2) protease + celulase + lipase e, 20,0% (1) protease + amilase + lipase (Tabela 3, Figura 12C). Os isolados LABM02, LABM11 e LABM21 apresentaram quatro das cinco atividades investigadas (12,5%), onde a combinação

protease + celulase + amilase + lipase representou 100,0%. Nenhum isolado bacteriano, no presente estudo, apresentou a combinação das cinco atividades avaliadas.

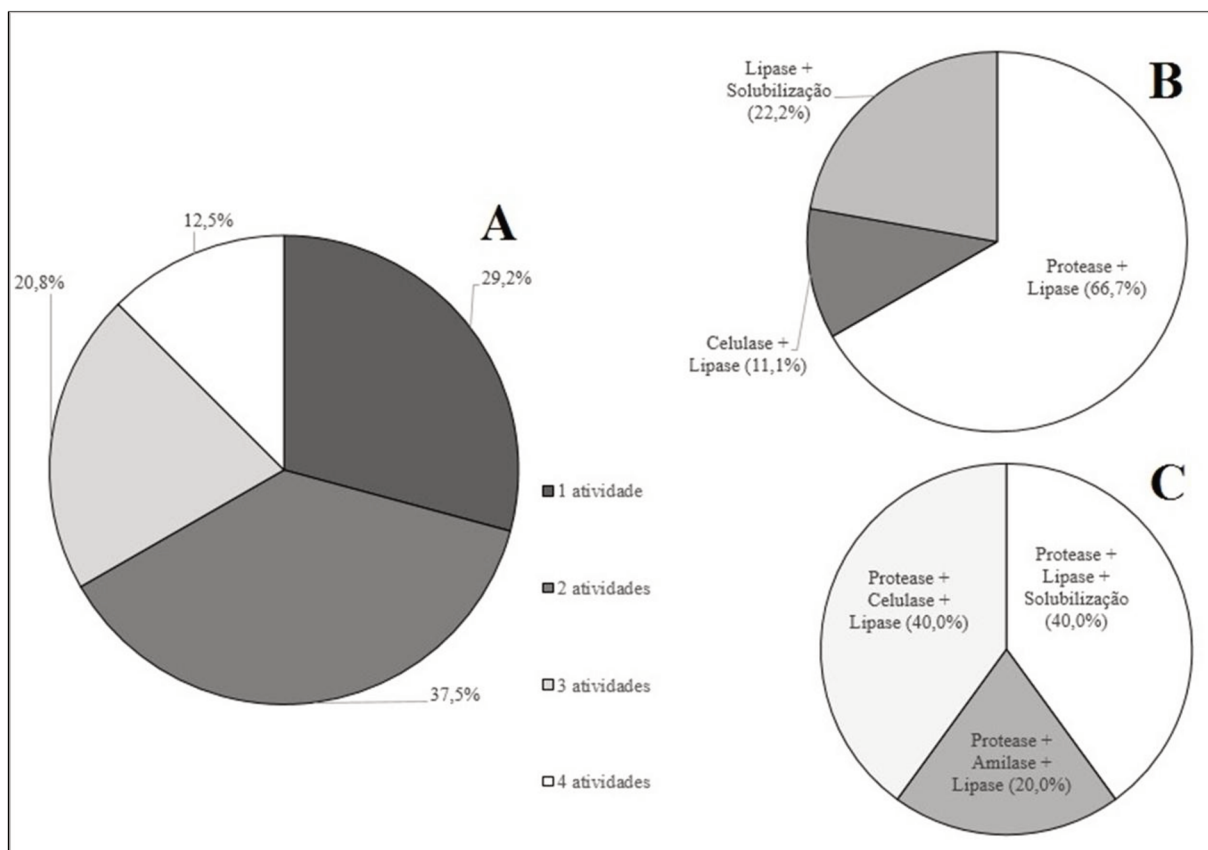


Figura 12. Síntese da bioprospecção funcional realizada para as rizobactérias isoladas do morangueiro. Considerou-se somente os 24 isolados avaliados nas cinco atividades. **A:** Percentual de isolados bacterianos e atividades combinadas (n = 24). **B:** Percentual de isolados bacterianos que apresentaram duas atividades avaliadas (n = 9). **C:** Percentual de isolados bacterianos que apresentaram três atividades avaliadas (n = 5).

O isolamento de microrganismos e a avaliação de atividades enzimáticas, pode indicar sua diversidade estrutural e funcional da microbiota do solo (ARIAS et al., 2005; MELLONI, 2007). Na literatura científica, a detecção de atividades combinadas é comumente reportada para vários isolados bacterianos oriundos de diferentes nichos ecológicos, indicando a potencial versatilidade fisiológica na utilização de substratos distintos encontrados no solo (SANOMIYA & NAHAS, 2003; OLIVEIRA et al., 2006b; TURBNBULL; LIU; LAZAROVITS, 2012; RAMOS & DAROIT, 2016; OLIVEIRA et al., 2017).

Apesar da diversidade microbiana do solo ser normalmente avaliada como a diversidade de espécies ou diversidade genética, sob uma perspectiva da qualidade do solo, a diversidade

estrutural e funcional podem ser mais importantes devido à redundância funcional de microrganismos para a qualidade do solo (MELLONI, 2007). A redundância funcional deriva da diversidade metabólica dos organismos no solo. Assim, enquanto a diversidade metabólica abrange a diversidade de processos biológicos capazes de serem executados pela microbiota presente em determinado solo, a redundância funcional refere-se à ocorrência de funções similares em grupos microbianos funcionais sob distintas condições ambientais, sendo a base da manutenção do funcionamento do sistema heterogêneo e dinâmico encontrado nos mais diferentes solos (MATOS et al., 2016).

Ainda, a redundância funcional atua na resiliência, ou seja, no poder de recuperação dos processos ecossistêmicos no solo, pois, se as condições desse forem desfavoráveis para um ou mais grupos, outros estarão adaptados àquelas condições e continuarão a realizar os processos (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Assim, a resiliência, quando utilizado na biologia do solo, indica a capacidade de a comunidade de organismos do solo retornar seu estado dinâmico original, taxonômica e funcionalmente, após um impacto ambiental, seja este causado por um evento natural ou por atividades relacionadas ao manejo dos solos (MATOS et al., 2016).

Nesse sentido, embora a diversidade dos organismos do solo seja importante, a capacidade das comunidades microbianas do solo para manter a diversidade funcional desses processos críticos do solo através de distúrbios, estresse ou sucessão pode, em última análise, ser mais importante para a produtividade e estabilidade do ecossistema do que a diversidade taxonômica (CALDWELL, 2005).

A prospecção funcional de microrganismos no ambiente rizosférico, além de contribuir para um maior conhecimento sobre a diversidade microbiana e suas funções ecossistêmicas (SIQUEIRA et al., 1994), pode contribuir para compreensão dos processos de estabelecimento das comunidades bacterianas nesse nicho (TURNBULL; CAMPBELL; LAZAROVITS, 2014) e a compreensão das interações exercidas pelas comunidades microbianas na rizosfera (BERENDSEN et al., 2012), bem como as suas interações com outros componentes da biodiversidade (OLIVEIRA et al., 2006), com aplicações práticas para o manejo da qualidade biológica do solo (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006; BALOTA, 2017).

Sob uma perspectiva agronômica, o estudo da diversidade funcional da microbiota do solo torna-se uma ferramenta importante para planejar o manejo do solo que vise a sua sustentabilidade. Assim, o estudo da diversidade funcional pode ser empregado enquanto uma ferramenta para análise da qualidade biológica do solo, devido ao fato de que os indicadores

microbianos, como as atividades enzimáticas, serem sensíveis aos diferentes manejos, rotações de culturas e perturbações no solo (DICK, 1992; ZHANG et al., 2009; ZHANG et al., 2010; BALOTA et al., 2014; BALOTA, 2017).

4.2.7 Potenciais aplicações biotecnológicas e industriais de enzimas hidrolíticas e microrganismos solubilizadores de fosfato inorgânico

Enzimas proteolíticas de origem microbiana dominam o mercado mundial de enzimas, correspondendo a dois terços das enzimas comercializadas anualmente (KASANA; SALWAN; YADAV, 2011), sendo comumente usadas no processamento de couro, produção de alimentos, na indústria farmacêutica e no tratamento de afluentes (CHAUD; VAZ; FELIPE, 2007). As celulases são enzimas empregadas na indústria têxtil; na indústria de ração animal; na indústria de processamento de alimentos e de bebidas, como na cervejaria e produção de vinho; na indústria de produção de papel, entre outros (KUHAD; GUPTA; SINGH, 2011). Igualmente, as amilases estão entre as mais importantes enzimas industriais, apresentando grande importância biotecnológica, tais como aplicações nas indústrias têxteis, cervejas, bebidas destiladas, panificação, cereais para alimentação infantil, liquefação e sacarificação do amido, ração animal, indústria química e farmacêutica (SOARES et al., 2010).

O interesse sobre lipases de diferentes fontes (microrganismos, animais e plantas) têm crescido acentuadamente na última década, devido ao potencial das aplicações de lipases na indústria e na medicina (HASAN; SHAH; HAMMED, 2009; SALIHU & ALAM, 2012), onde as lipases de origem microbiana representam a classe mais utilizada de enzimas em aplicações biotecnológicas e química orgânica (TREICHEL et al., 2010). Na indústria, estas enzimas possuem um enorme potencial em áreas como a tecnologia de alimentos, detergentes, a indústria química e ciências biomédicas (GUPTA et al., 2003b; CHOUDHURY & BHUNIA, 2015), bem como na indústria oleoquímica, sendo o grupo de enzimas mais relatados para a produção de biocombustíveis (RIBEIRO et al., 2011).

Investigações sobre microrganismos solubilizadores de fosfato inorgânico podem apontar para potenciais usos na agricultura através de inoculação de isolados eficientes, com potencial para melhorar o aproveitamento dos fosfatos inorgânicos insolúveis presentes no solo (RODRÍGUEZ & FRAGA, 1999; BALOTA, 2017). Contudo, o uso de inoculantes comerciais a campo apresenta diversas barreiras, como a dificuldade de estabelecimento dos

microrganismos solubilizadores de P na rizosfera das plantas e no solo; a aparente falta de especificidade desses microrganismos e as plantas; a falta de sincronia entre a liberação de fósforo e a absorção pelas plantas, entre outros (MENDES & REIS JUNIOR, 2003).

5 CONCLUSÕES

Solo rizosférico de morangueiro apresentou contagem bacteriana de $2,75 \pm 0,7 \times 10^7$ UFC g⁻¹ solo seco (n = 3), apresentando diferença significativa em relação solo não-rizosférico, que atingiu $1,99 \pm 0,9 \times 10^7$ UFC g⁻¹ solo seco (n = 3), reforçando o fenômeno conhecido como efeito rizosférico.

Do total de 30 isolados bacterianos distintos obtidos a partir da rizosfera de morangueiros, observou-se predomínio de bactérias com morfologia celular de coco (18; 60,0%) e perfil tintorial Gram-positivo (26; 86,7%).

Considerando-se os 24 isolados bacterianos avaliados nas cinco (5) atividades, todos apresentaram ao menos uma atividade, onde 100,0% apresentaram capacidade de produção de lipases, enquanto somente 16,7% (4) produziram halo de solubilização de fosfato inorgânico insolúvel.

Embora o presente estudo tenha amostrado somente pequena parcela da comunidade microbiana da rizosfera do morangueiro, as atividades hidrolíticas e a capacidade de solubilizar fosfato inorgânico indicam a versatilidade funcional dos isolados bacterianos, derivada da capacidade destes microrganismos usarem diferentes substratos no solo para seu desenvolvimento.

Estas funcionalidades, relacionadas a ciclos de elementos como carbono (lipase, celulase, amilase) e nitrogênio (protease), bem como às transformações do fósforo no solo, podem ser relevantes sob aspectos agronômicos, ecológicos e biotecnológicos.

REFERÊNCIAS

- ALCÂNTARA, F. A. de; MADEIRA, N. R. **Manejo do solo no sistema de produção orgânico de hortaliças**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2008. 12 p. Circula Técnica, nº 64.
- ALEXANDER, M. **Introduction to soil microbiology**. 2 ed. Florida: Krieger Publishing Company, 1991.
- ALVES, L.; MENDOZA, E. A.; SILVA FILHO, G. N. Microrganismos solubilizadores de fosfatos e o crescimento de Pinus e Eucalipto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 26, p. 939-947, 2002.
- ANDREOLA, F.; FERNANDES, S. A. P. A microbiota do solo na agricultura orgânica e no manejo das culturas. **In: SILVA, A. P. D.; FREITAS, S. S. (Eds.) Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agronômico, 2007. 312 p.
- ARIAS, M. E.; GONZÁLEZ-PÉREZ, J. A.; GONZÁLEZ-VILA, F. J.; BALL, A. S. Soil health – a new challenge for microbiologists and chemists. **International Microbiology**, v. 8, p. 13-21, 2005.
- ANTUNES, L. E. C.; CARVALHO, G. L.; SANTOS, A. M. dos. **A cultura do morango**. 2 ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2011. 52 p. (Coleção Plantar, 68).
- ANTUNES, L. E. C.; HOFFMANN, A. **Pequenas frutas: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília, DF: Embrapa, 2012. 194 p.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA 2005. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, 2005. 136 p.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA 2016. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, 2016. 86 p.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA 2017. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, 2017. 88 p.
- BACH, E.; CANNAVAN, F. S.; DUARTE, F. R. S.; TAFFAREL, J. A. S.; TSAI, S. M.; BRANDELLI, A. Characterization of feather-degrading bacteria from Brazilian soils. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 102-107, 2011.
- BALOTA, E. L. **Manejo e qualidade biológica do solo**. Londrina: Mecenaz, 2017. 288 p.
- BALOTA, E. L.; CALEGARI, A.; NAKATANI, A. S.; COYNE, M. S. Benefits of winter cover crops and no-tillage for microbial parameters in a Brazil Oxisol: A long-term study. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 197, p. 31-40, 2014.
- BALOTA, E. L.; YADA, I. F.; AMARAL, H.; NAKATANI, A. S.; DICK, R. P.; COYNE, M. S. Long-term land use influences soil microbial biomass P and S, phosphatase and arylsulfatase activities, and S mineralization in a Brazilian Oxisol. **Land Degradation & Development**, 2013.
- BANDICK, A. K.; DICK, R. P. Field management effects on soil enzyme activities. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 31, p. 1471-1479, 1999.

BARBOSA, M. V.; BARROS, M. C. S. ; ANDRADE, P. A. M. ; RAMOS, A. P. S.; FREIRE, F. J.; SOBRAL, J. K. Bactérias endofíticas de cana-de-açúcar: isolamento e potencial promoção de crescimento vegetal. **In:** 62º Reunião Anual da SBPC, 2010, Natal - RN. 62º Reunião Anual da SBPC. Natal - RN: Universidade Federal do Rio Grande do Norte - URFN, 2010.

BARBOSA, J. Z.; CONSALTER, R.; VEZZANI, F. M.; MOTTA, A. C. V. Bactérias e fungos benéficos na endosfera das plantas. **Revista Agrogeoambiental**, v. 7, n. 3, p. 99-116, 2015.

BARROSO, C. B.; OLIVEIRA, L. A. Ocorrências de bactérias solubilizadoras de fosfato de cálcio nas raízes de plantas na Amazônia brasileira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 25, p. 575-581, 2001.

BASTOS-NETO, B. S.; RE CAREY, H. A.; SANTO, A. A. E.; MOREAU, V. H.; FERRÃO-GONZALES, A. D. Isolamento e caracterização de microrganismos amilolíticos presentes na rizosfera de tuberosas amiláceas. **Diálogos & Ciência**, n. 30, p. 153-158, 2012.

BATISTA, S. B.; HARGREAVES, P. I.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; SOUZA, O. V. de. Análise fenotípica e genotípica de bactérias isoladas do solo da floresta nacional dos Tapajós, Pará, Brasil, sob efeito de estresse hídrico. **Revista Uniara**, v. 13, n. 1, p. 36-48, 2010.

BEHERA, B. C.; SETHI, B. K.; MISHRA, R. R.; DUTTA, S. K.; THATOI, H. N. Microbial cellulases – diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: a review. **Jornal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, p. 197-210, 2017.

BERENDSEN, R. L.; PIETERSE, C. M. J.; BAKKER, P. A. H. M. The rhizosphere microbiome and plant health. **Trends in Plant Science**, v. 17 n. 8, 2012.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 355-383, 2000.

BRANDANI, C. B.; SANTOS, D. G. dos. Transformações do carbono no solo. 2016. **In:** CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. Microbiologia do solo. 2 ed. Piracicaba, SP: ESALQ, 2016. 221 p.

BRASIL. **Código civil**. Lei 10.831, de 23 de dezembro de 2003. Brasília, 2003. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/2003/L10.831.htm>. Acesso em: 22 abril 2017.

BRASIL. **Código civil**. Decreto Nº 6.323., de 27 de dezembro de 2007 Brasília, 2007. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2007/Decreto/D6323.htm>. Acesso em: 22 abril 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa** nº 14, de 03 de abril de 2008. Brasília, 2008. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/producao-integrada/arquivos-publicacoes-producao-integrada/instrucao-normativa-no-14-de-03-de-abril-de-2008-morango.pdf>>. Acesso em: 02 Maio. 2017

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa** nº 24, de 04 de agosto de 2010. Brasília, 2010. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/producao-integrada/arquivos-publicacoes-producao-integrada/instrucao-normativa-no-24-de-04-de-agosto-de-2010-morango.pdf>>. Acesso em: 02 maio 2017

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Produção Integrada**: normas técnicas. 2017a. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/producao-integrada/normas-tecnicas>>. Acesso em: 02 maio 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Produção Integrada**: o que é produção integrada? 2017b. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/producao-integrada>>. Acesso em: 11 maio 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Produção Orgânica**. 2017c. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/organicos>>. Acesso em: 22 abril 2017.

BULL, A. T.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 573-606, 2000.

BURNS, R. G.; DEFOREST, J. L.; MARXSEN, J.; SINSABAUGH, R. L.; STROMBERGER, M. E.; WALLENSTEIN, M. D.; WEINTRAUB, M. N.; ZOPPINI, A. Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 58, p. 216-234, 2013.

BURNS, R. G.; DICK, R. P. Enzymes in the environment: activity, ecology, and applications. **New York**, 2002. 640 p.

CAMARGO, L. S.; SCARANARI, H. J.; IGUE, T. Efeito do tipo de mudas na produção de morangueiro. **Bragantia**, vol. 33, n. 3, p. 23-31, 1974.

CANTERI, M. G., ALTHAUS, R. A.; VIRGENS FILHO, J. S., GIGLIOTI, E. A.; GODOY, C. V. SASM-Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scoft-Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v. 1, n. 2, p. 18-24, 2001.

CARDOSO, E. J. B. N.; NOGUEIRA, M. A. A rizosfera e seus efeitos na comunidade microbiana e na nutrição de plantas. In: Silveira, A. P. D.; Freitas, S. S. (Eds.) **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2007. 312 p.

CALDWELL, B. A. Enzyme activities as a component of soil biodiversity: a review. **Pedobiologia**, v. 49, p. 637-644, 2005.

CARVALHO, L. C. T.; DIAS, P. V. S.; GORLACH-LIRA, K. Produção de lipases por bactérias isoladas de um solo contaminado com óleo vegetal residual. 2012. In: Anais 52º Congresso Brasileiro de Química, Recife, 2012.

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

CENCIANI, K.; FREITAS, S. S.; CRITTER, S. A. M.; AIROLDI, C. Enzymatic activity measured by microcalorimetry in soil amended with organic residues. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, p. 1167-1175, 2011.

CHAUD, L. C. S.; VAZ, P. V.; FELIPE, M. G. Considerações sobre a produção microbiana e aplicações de proteases. **Nucleus**, v. 4. n. 1-2 , p. 87-97, 2007.

CHOUDHURY, P.; BHUNIA, B. Industrial application of lipase: a review. **BioPharm Journal**, v. 1, n. 2, p. 41-47, 2015.

COOPER, A. B.; MORGAN, H. W. Improved fluorometric method to assay for soil lipase activity. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 13, p. 307-311, 1981.

CORDEIRO, M. A. S.; CORÁ, J. E.; NAHAS, E. Atributos bioquímicos e químicos do solo rizosférico e não rizosférico de culturas em rotação no sistema de semeadura direta. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, p. 1794-1803, 2012.

CORREIA, J. L. A.; SANTOS, T. R. dos.; SILVA Jr., A. A.; MARQUES, O. M. Isolamento, identificação e avaliação do potencial enzimático de bactérias autóctones de sedimento de mangue da lagoa do Araçá-Pe. 2014. **In: Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Florianópolis, p. 1-8, 2014.

COTTA, S. R. O solo como ambiente para a vida microbiana. 2016. **In: CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. Microbiologia do solo**. 2 ed. Piracicaba, SP: ESALQ, 2016. 221 p.

DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P. da. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Ciência Rural**, v. 39, n. 3, p. 945-954, 2009.

DENARDIN, J. E.; KOCHHANN, R. A.; FAGANELLO, A.; COGO, N. P. Agricultura conservacionista no Brasil: uma análise do conceito à adoção. **In: LEITE, L. F. C.; MACIEL, G. A.; ARAÚJO, A. S. F. de. Agricultura conservacionista no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa, 2014, 598 p.

DICK, R. P. A review: long-term effects of agricultural systems on soil biochemical and microbial parameters. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 40, p. 25-36, 1992.

DONADELLI, A.; KANO, C.; JUNIOR, F. F. Estudo de caso: análise econômica entre o custo de produção de morango orgânico e convencional. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 9, n. 2, 2012.

DORAN, J. W. Soil microbial and biochemical changes associated with reduced tillage. **Soil Science Society of America Journal**, v. 44, p. 765-771, 1980.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. 2 ed. Londrina: Editora Planta, 2006. 403 p.

ERTUGRUL, S.; DONMEZ, G.; TAKAÇ, S. Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. From olive mill wastewater and improving its enzyme activity. **Journal of Hazardous Materials**, v. 149, p. 720-724, 2007.

FACHINELLO, J. C.; PASA, M. S.; SCHMTIZ, J. D.; BETEMPS, D. L. Situação e perspectiva da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p. 109-120, 2011.

FALCÃO, J. V.; LACERDA, M. P. C.; MENDES, I. C. M.; LEÃO, T. P.; CARMO, F. F. Qualidade do solo cultivado com morangueiro sob manejo convencional e orgânico. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, n. 4, p. 450-459, 2013.

- FREITAS, S. S. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas. 2007. **In: SILVEIRA, A. P. D. da; FREITAS, S. S. Microbiologia do solo e qualidade ambiental.** Campinas: Instituto Agrônômico, 2007. 312 p.
- FREITAS, V. R.; PICOLI, S. U. A coloração de Gram e as variações na sua execução. **NewsLab**, v. 82, p. 124-128, 2007.
- GEISSELER, D.; HORWATH, W. R.; JOERGENSEN, R. G.; LUDWIG, B. Pathways of nitrogen utilization by soil microorganisms: a review. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 42, p. 2058-2067, 2010.
- GORLACH-LIRA, K.; COUTINHO, H. D. M. Population dynamics and extracellular enzymes activity of mesophilic and thermophilic bacteria isolated from semi-arid soil of northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 1-7, 2007.
- GUNDI, V. A. K. B.; VISWANATH, B.; CHANDRA, M. S.; KUMAR, V. N.; REDDY, B. R. Activities of cellulase and amylase in soils as influenced by insecticide interactions. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 68, p. 278-285, 2007.
- GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1599-1616, 2003a.
- GUPTA, R.; RATHI, P.; GUPTA, N.; BRADDOO, S. Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 37, p. 63-71, 2003b.
- GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 763-781, 2004.
- GYANESHWAR, P.; KUMAR, G. N.; PAREKH, L. J.; POOLE, P. S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, v. 245, p. 83-93, 2002.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMMED, A. Methods for detection and characterization of lipases: a comprehensive review. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 782-798, 2009.
- JEFFERY, S.; GARDI, C.; JONES, A.; MONTANARELLA, L.; MARMO, L.; MIKO, L.; RITZ, K.; PERES, G.; RÖMBKE, J.; VAN DER PUTTEN, W. H. (Eds.). **European atlas of soil biodiversity.** Luxemburg: Publications Office of the European Union, 2010. 176 p.
- JURBURG, S. D.; SALLES, J. F. Functional redundancy and ecosystem function – The soil microbiota as a case study. In: LO, Y. H.; BLANCO, J. A.; ROY, S. **Biodiversity in ecosystems – linking structure and function.** Rijeka: Intech, 2015. 658 p.
- KAMIMURA, Y.; HAYANO, K. Properties of protease extracted from tea-field soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 30, p. 351-355, 2000.
- KASANA, R. C.; SALWAN, R.; YADAV, S. K. Microbial proteases: detection, production, and genetic improvement. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 37, p. 262-276, 2011.
- KASANA, R. C.; SALWAN, R.; DHAR, H.; DUTT, S.; GULATI, A. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. **Current Microbiology**, v. 57, p. 503-507, 2008.

KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; WANI, P. A. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture – A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 27, p. 29-43, 2007.

KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; SINGH, A. Microbial cellulases and their industrial applications. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1-10, 2011.

LEITE, M. C. B. S.; FARIAS, A. R. B. de.; FREIRE, F. J.; ANDREOTE, F. D.; KUKLINSKY-SOBRAL, J.; FREIRE, M. B. G. S. Isolation, bioprospecting and diversity of salt-tolerant bacteria associated with sugarcane in soils of Pernambuco, Brazil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, (suplemento), p. 73-79, 2014.

LIMA, R. A.; VELHO, L. M. L. S.; FARIA, L. I. L. Indicadores bibliométricos de cooperação científica internacional em bioprospecção. **Perspectivas em Ciência da Informação**, v. 12, p. 50-64, 2007.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p. 506-577, 2002.

LOPES, D. B.; FRAGA, L. P.; FLEURI, L. F.; MACEDO, G. A. Lipase and esterase - to what extent can this classification be applied accurately?. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 3, p. 608-613, 2011.

MADAIL, J. C. M.; ANTUNES, L. E.; BELARMINO, L. C.; SILVA, B. A. da; GARDIN, J. A. Avaliação econômica dos sistemas de produção de morango: convencional, integrado e orgânico. Pelotas, RS: Embrapa, 2007. 4 p., **Comunicado Técnico**, nº 181.

MAKI, M.; LEUNG, K. T.; QIN, W. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. **International Journal of Biological Sciences**, v. 5, p. 500-516, 2009.

MAKOI, J. H. J. R.; NDAKIDEMI, P. A. Selected soil enzymes: Examples of their potential roles in the ecosystem. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 181-191, 2008.

MANFIO, G. P. Avaliação do estado atual do conhecimento sobre a diversidade microbiana no Brasil. In: LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P. I. (Org.). **Biodiversidade brasileira: síntese do estado atual do conhecimento**. 1 ed. São Paulo, SP: Contexto, 2002, p. 151-153.

MANHÃES, C. M. C.; FRANCELINO, F. M. A. Biota do solo e suas relações ecológicas com o sistema radicular. **Nucleus**, v. 10, p. 127-137, 2013.

MARQUES, L. G. A.; SANTOS, M. R. M. C.; RAFFO, J.; PESSOA, C. Redes de bioprospecção no Brasil: cooperação para o desenvolvimento tecnológico. **Revista de Desenvolvimento Econômico**, v. 15, p. 164-172, 2013.

MARIANI, C. M.; HENKES, J. A. Agricultura orgânica x agricultura convencional: soluções para minimizar o uso de insumos industrializados. **Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental**, v. 3, n. 2, p. 315-338, 2015.

MARTINS, S. R. O.; ABREU, J. O.; SANTOS, D. R. dos.; CARVALHO, F. C. T. de.; VIEIRA, R. H. S. F.; SOUSA, O. V. de.; REBOUÇAS, R. H. Atividade proteolítica em bactérias isoladas do solo da caatinga. **Revista de Biotecnologia & Ciência**, v. 5, n. 1, 2016.

- MATOS, E. R.; DURRER, A.; ANDREOTE, F. D. Ecologia microbiana. 2016. **In:** CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do solo**. 2 ed. Piracicaba: ESALQ, 2016. 221 p.
- MAY, S. W.; PADGETTE, S. R. Oxidoreductase enzymes in biotechnology: current status and future potential. **Nature Biotechnology**, v. 1, p. 677-686, 1983.
- MELLONI, R. Quantificação microbiana da qualidade do solo. 2007. **In:** SILVEIRA, A. P. D. da; FREITAS, S. S. **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2007. 312 p.
- MENEZES, C. R.; BARRETO, A. R. Biodegradação de carboximetilcelulose utilizando fungo *Pleurotus*: produção de oligossacarídeos e açúcares fermentescíveis para a indústria de etanol. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 19, p. 1303-1307, 2015.
- MENDES, I. C.; REIS JUNIOR, F. B. **Microrganismos e disponibilidade de fósforo (P) nos solos**: uma análise crítica. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2003. 26 p.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2 ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.
- MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista Processos Químicos**, v. 3, n. 5, p. 9-23, 2009.
- MÜLLER, D. H.; CAMPOS, D. T. S.; GRUIMARÕES, S. L. Comunidade microbiana total e fungos micorrízicos arbusculares em solos sob cultivo de amendoim (*Arachis hypogaeae* L.). **Global Science and Technology**, v. 3, n. 3, p. 1-12, 2010.
- NAHAS, E.; DELFINO, J. H.; ASSIS, L. C. Atividade microbiana e propriedades bioquímicas do solo resultantes da aplicação de gesso agrícola na cultura do repolho. **Scientia Agricola**, v. 54, n. 3, p. 160-166, 1997.
- NANNIPIERI, P.; ASCHER, J.; CECCHERINI, M. T.; LANDI, L.; PIETRAMELLARA, G.; RENELLA, G. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, v. 54, p. 655-670, 2003.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: Principles of biochemistry**. New York, 4 ed. 2005. p. 1119.
- NOGUEIRA, M. A.; CARDOSO, E. J. B. N. Interações microbianas na disponibilidade e absorção de manganês por soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 11, p. 1605-1612, 2002.
- OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.
- OLIVEIRA, A. N. de; OLIVEIRA, L. A. de; ANDRADE, J. S.; JÚNIOR, A. F. C. Atividade enzimática de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central crescendo em diferentes níveis de acidez. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 204-210, 2006a.
- OLIVEIRA, A. N. de; OLIVEIRA, L. A. de; ANDRADE, J. S.; JÚNIOR, A. F. C. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 853-860, 2006b.

OLIVEIRA, C. T. de.; PEREIRA, J. Q.; BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J. Prospecting soil bactéria from subtropical Brazil for hydrolases production. **Biologia**, v. 72, p. 130-139, 2017.

OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L. D.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F. Preservação e Prospecção de Recursos Microbianos. **Multiciência**, v. 7, p. 1-19, 2006.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J.A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **Revista Saúde e Tecnologia**, v. 7, n. 3, p. 97-109, 2012.

PALHA, M. G. A planta do morangueiro. In: PALHA, M. G. (coord.). **Manual do Morangueiro**. Projecto PO AGRO DE&D nº 193: Tecnologias de produção integrada no morangueiro visando a expansão da cultura e a reconquista do mercado, 2005, p. 3-12.

PEDRINHO, E. A. N.; JÚNIOR, R. F. G.; CAMPANHARO, J. C.; ALVES, L. M. C.; LEMOS, E. G. M. Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho. **Bragantia**, v. 69, n. 4, p. 905-911, 2010.

PENSINI, E.; YIP, C. M.; O'CARROLL, D.; SLEEP, B. E. Carboxymethyl cellulose binding to mineral substrates: Characterization by atomic force microscopy-based force spectroscopy and quartz-crystal microbalance with dissipation monitoring. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 402, p. 58-67, 2013.

PREVIATI, R.; SILVA, J. R. R. da.; SOUZA, C. R. de.; JANKE, L. Isolamento e quantificação das populações de bactérias geral e de actinomicetes presentes no solo. **Arquivos de Ciência Veterinária e Zoologia da UNIPAR**, v. 15, n. 2, p. 155-160, 2012.

QUEIROZ-VOLTAN, R. B.; JUNG-MENDAÇOLLI, S. L.; PASSOS, F. A.; SANTOS, R. R. dos. Caracterização botânica de cultivares de morangueiro. **Bragantia**, v. 55, n. 1, p. 29-44; 1996.

RAMOS, M. L. G.; MENEGHIN, M. F. S.; PEDROSO, C.; GUIMARÃES, C. M.; KONRAD, M. L. F. Efeito dos sistemas de manejo e plantio sobre a densidade de grupos funcionais de microrganismos, em solo de Cerrado. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 1, p. 58-68, 2012.

RAMOS, R. F.; SOBUCKI, L.; DAROIT, D. J. Contagem de bactérias heterotróficas em um Latossolo Vermelho cultivado com milho. In: **Anais do V Seminário de Ensino, Pesquisa e Extensão - SEPE**. Chapecó: UFFS, 2015.

RAMOS, R. F.; DAROIT, D. J. Produção de hidrolases e solubilização de fosfato por bactérias rizosféricas. 2016. In: **Anais da VI Jornada de Iniciação Científica e Tecnológica: Ciência e Tecnologia Transformando Sociedade**. Chapecó: UFFS, 2016.

REISSER JUNIOR, C.; ANTUNES, L. E. C.; ALDRIGH, M.; VIGNOLO, G. Panorama do cultivo de morangos no Brasil. **Revista Campo & Negócios**, v. 8, p. 58-59, 2014.

RIBEIRO, B. D.; CASTRO, A. M. de.; COELHO, M. A. Z.; FREIRE, M. G. Production and use lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. **Enzyme Research**, v. 2011, article 615803, 16 pp., 2011.

RIFFEL, A.; BRANDELLI, A. Keratinolytic bactéria isolated from feather waste. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 395-399, 2006.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology advances**, v. 17, p. 319-339, 1999.

ROMAGNOLI, E. M.; ANDREOTE, F. D. Rizosfera. 2016. In: CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do solo**. 2 ed. Piracicaba, SP: ESALQ, 2016. 221 p.

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

SANOMIYA, L. T.; NAHAS, E. Microrganismos produtores de hidrolases envolvidos nas transformações dos compostos do carbono e do nitrogênio no solo. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 835-842, 2003.

SANTOS, E. O.; MARTINS, M. L. L. Effect of the medium composition on formation of amylase by *Bacillus* sp. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, p. 129-134, 2003.

SANTOS, H. G. dos; JACOMINE, P. K. T.; ANJOS, L. H. C. dos; OLIVEIRA, V. A. de; LUMBRERAS, J. F.; COELHO, M. R.; ALMEIDA, J. A. de; CUNHA, T. J. F.; OLIVEIRA, J. B. de. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 3 ed. Brasília, DF: Embrapa, 2013. 353 p.

SANTOS, A. P. A.; BATISTA, S. B. Isolamento e caracterização fenotípica de micro-organismos isolados de solo poluído por resíduos sólidos do bairro Carrapicho município de Várzea Grande – Mato Grosso. **Connection Line**, v. 12, p. 29-43, 2015.

SHAN, Q.; YU, Y.; YU, J.; ZHANG, J. Soil enzymes activities and their indication for fertility of urban forest soil. **Frontiers of Environmental Science & Engineering in China**, v. 2, p. 218-223, 2008.

SHARMA, S. B.; SAYYED, R. Z.; TRIVEDI, M. H.; GOBI, T. A. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **SpringerPlus** v. 2, article 587, p. 1-14, 2013.

SILVA JUNIOR, P. B. da.; SOUZA, P. de.; SOUZA, R. M. de.; LUNKES, R. J. Estudo comparativo entre agricultura orgânica e convencional no cultivo de morango em Rancho Queimado (SC). **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 5, n. 1, p. 115-128, 2014.

SILVA, M. D.; KUKLINSKY-SOBRA, J.; BADJI, C. A.; FREIRE, F. J.; SILVA, M. O.; FARIAS, A. R. B.; CADETE, L. L.; GALLESE, E.; VIANA, H. Produção de amilase por bactérias do solo e associadas a plantas de couve-flor. In: **IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRPE**, 2009.

SILVA, A. C. S. da.; JUNIOR, A. F. C.; OLIVEIRA, L. A. de.; CHAGAS, L. F. B. Ocorrência de bactérias solubilizadoras de fosfato nas raízes de plantas de importância econômica em Manaus e Rio Preto da Eva, Amazonas. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, n. 1, p. 37-42, 2011.

SILVA, A. N.; SILVA, A. P.; BATISTA, S. B.; HARDOIM, E. L. Análise quali-quantitativa de bactérias com atividades enzimáticas celulolíticas e proteolíticas isoladas de solo adicionado de vinhaça. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 12, p. 17-27, 2012.

SILVA, M. C. S.; MOREIRA, B. C.; BAZZOLLI, D. M. S.; KASUYA, C. M. Fronteiras da microbiologia do solo. **Boletim Informativo da Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, v. 40, n. 2, p.31-35, 2015a.

SILVA, V. M. A.; BRITO, F. A. E. de; RAMOS, K. A.; SILVA, R. M. da.; MARTINS, C. M.; MARTINS, S. C. S. Atividade enzimática de actinobactérias do semiárido. **Revista Brasileira de Geografia e Física**, v. 08, n. (especial), p. 560-572, 2015b.

SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; GRISI, B. M.; HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. **Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental**. Brasília, DF: Embrapa, 1994. 142 p.

SOUCHIE, E. L.; ABBOD, A. C. S. Solubilização de fosfato por microrganismos rizosféricos de genótipos de Guandu cultivados em diferentes classes de solo. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, p. 11-18, 2007.

SOARES, I. A.; FLORES, A. C.; ZANETTIN, L.; PIN, H. K.; MENDONÇA, M. M.; BARCELOS, R. P.; TREVISOL, L. R.; CARVALHO, R. D.; SCHAUREN, D.; ROCHA, C. L. M. S. C.; BARONI, S. Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentosso *Aspergillus nidulans*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 700-705, 2010.

SOUZA, P. M. de.; MAGALHÃES, P. O. Application of microbial α -amylase in industry: a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 850-861, 2010.

SOUZA, A. F.; HAAG, H. P.; OLIVEIRA, G. D. de.; ARRUGE, J. R. S.; MINAMI, K. Absorção de micronutrientes por quatro cultivares de morangueiro (*Fragaria* sp.). **Anais da E. S. A. Luiz de Queiroz**, v. 34, p. 79-109, 1977.

STIEVEN, A. C.; CAMPOS, D. T. S.; MALHEIROS, C. H.; SILVA, M. B. R. C.; FERREIRA, M. A. F.; OLIVEIRA, E. F.; NETO, N. E. População e biomassa microbiana em solo do Pantanal Matogrossense. **Revista Biodiversidade**, v. 8, p. 22-30, 2009.

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

TEIXEIRA, M. A.; VIEIRA, R. F. Indicadores de qualidade do solo em áreas cultivadas com morango e submetidas a diferentes práticas de manejo do solo. 2008. In: **Anais: 28º Reunião brasileira de fertilidade do solo e nutrição de plantas**. Londrina: Embrapa soja: SBCS: IAPAR, UEL, 2008.

TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D. de.; MAZUTTI, M. A.; LUCCIO, M. D.; OLIVEIRA, J. V. A review on microbial lipases production. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, p. 182-196, 2010.

TURETTA, A. P. D.; CASTRO, S. S. de.; POLIDORO, J. C. Solos, sustentabilidade e provisão de serviços ecossistêmicos. **Boletim Informativo Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, v. 43, n. 2, p. 26-30, 2017.

TURNBULL, A. L.; CAMPBELL, I.; LAZAROVITS, G. Resistance of bacterial communities in the potato rhizosphere to disturbance and its application to agroecology. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 79, p. 125-131, 2014.

TURNBULL, A. L.; LIU, Y.; LAZAROVITS, G. Isolation of bacteria from the rhizosphere and rhizoplane of potato (*Solanum tuberosum*) grown in two distinct soils using semi selective media and characterization of their biological properties. **American Journal of Potato Research**, v. 89, p. 294-305, 2012.

TURK, B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, p. 785-799, 2006.

WILSON, E. O. **Diversidade da vida**. São Paulo: Companhia das Letras, 2012. 525 p.

WILLERDING, A. L.; OLIVEIRA, L. A. de; MOREIRA, F. W.; GERMANO, M. G.; CHAGAS Jr., A. F. Lipase activity among bacteria isolated from amazonian soils. **Enzyme Research**, v. 2011, article 720194, 5 pp., 2011.

VRANOVA, V.; REJSEK, K.; FORMANEK, P. Proteolytic activity in soil: A review. **Applied Soil Ecology**, v. 70, p. 23-32, 2013.

ZAIDI, A.; KHAN, S.; AHMED, M.; OVES, M. Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 56, p. 263-284, 2009.

ZHANG, Y. L.; CHEN, L. J.; SUN, C. X.; WU, Z. J.; CHEN, Z. H.; DONG, G. H. Soil hydrolase activities and kinetic properties as affected by wheat cropping systems of Northeastern China. **Plant, Soil and Environment**, v. 56, n. 11, p. 526-532, 2010.

ZHANG, Y. L.; SUN, C. X.; CHEN, L. J.; DUANI, Z. H. Catalytic potential of soil hydrolases in northeast China under different soil moisture conditions. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 9, n. 2, p. 116-124, 2009.