



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA - PPGBIOTEC

MATHEUS MONTEFUSCO DE OLIVEIRA

**RIZOBACTÉRIAS AMAZÔNICAS PRODUTORAS DE CELULASES: POTENCIAL
PARA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA INDIVIDUAL E EM CONSÓRCIOS**

Manaus, AM

2026

MATHEUS MONTEFUSCO DE OLIVEIRA

**RIZOBACTÉRIAS AMAZÔNICAS PRODUTORAS DE CELULASES: POTENCIAL
PARA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA INDIVIDUAL E EM CONSÓRCIOS**

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas como parte das exigências para obtenção do título de Doutor.

Orientador: PhD. Luiz Antonio de Oliveira

MANAUS

Março – 2026

Ficha Catalográfica

Elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

O48r Oliveira, Matheus Montefusco de
Rizobactérias amazônicas produtoras de celulasas: potencial para
produção enzimática individual e em consórcios / Matheus Montefusco de
Oliveira. - 2026.
117 f. : il., color. ; 31 cm.

Orientador(a): Luiz Antonio de Oliveira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Amazonas, Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia, Manaus, 2026.

1. Rizobactéria. 2. Amazônia. 3. Celulose. 4. Celulasas. 5. Hidrólise. I.
Oliveira, Luiz Antonio de. II. Universidade Federal do Amazonas.
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título

MATHEUS MONTEFUSCO DE OLIVEIRA

**RIZOBACTÉRIAS AMAZÔNICAS PRODUTORAS DE CELULASES: POTENCIAL
PARA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA INDIVIDUAL E EM CONSÓRCIOS**

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas como parte das exigências para obtenção do título de Doutor.

Aprovado em 03 de março de 2026.

BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Dr(a). Luiz Antonio de Oliveira
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Prof(a). Dr(a). Edson Junior do Carmo
Universidade Federal do Amazonas

Prof(a). Dr(a). Francisco Augusto da Silva Ferreira
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Prof(a). Dr(a). Rosemary Aparecida Roque
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Prof(a). Dr(a). Tatiana de Oliveira Ramos
Centro Universitário Estácio do Amazonas

Querido filho,

Dedico esta tese a você, meu maior orgulho e fonte constante de inspiração. Que cada passo da sua vida seja repleto de aprendizado, descobertas e coragem. Sonhe grande, acredite em si mesmo e nunca deixe de buscar aquilo que realmente deseja. Com todo o meu amor, deixo esta dedicatória como lembrança de que acredito em você, sempre.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela oportunidade concedida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela bolsa de doutorado concedida.

Agradeço ao PhD. Luiz Antonio de Oliveira pela confiança depositada em minha pessoa para a realização deste trabalho de doutorado e pela sua orientação nesses anos.

Em especial, à minha Esposa Luciana Belmont, por todo apoio nessa jornada. Muito obrigado por ter me apoiado quando precisei, sendo fundamental nas horas difíceis.

Aos meus pais Cleonice Montefusco Paulino e Francisco Alves de Oliveira por todo carinho, sem o apoio deles não teria as oportunidades que tive. Eles foram fundamentais na minha formação, no desenvolvimento desse trabalho e sou eternamente grato por tudo que fizeram por mim.

Aos Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Microrganismos da Amazônia - LEBMAM / INPA III, Laboratório de Biologia Molecular – UFAM-ICB 2 e Laboratório Multiusuário do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/Fiocruz Amazônia), por cederem espaço, equipamentos e reagentes.

À Dra. Cristiane Krug e Dra. Flávia Batista Gomes da EMBRAPA Amazonia Ocidental, por todos os conselhos e amizade ao longo de todos esses anos.

Agradeço sinceramente a todos aqueles que direta e indiretamente colaboraram para minha formação e para a realização desta pesquisa.

RESUMO

A rizosfera representa um ambiente altamente complexo e biologicamente ativo, no qual interações entre plantas hospedeiras e microrganismos do solo exercem papel na decomposição da matéria orgânica e na manutenção da fertilidade do solo. Dentre esses processos, a degradação da celulose destaca-se por sua relevância ecológica e biotecnológica, uma vez que esse polímero constitui o principal componente estrutural da biomassa vegetal. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial celulolítico de rizobactérias amazônicas associadas às plantas *Pueraria phaseoloides* e *Inga edulis*, investigar a influência da planta hospedeira na seleção funcional desses microrganismos e analisar a produção de enzimas celulolíticas em sistemas de monocultivo e co-cultivo. Os isolados bacterianos foram inicialmente reativados e submetidos à triagem qualitativa em meio contendo carboximetilcelulose (CMC), com determinação do índice enzimático (IE) como critério de seleção. Observou-se expressiva heterogeneidade entre os isolados, com predominância de rizobactérias apresentando IE igual ou superior a 2,0, indicativo de elevado potencial biotecnológico. A análise comparativa entre as plantas hospedeiras revelou influência significativa da identidade vegetal sobre o potencial celulolítico, com isolados provenientes de *P. phaseoloides* com valores médios de IE superiores aos observados para *I. edulis*. Os isolados com maiores índices enzimáticos foram caracterizados morfológicamente, submetidos à coloração de Gram e identificados por meio de análise molecular. Os resultados indicaram predominância de espécies pertencentes ao gênero *Bacillus*, com destaque para *Bacillus* sp. 1, *Bacillus* sp. 2 e *Bacillus* sp. 3. Com base nesses critérios, linhagens selecionadas foram utilizadas para avaliação da produção de celulasas totais (FPase), endoglucanases (CMCase) e β -glicosidases. Os ensaios enzimáticos demonstraram que, embora os cultivos individuais apresentem capacidade limitada e instável de produção de celulasas, os sistemas de co-cultivo promoveram aumentos expressivos na intensidade e na estabilidade da atividade enzimática. O co-cultivo triplo composto por *Bacillus* sp. 1 (INPA R-583), *Bacillus* sp. 2 (INPA R-774) e *Bacillus* sp. 3 (INPA R-762) destacou-se como o arranjo mais eficiente, evidenciando interações sinérgicas e complementaridade funcional entre as linhagens bacterianas. A utilização estratégica de consórcios bacterianos do gênero *Bacillus* mostra-se uma abordagem eficiente para a intensificação e estabilização da produção de enzimas celulolíticas, contribuindo para o avanço do conhecimento sobre a ecologia funcional da rizosfera e oferecendo subsídios para o desenvolvimento de processos de degradação da biomassa lignocelulósica.

PALAVRAS-CHAVE: Rizobactéria; Amazônia; Celulose; Celulasas; Hidrólise

ABSTRACT

The rhizosphere represents a highly complex and biologically active environment in which interactions between host plants and soil microorganisms play a central role in the decomposition of organic matter and the maintenance of soil fertility. Among these processes, cellulose degradation stands out for its ecological and biotechnological relevance, as this polymer constitutes the main structural component of plant biomass. In this context, the present study aimed to evaluate the cellulolytic potential of Amazonian rhizobacteria associated with *Pueraria phaseoloides* and *Inga edulis*, to investigate the influence of the host plant on the functional selection of these microorganisms, and to analyze the production of cellulolytic enzymes under monoculture and co-culture systems. Bacterial isolates were initially reactivated and subjected to qualitative screening on carboxymethylcellulose (CMC) medium, with the enzymatic index (EI) used as a selection criterion. A marked heterogeneity among isolates was observed, with a predominance of rhizobacteria exhibiting EI values equal to or greater than 2.0, indicative of high biotechnological potential. Comparative analysis between host plants revealed a significant influence of plant identity on cellulolytic potential, with isolates from *P. phaseoloides* showing higher mean EI values than those from *I. edulis*. Isolates with the highest enzymatic indices were morphologically characterized, subjected to Gram staining, and identified through molecular analysis. The results indicated a predominance of species belonging to the genus *Bacillus*, particularly *Bacillus* sp. 1, *Bacillus* sp. 2 and *Bacillus* sp. 3. Based on these criteria, selected strains were further evaluated for the production of total cellulases (FPase), endoglucanases (CMCase), and β -glucosidases. Enzymatic assays demonstrated that, although individual cultures exhibited limited and unstable cellulase production, co-culture systems promoted substantial increases in both the intensity and stability of enzymatic activity. The triple co-culture composed of *Bacillus* sp. 1 (INPA R-583), *Bacillus* sp. 2 (INPA R-774) and *Bacillus* sp. 3 (INPA R-762) emerged as the most efficient arrangement, evidencing synergistic interactions and functional complementarity among bacterial strains. The strategic use of *Bacillus*-based bacterial consortia represents an effective approach to enhance and stabilize cellulolytic enzyme production, contributing to advances in the understanding of rhizosphere functional ecology and providing a foundation for the development of lignocellulosic biomass degradation processes.

Keywords: Rhizobacteria; Amazon; Cellulose; Cellulases; Hydrolysis

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Figura 1. Estrutura da parede celular vegetal e estrutura lignocelulósica da biomassa vegetal. Fonte: Adaptado de US DOE (2005).....24
- Figura 2** - Figura 2. Modelo simplificado de ação das celulasas sobre a cadeia da celulose. Região cristalina representada pelas linhas retas e região amorfa representada pelas linhas onduladas. Fonte: Adaptado de Arantes e Sadler (2010).....25
- Figura 3** - Esquemas de (a) uma cadeia de celulose. (b) microfibrilas de celulosas que representam as disposição de regiões cristalinas e amorfas. (c) e nanocristais de celulose após hidrólise ácida. Fonte: adaptado de Reddy et al. (2013). 27
- Figura 4** - Mecanismo de ação das celulasas em seus locais de atuação. Fonte: Santana, (2010).....44
- Figura 5**- Rizobactérias reativadas em meio com CMC. A – Revelação dos halos de hidrólise com o corante vermelho Congo; B – Placa com repetições de bactérias coradas.....25
- Figura 6** – Figura 6. Curva padrão de glicose e equação da reta utilizada nos ensaios de FPase e CMCase.....49
- Figura 7** - Placas de Petri contendo meio com CMC como principal fonte de carbono para avaliação da degradação de celulose. A zona clara ao redor das colônias corresponde ao halo de degradação das respectivas rizobactérias avaliadas: A. INPA-R583; B. INPA-R314; C. INPA-R 779; D. INPA-R774; E. INPA-R762 e F. CONTROLE (INPA-R302).....53
- Figura 8** - A coloração de Gram das rizobactérias com maiores IE para produção de celulase, sendo possível observar tipos morfológicos e arranjos: A. INPA-R583; B. INPA-R314; C.

INPA-R 779; D. INPA-R774; E. INPA-R762 e F. INPA-R302; G. INPA-R1001; H. INPA-R178; I. INPA-R741.....62

Figura 9 - Extração de DNA das rizobactérias com maiores IE para a produção de celulases. As amostras de DNA (5 µL de cada) foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 0,5% e estão distribuídas nos poços do gel na seguinte ordem numérica: 2. INPA-R302 (Controle); 4. INPA-R314; 6. INPA-R762; 8. INPA-R583; 10. INPA-R583B; 12. INPA-R774 e 13. INPA-R 779.....63

Figura 10 - Atividade da enzima Fpase (U/mL) produzida por *Bacillus* sp. 1 (INPA R-583), *Bacillus* sp. 2 (INPA R-774), *Bacillus* sp. 3 (INPA R-762) e *Bacillus* sp. 4 (INPA R-302, controle) em cultivos individuais, ao longo de 240 h de fermentação. Os valores correspondem à média ± desvio-padrão (DP) de três repetições independentes (n = 3). 67

Figura 11 - Atividade da enzima Fpase (U/mL) produzida em diferentes sistemas de co-cultivo de *Bacillus* sp. 1 (INPA R-583), *Bacillus* sp. 2 (INPA R-774), *Bacillus* sp. 3 (INPA R-762) e *Bacillus* sp. 4 (INPA R-302, controle), avaliados ao longo de 240 h de fermentação. Os valores correspondem à média ± desvio-padrão (DP) de três repetições independentes (n = 3). 68

Figura 12 - Atividade da enzima CMCase (U/mL) produzida por *Bacillus* sp. 1 (INPA R-583), *Bacillus* sp. 2 (INPA R-774), *Bacillus* sp. 3 (INPA R-762) e *Bacillus* sp. 4 (INPA R-302, controle) em cultivos individuais, ao longo de 240 h de fermentação. Os valores correspondem à média ± desvio-padrão (DP) de três repetições independentes (n = 3). 69

Figura 13 - Atividade da enzima CMCase (U/mL) produzida em diferentes sistemas de co-cultivo de *Bacillus* sp. 1 (INPA R-583), *Bacillus* sp. 2 (INPA R-774), *Bacillus* sp. 3 (INPA R-762) e *Bacillus* sp. 4 (INPA R-302, controle), avaliados ao longo de 240 h de fermentação. Os valores correspondem à média ± desvio-padrão (DP) de três repetições independentes (n = 3). 71

Figura 14 - Atividade da enzima β -glicosidase (U/mL) produzida por *Bacillus* sp. 1 (INPA R-583), *Bacillus* sp. 2 (INPA R-774), *Bacillus* sp. 3 (INPA R-762) e *Bacillus* sp. 4 (INPA R-302, controle) em cultivos individuais, ao longo de 240 h de fermentação. Os valores correspondem à média $\pm$ desvio-padrão (DP) de três repetições independentes (n = 3). 72

Figura 15 - Atividade da enzima β -glicosidase (U/mL) produzida em diferentes sistemas de co-cultivo de *Bacillus* sp. 1 (INPA R-583), *Bacillus* sp. 2 (INPA R-774), *Bacillus* sp. 3 (INPA R-762) e *Bacillus* sp. 4 (INPA R-302, controle), avaliados ao longo de 240 h de fermentação. Os valores correspondem à média $\pm$ desvio-padrão (DP) de três repetições independentes (n = 3). 73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies de bactérias produtoras de enzimas celulolíticas.....	30
Tabela 2 - Rizobactérias reativadas, seus respectivos locais de coleta e plantas associadas, sendo coletadas e isoladas em estudos anteriores intuito de identificar bactérias com atividade hidrolítica.....	39
Tabela 3 - Meio de Cultura Yeast Manitol Ágar – YMA (Adaptado).....	43
Tabela 4 - Atividade celulolítica de rizobactérias e suas respectivas plantas hospedeiras, cultivadas em meio sintético com carboximetilcelulose (CMC) por 4 dias a 28 °C. I.E. = índice enzimático; dh – diâmetro do halo/dc- diâmetro da colônia. O índice enzimático foi calculado para cada repetição do teste.....	55
Tabela 5 - Rizobactérias celulolíticas isoladas de <i>Pueraria phaseoloides</i> e <i>Inga edulis</i> na região central da Amazônia brasileira. *IE = índice enzimático (média $\pm$ DP, n = 3).....	59
Tabela 6 - Amostras de DNA quantificadas em equipamento Nanodrop. das 6 rizobactérias com maiores IE.....	64
Tabela 7 - Identificação molecular dos isolados que apresentaram índice enzimático $\geq 2,0$ após crescimento em meio sintético contendo carboximetilcelulose. IE = índice enzimático (média $\pm$ DP, n = 3); (*) = porcentagem de similaridade entre nossas sequências e aquelas disponíveis nos bancos de dados NCBI e UNITE.....	65

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

°C	graus Celcius
mM	Milimolar
M	Molar
nm	Nanômetro
µL	Microlitro
µg/mL	Microlitro por mililitro
B	Letra grega beta
β-glicosidase	Enzima beta-glicosidase
YMA	Yeast Manitol Agar
CMC	Carboximetilcelulose
CMCase	Carboximetilcelulase (endoglucanase)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EI	Índice enzimático
FPase	Atividade de celulases totais (Filter Paper Assay)
G	Grama
Gram (+)	Bactéria Gram-positiva
Gram (-)	Bactéria Gram-negativa
H	Hora
IE	Índice enzimático
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
mL	Mililitro
P	Valor de significância estatística (p-valor)
sp.	Espécie não determinada
spp.	Plural de espécies
M	Prefixo micro
Mg	Micrograma

$\geq$	Maior ou igual a
$\leq$	Menor ou igual a
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
GOD	Glicose oxidadase
IE	Índice enzimático
MgCl	Cloreto de magnésio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polymerase chain reaction
rpm	Rotações por minuto

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	20
2.1. Plantas hospedeiras de microrganismos	20
2.2. Produção de enzimas por rizobactérias.....	22
2.3. Biomassa lignocelulósicas.....	23
2.4. Celulose.....	24
2.5. Celulases	27
2.6. Produção de celulase de interesse biotecnológico.....	28
2.7. Rizobacterias produtoras de celulases.....	31
2.8. Consorcios de microrganismo para a produção de celulases.....	34
3. JUSTIFICATIVA.....	36
4. OBJETIVOS.....	38
4.1. Objetivo geral.....	38
4.2. Objetivos específicos.....	38
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
5.1. Seleção e reativação de microorganismos.....	39
5.2. Avaliação da produção de enzimas celulolíticas das rizobáctérias.....	43
5.3. Avaliação de plantas hospedeiras para a bioprospecção de rizobactérias com atividade celulolítica.....	44
5.4. Coloração de Gram.....	45
5.5. Análise molecular.....	46
5.6. Identificação taxonômica.....	47
5.7. Condições de cultivo, obtenção das estirpes das rizobactérias e controle.....	47
5.8. Condições de cultivo, obtenção das estirpes de controle.....	47
5.9. Preparação da curva padrão.....	48
5.10. Determinação de Atividade de celulases totais – Fpase.....	50
5.11. Determinação de Atividade endoglucanásica – CMCase.....	51
5.12. Determinação de atividade β -glicosidase.....	52
5.13. Análise de dados.....	52
6. RESULTADOS.....	53

6.1. Avaliação da produção de enzimas celulolíticas das rizobactérias.....	53
6.2. Avaliação de plantas hospedeiras para a bioprospecção de rizobactérias com atividade celulolítica.....	58
6.3. Coloração de Gram.....	61
6.4. Análise molecular.....	63
6.5. Taxonomia.....	64
6.6. Determinação da Atividade Enzimática Celulolítica.....	66
6.6.1. Determinação da Atividade de celulasas totais – Fpase.....	66
6.6.2. Determinação de Atividade endoglucanásica – CMCase.....	69
6.6.3. Determinação de atividade β -glicosidase.....	72
7. DISCUSSÃO.....	75
7.1. Avaliação da produção de enzimas celulolíticas das rizobactérias.....	75
7.2. Avaliação de plantas hospedeiras para a bioprospecção de rizobactérias com atividade celulolítica.....	76
7.3 Identificação dos isolados.....	78
7.4. Determinação da Atividade Enzimática Celulolítica.....	80
7.4.1. Determinação da Atividade de celulasas totais – Fpase.....	81
7.4.2. Determinação de Atividade CMCase (endoglucanases).....	83
7.4.3. Determinação de atividade β -glicosidase.....	84
8. CONCLUSÕES.....	86
9. REFERÊNCIAS.....	88
APÊNDICES.....	111

1. INTRODUÇÃO

A busca por microrganismos capazes de produzir metabólitos secundários e enzimas de interesse biotecnológico se intensificou nas últimas décadas, impulsionada pela necessidade de soluções sustentáveis em bioindústria, manejo de resíduos e produção agrícola (BÉRDY, 2005; DEMAINE e FANG, 2000). Microrganismos isolados de ambientes extremos, como solos tropicais, áreas polares, sistemas marinhos e solos vulcânicos, revelaram ~~uma~~ diversidade funcional significativa, especialmente na produção de enzimas hidrolíticas específicas, como celulasas, pectinases e amilases, que desempenham papel essencial na degradação de polímeros complexos (MARTÍNEZ-ROSALES e CASTRO-SOWINSKI, 2011; SRINIVAS et al., 2011; PENG et al., 2014; ZHAO et al., 2016). As enzimas microbianas estão entre as mais importantes para aplicações industriais, com ampla utilização em setores como bioenergia, papel, celulose, têxtil, alimentos e agricultura, além de serem consideradas um componente estratégico de biorrefinaria sustentável de biomassa lignocelulósica (KIRK et al., 2002; ADRIO e DEMAINE, 2014; GUSAKOV, 2017).

A rizosfera é definida como a zona de solo diretamente influenciada pelas raízes, extremamente dinâmico e rico em interações entre plantas e microrganismos, apresentando densidade microbiana maior em relação ao solo não rizosférico devido à liberação de exsudatos radiculares que funcionam como fontes de carbono e sinais químicos para a microbiota (HILTNER, 1904; LYNCH e WHIPPS, 1990; BAIS et al., 2006). Essas comunidades microbianas participam da mineralização da matéria orgânica, ciclagem de carbono e disponibilidade de nutrientes, influenciando diretamente processos ecológicos essenciais para a saúde do solo e o crescimento das plantas (AZEVEDO et al., 2024).

As rizobactérias, especialmente aquelas associadas a leguminosas e outras plantas hospedeiras, são amplamente estudadas por sua capacidade de promover crescimento vegetal através da fixação de nitrogênio e pela produção de metabólitos orgânicos (EADY e POSTGATE, 1974; BHATTACHARYYA e JHA, 2012; GUPTA et al., 2015). Embora a fixação de nitrogênio seja um dos aspectos mais estudados dessas interações simbióticas, há uma lacuna no conhecimento acerca do perfil enzimático funcional que essas rizobactérias podem apresentar. Particularmente na produção de enzimas hidrolíticas extracelulares como as celulasas, que são essenciais para a degradação de celulose, o polímero mais abundante da biomassa vegetal. O estudo de enzimas microbianas como a celulase é relevante não apenas para o entendimento ecológico da ciclagem de carbono, mas também para diversas aplicações

industriais, como produção de bioetanol, processamento têxtil ou reciclagem de papel (KIRK et al., 2002; ADRIO e DEMAINE, 2014).

O processo de degradação da celulose depende da ação coordenada de um complexo enzimático formado por endoglucanases, celulasas totais e β -glicosidases, que atuam de maneira sinérgica na clivagem das ligações β -1,4 do polímero, resultando na liberação de glicose e oligossacarídeos solúveis (TEERI, 1997; SUN e CHENG, 2002; HORN et al., 2012). Apesar disso, grande parte das pesquisas sobre a produção enzimática em cultivos puros não considera a potencial sinergia entre linhagens bacterianas quando cultivadas em consórcio, o que representa uma lacuna metodológica relevante. Tal limitação é ainda mais significativa quando se considera que, em ambientes naturais, as interações comunitárias são determinantes para a eficiência de processos como a degradação da matéria orgânica.

Dessa forma, a identificação e caracterização de rizobactérias amazônicas com elevado potencial de produção de celulasas, bem como a análise de interações sinérgicas em co-cultivos bacterianos, representam um avanço tanto para a compreensão da ecologia funcional da rizosfera quanto para o desenvolvimento de processos biotecnológicos sustentáveis, capazes de agregar valor ao manejo de resíduos lignocelulósicos, à bioenergia e à saúde do solo (COMPANT et al., 2010). Enzimas microbianas, incluindo aquelas produzidas por rizobactérias, se destacam como fontes promissoras para aplicações em setores industriais, como alimentos e bebidas, papel e celulose, têxtil, farmacêutica e agrícola, devido à sua especificidade, eficiência catalítica e adaptabilidade a diferentes condições de processo (ADRIO e DEMAINE, 2014; KAPOOR et al., 2015).

Tradicionalmente, fungos filamentosos são amplamente utilizados como produtores de enzimas lignocelulolíticas em escala industrial, sendo *Trichoderma reesei* uma das principais fontes de celulasas comerciais devido à sua alta secreção enzimática e capacidade de indução sob diferentes substratos (VIIKARI et al., 2007). Entretanto, o uso exclusivo de fungos limita a diversidade funcional explorada, especialmente em processos que requerem consórcios enzimáticos complexos ou maior tolerância a variáveis ambientais e industriais. As enzimas celulolíticas de origem microbiana são essenciais não apenas para a produção de biocombustíveis de segunda geração, mas também para aplicações em alimentos e rações animais, processamento de bebidas e na produção de fibras têxteis modificadas (MENÉNDEZ et al., 2015; SAJITH et al., 2016).

Apesar da importância reconhecida de fungos filamentosos como produtores enzimáticos, há crescente interesse na identificação de novas espécies microbianas com potencial biotecnológico, especialmente aquelas associadas a substratos alternativos, como a

rizosfera ou a serrapilheira de florestas tropicais, ambientes ricos em rizobactérias, leveduras, fungos e outros grupos bacterianos com capacidades hidrolíticas ainda pouco exploradas (GUPTA et al., 2011; WONGPUTTISIN et al., 2014; ZHAO et al., 2016). Esses ecossistemas tropicais podem abrigar microrganismos com repertórios enzimáticos únicos, capazes de superar limitações de eficiência, estabilidade e atividade em condições industriais, abrindo novas fronteiras para aplicações biotecnológicas e valorização de biomassa lignocelulósica (COMPANT et al., 2010b; BERG e SMALLA, 2009).

O presente trabalho busca preencher lacunas de conhecimento relacionadas ao potencial biotecnológico das rizobactérias amazônicas, especialmente no que se refere à produção de enzimas celulolíticas, abordando a capacidade dessas bactérias em produzir tais enzimas. Também a identificação das espécies com maior potencial produtivo e a quantificação da produção enzimática sob condições específicas de indução, tanto em cultivos individuais quanto em consórcio.

A relevância desse estudo se baseia na compreensão aprofundada das interações entre rizobactérias e plantas, bem como na exploração do potencial biotecnológico desses microrganismos na produção de enzimas com aplicações industriais, como biocombustíveis, processamento de alimentos, rações animais, papel e celulose, e indústrias têxtil e farmacêutica (MENÉNDEZ et al., 2015; SAJITH et al., 2016). A investigação desses aspectos permitirá o desenvolvimento de estratégias sustentáveis e inovadoras na bioindústria, alinhadas às demandas contemporâneas por processos mais eficientes, econômicos e ambientalmente responsáveis (GONZÁLEZ-SISO e BECERRA, 2023; CHAKRABORTY, 2023; SANTANA et al., 2024). Dessa forma, a pesquisa não apenas expande o repertório de microrganismos com potencial industrial, mas também fortalece a base científica necessária para aplicações biotecnológicas.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Plantas hospedeiras de microrganismos

As plantas coexistem com uma enorme diversidade de microrganismos, incluindo bactérias, fungos, arqueias, vírus e protistas, formando um holobionte vegetal que influencia diretamente na nutrição, o crescimento, a tolerância a estresses e a resistência imunológica da planta (PANTIGOSO, 2022). Essas associações não são aleatórias, elas sugerem de processos ecológicos e bioquímicos complexos em que a planta funciona como um ambiente seletivo e um filtro ecológico para microrganismos específicos (BULGARELLI et al., 2013).

A rizosfera é um dos nichos microbianos mais ativos devido à intensa liberação de exsudatos radiculares, compostos por açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos, flavonoides e outras moléculas de sinalização que moldam a estrutura e a função da microbiota ao redor da raiz (HILTNER, 1904; PANTIGOSO, 2022; OLANREWAJU e BABALOLA, 2022). Os exsudatos funcionam como sinalizadores químicos que atraem microrganismos benéficos, incluindo rizobactéria e fungos micorrízicos, capazes de aumentar a disponibilidade de nutrientes e promover crescimento vegetal (PANTIGOSO, 2022; BAIS et al., 2006; OLANREWAJU e BABALOLA, 2022). A colonização microbiana também depende de fatores como espécie e genótipo da planta, idade e estágio de desenvolvimento, além de variáveis ambientais como pH, temperatura e umidade do solo (BERENDSEN et al., 2012; TRIVEDI et al., 2022).

As interações entre plantas hospedeiras e microrganismos abrangem um espectro funcional que inclui mutualismo, comensalismo e patogenicidade. No mutualismo, ambas as partes são beneficiadas; por exemplo, associações simbióticas entre leguminosas e rizóbios permitem a fixação de nitrogênio atmosférico em formas assimiláveis para a planta (BERENDSEN et al., 2012). Da mesma forma, fósforo e outros nutrientes essenciais podem ser mobilizados por microrganismos que solubilizam minerais e os tornam disponíveis para absorção pelas raízes (KUMAR et al., 2015; TRIVEDI et al., 2022). Bactérias promotoras do crescimento, como *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Azospirillum*, sintetizam fitohormônios (auxinas, citocininas, giberelinas) que modulam a divisão celular, a formação de raízes laterais e a arquitetura radicular, melhorando a absorção de água e nutrientes (HASHEM et al., 2017; OLANREWAJU e BABALOLA, 2022; GLICK, 2012; SPAEPEN, VANDERLEYDEN e REMANS, 2007; VESSEY, 2003). Outro mecanismo importante é a produção de sideróforos,

que sequestram ferro em formas disponíveis para a planta, e a síntese de enzimas como ACC desaminase, que reduz o etileno, um hormônio associado ao estresse que favorece a resistência a condições adversas (KLOEPPER et al., 1980; GLICK et al., 2007; GLICK, 2014).

O comensalismo descreve microrganismos que colonizam a planta sem efeitos imediatos óbvios no crescimento ou na saúde, mas que podem modular a composição e diversidade de espécies, dificultando a proliferação de patógenos por competição por espaço e recursos (ANDREWS, 1992; BERENDSEN et al., 2012; LEBEIS et al., 2015). Já os microrganismos patogênicos ultrapassam as defesas da planta, causando doenças que comprometem funções fisiológicas, e geralmente desencadeiam respostas imunes sistêmicas mediadas por hormônios como ácido salicílico (BERENDSEN et al., 2012; PIETERSE et al., 2014).

Mecanismos moleculares de interação entre plantas e microrganismos envolvem múltiplas vias de sinalização bidirecional. Plantas liberam compostos como flavonoides e strigolactonas que atuam como sinais químicos para microrganismos específicos, estimulando a colonização e sinergias simbióticas (OLANREWAJU e BABALOLA, 2022). Microrganismos, por sua vez, produzem padrões moleculares associados a micróbios que podem ativar respostas de tolerância e resistência nas plantas, além de moléculas voláteis que podem modular tanto o desenvolvimento vegetal quanto a expressão gênica relacionada à imunidade e ao metabolismo (BAKER et al., 2007; BOLTON, 2009; RYU et al., 2003; KANCHISWAMY et al., 2015).

Ecologicamente, essas interações favorecem a ciclagem de nutrientes e a estruturação da comunidade microbiana, impactando diretamente na saúde do solo e a produtividade de sistemas agrícolas (PANTIGOSO, 2022). A microbiota da rizosfera está associada à resistência a estresses bióticos e abióticos como seca e salinidade, indicando que microrganismos específicos desempenham papéis funcionais críticos em ambientes desafiadores (MICROBIOME, 2025; OLANREWAJU e BABALOLA, 2022).

A exploração desses mecanismos tem aplicações biotecnológicas promissoras: inoculantes microbianos ou consórcios sintéticos (SynComs) podem aumentar a tolerância das plantas a estresses ambientais, reduzir a dependência de fertilizantes químicos e promover agricultura sustentável (VAN DER HEIJDEN et al., 2008; BERENDSEN et al., 2012; VORHOLT et al., 2017; TOJU et al., 2020). A integração desses conhecimentos com práticas agronômicas representa uma das fronteiras da pesquisa moderna em microbiomas de plantas, oferecendo alternativas ecologicamente amigáveis para melhorar a produtividade e a resiliência dos

cultivos frente às mudanças climáticas e à degradação dos solos (OLANREWAJU e BABALOLA, 2022; TRIVEDI Et al., 2022).

2.2. Produção de enzimas por rizobactérias

Há diversos ambientes onde se pode isolar microrganismos produtores de metabólitos secundários com aplicações na bioindústria, sendo os solos de florestas, um ambiente propício para microrganismos mesófilos produtores de celulasas (ZHAO et al., 2016). Em ambientes marinhos, foram isoladas bactérias halófilas produtoras de lipases (PENG Q et al., 2014). Foram encontradas bactérias psicrófilas em sedimentos da Antártida, sendo capazes de produzir proteases (MARTÍNEZ-ROSALES; CASTRO-SOWINSKI, 2011). Em solos de vulcão foi possível identificar bactérias hipertermófilas produtoras de catalases (SRINIVAS et al., 2011).

Outras enzimas produzidas por microrganismos são as lipases e esterases que constituem um importante grupo de enzimas que estão associadas ao metabolismo e a hidrólise dos lipídeos (LUZ et al., 2016; LIU; KOKARE, 2017; PAMPHILE et al., 2017). Já as proteases catalisam a quebra das ligações peptídicas e participam de inúmeros processos fisiológicos com várias aplicações nas indústrias de detergente e de alimentos (NIGAM, 2013; PAMPHILE et al., 2017). As pectinases são enzimas utilizadas na indústria têxtil com diversas atuações como a degradação da pectina que recobre as fibras de celulose (MONTEIRO; SILVA, 2009). As celulasas de origem microbiana são amplamente utilizadas nas indústrias de papel, vinho, ração animal e têxtil, bem como para produção de biocombustível (GUPTA et al., 2011).

As rizobactérias são bactérias de solo associadas as raízes de plantas, sendo à maioria destas bactérias simbiontes que formam nódulos nas raízes. As bactérias *Rhizobium* spp. são isoladas no interior dos nódulos de leguminosas e são responsáveis pelo complexo nitrogenase, reduzindo o nitrogênio atmosférico em amônia utilizada pelas plantas (EADY; POSTGATE, 1974; BHATTACHARYYA e JHA, 2012; GUPTA et al., 2015). Essa interação simbiótica entre bactérias e plantas é essencial na ecologia global do nitrogênio, e de grande importância econômica no contexto agrícola (PEIX et al., 2001). Os estudos relacionados as rizobactérias são principalmente direcionados ao complexo nitrogenase, havendo poucos estudos sobre o perfil enzimático. Também há estudos voltados principalmente a atividade hidrolítica de enzimas produzidas por rizóbios no processo de infecção radicular de leguminosas (HUBBELL, et al., 1978; MARTINEZ-MOLINA et al., 1979; MORALES et al., 1984; LÓPEZ et al., 1987; SALEH-RASTIN et al., 1991; JIMENEZ-ZURDO et al., 1996).

Dessa forma, se torna interessante pesquisas sobre microrganismos com capacidades de quebrar e modificar substratos específicos, sendo muitas ainda não descritas, acabam por ser objetos perfeitos para o estudo de novas enzimas (LACAVA e AZEVEDO, 2013; GUPTA et al., 2015). As principais enzimas hidrolíticas produzidas por microrganismos são as amilases, celulasas, lipases, esterases, pectinases e proteases (MONTEIRO e SILVA, 2009; CASTRO et al., 2014; SILVA, 2015). Essas enzimas podem ser produzidas por microrganismos nas células vegetas, como, por exemplo, as amilases que degradam o amido, um polímero de glicose que é utilizado como fonte de energia para seu metabolismo (ARAÚJO e MARTINS, 2018).

Embora a eficiência de rizobactérias na fixação de nitrogênio nas interações simbióticas com plantas leguminosas seja bem conhecida, recentemente foi relatado que cepas pertencentes ao gênero *Rhizobium* também são excelentes promotoras de crescimento de plantas não leguminosas (GARCÍA-FRAILE et. al., 2012; FLORES-FELIX et al., 2013; OSÓRIO FILHO et al., 2014). Essas bactérias podem beneficiar diretamente o crescimento das plantas fornecendo nutrientes e hormônios vegetais, e indiretamente por meio da produção de enzimas hidrolíticas, como a celulasas (COMPANT et al., 2005; DODD et al., 2010; GLICK, 2012; GAIERO et al., 2013; AHMAD e KIBRET, 2014).

Esse processo de colonização da superfície radicular e formação dos nódulos são considerados etapas-chave em uma relação simbiótica eficaz (ROBLEDO et al., 2012). A colonização radicular por rizóbios envolve a formação de biofilme (NAPOLI et al., 1975; DAVEY e O'TOOLE, 2000; FUJISHIGE et al., 2006). Essas estruturas são formadas, principalmente, por microfibrilas de celulose que auxiliam a fixação das bactérias às raízes da planta hospedeira (DAZZO et al., 1984; MATEOS et al., 1995). Todas as cepas de *Rhizobium* spp. produzem celulasas (ROBLEDO et al., 2008; ROBLEDO et al., 2012), sendo que um dos melhores produtores de celulase é *R. cellulosilyticum* ALA10B2T, formando nódulos em algumas leguminosas (GARCÍA-FRAILE et al., 2007; ROBLEDO et al., 2008; ROBLEDO et al., 2012).

2.3.Biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica, também chamada de biomassa vegetal, possui uma estrutura complexa de 3 frações poliméricas principais: celulose, hemicelulose e lignina (US DOE, 2006), conforme é mostrado na figura 1. A composição da massa lignocelulósica a torna muito resistente, fato que dificulta o seu uso em processos industriais de larga escala sem um pré-tratamento de degradação (HIMMEL et al., 2007). O principal composto da biomassa vegetal

é a celulose, compreendendo de 40 a 50%, sendo um homopolissacarídeo linear não ramificado com grande parte da sua estrutura cristalina insolúvel em água e resistente à despolimerização (GALBE e WALLBERG, 2019). A hemicelulose compõe de 25 a 30% da massa vegetal seca, sendo um heteropolissacarídeo ramificado composto por polissacarídeos de baixa massa molecular (GUPTA et al., 2016). Já a lignina corresponde de 15 a 20% da biomassa vegetal, uma molécula hidrofóbica, amorfa com estrutura tridimensional e bastante ramificada (GUPTA et al., 2016). Essas três principais estruturas que compõem a biomassa vegetal variam conforme a fonte da matéria-prima e parte da planta utilizada (SARKO, 1997; BON et al., 2008).

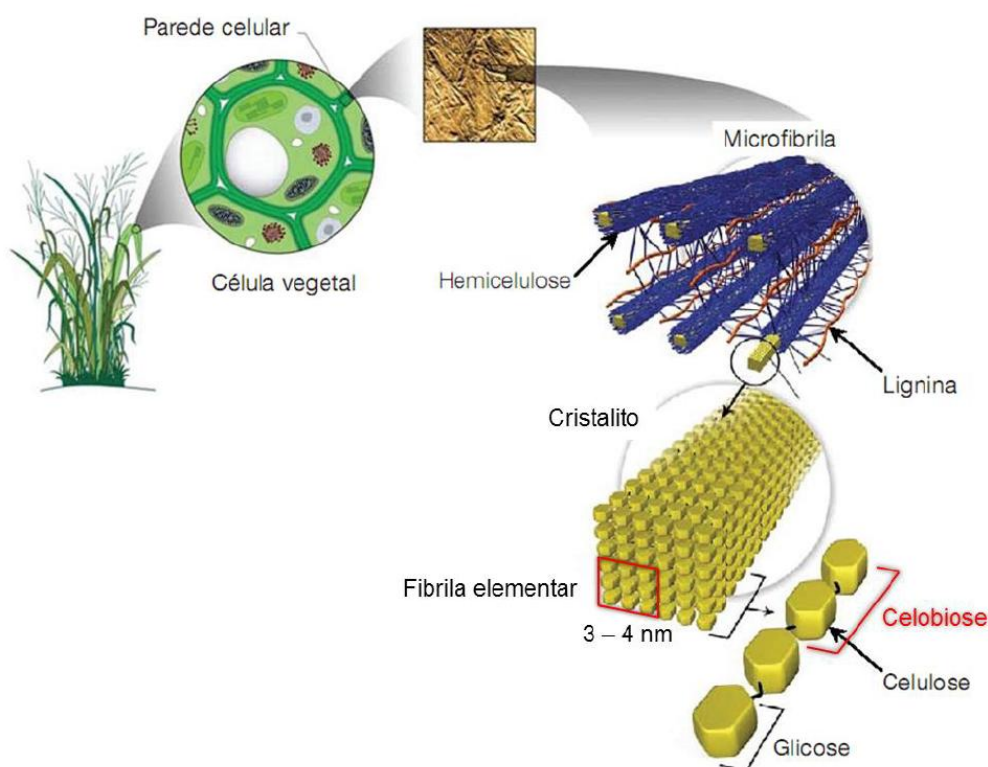


Figura 1. Estrutura da parede celular vegetal e estrutura lignocelulósica da biomassa vegetal.

Fonte: Adaptado de US DOE (2005).

2.4.Celulose

Na natureza, a celulose é o produto primário da fotossíntese (ZHANG et al., 2006) e é essencialmente sintetizada por vegetais, mas também por algumas bactérias e algas. Matéria-prima de origem celulósica possuem cerca de 20% a 60% de celulose e esta pode ser totalmente convertida em glicose através de lise enzimática (CASTRO; PEREIRA-JUNIOR, 2010).

A celulose, um dos componentes da matéria lignocelulósica, é um homopolissacarídeo linear de 10.000 a 15.000 unidades de D-anidroglicopiranoses (D-glicose cíclicos) unidas por

ligações glicosídicas β 1,4 (NELSON e COX, 2004). A resistência a hidrólise é devido ao seu alto grau de cristalinidade (ZANG e LYND, 2004). Dessa forma, para a quebra da celulose ocorrer é necessária a ação de diversas enzimas denominadas celulasas (Figura 2).

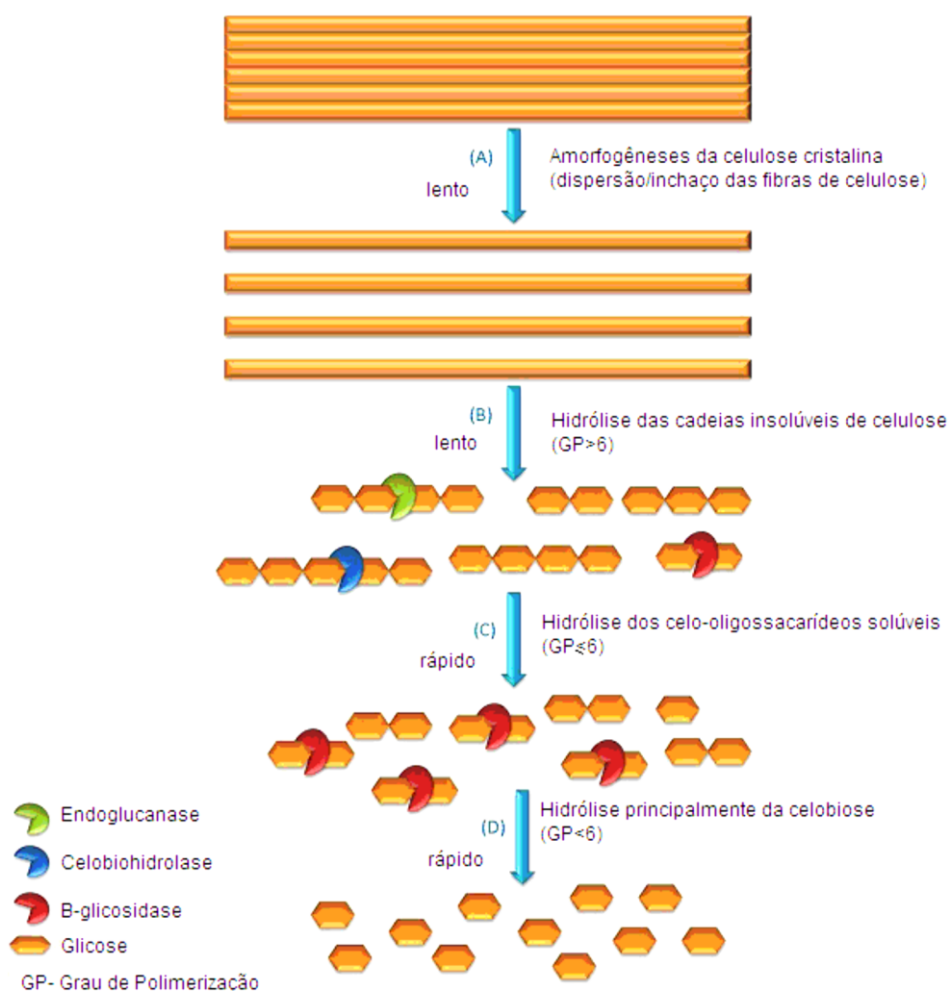


Figura 2. Modelo simplificado de ação das celulasas sobre a cadeia da celulose. Região cristalina representada pelas linhas retas e região amorfa representada pelas linhas ondulas. Fonte: Adaptado de Arantes e Sadler (2010).

Pesquisas envolvendo a conversão de biomassa lignocelulósica em glicose e açúcares solúveis acontecem ativamente desde a década de 1950 (BHAT, 2000; COUGHLAN, 1985). São vários os exemplos do uso desses recursos em diversas atividades sócio-econômicas, como: a produção de compostos comerciais ou para transformação de substratos em produtos de maior valor agregado (plástico biodegradável); produção ou processamento de alimentos, como clarificação de bebidas, panificação, produção de queijos, ácidos orgânicos; uso de

microrganismos fixadores de nitrogênio e em controle biológico de pragas e vetores; recuperação de ambientes por meio da biorremediação; combustíveis alternativos, ou seja, qualquer combustível que tenha origem biológica, desde que não tenha passado por processo de fossilização (SU et al., 2013).

Apesar da dificuldade e da inviabilidade econômica para a bioconversão induzida por enzimas lignocelulósicas, as pesquisas continuam e revelam seu potencial biotecnológico na indústria, agricultura e alimentos (BHAT, 2000). Uma das enzimas utilizadas no processo de conversão de biomassa é a celulase, podendo ser produzida por uma gama de bactérias e fungos, aeróbicos ou anaeróbios, mesófilos e termófilos. Contudo, poucos fungos e bactérias são capazes de produzir celulasas em quantidades suficientes para solubilizar certos tipos de celulose, como a celulose cristalina (BHAT e BHAT, 1997). Entretanto, o aumento da concentração de açúcares e de componentes aromáticos na conversão industrial da lignocelulose em etanol, bem como outras condições adversas, podem causar danos e restringir as suas aplicações (ALPER e STEPHANOPOULOS, 2009).

As moléculas da celulose se ligam por meio de pontes de hidrogênio, sendo divididas em duas regiões: 1- Uma região mais complexa com maior número de interações moleculares, denominada de região cristalina, sendo insolúvel e mais resistente à ação enzimática e a agentes químicos (LYND et al., 2002); 2- A região amorfa, menos complexa e mais facilmente hidrolisável, sendo assim, facilmente hidratada e mais acessível às enzimas do que agentes químicos, conforme a figura 3 (PERCIVAL ZHANG et al., 2006).

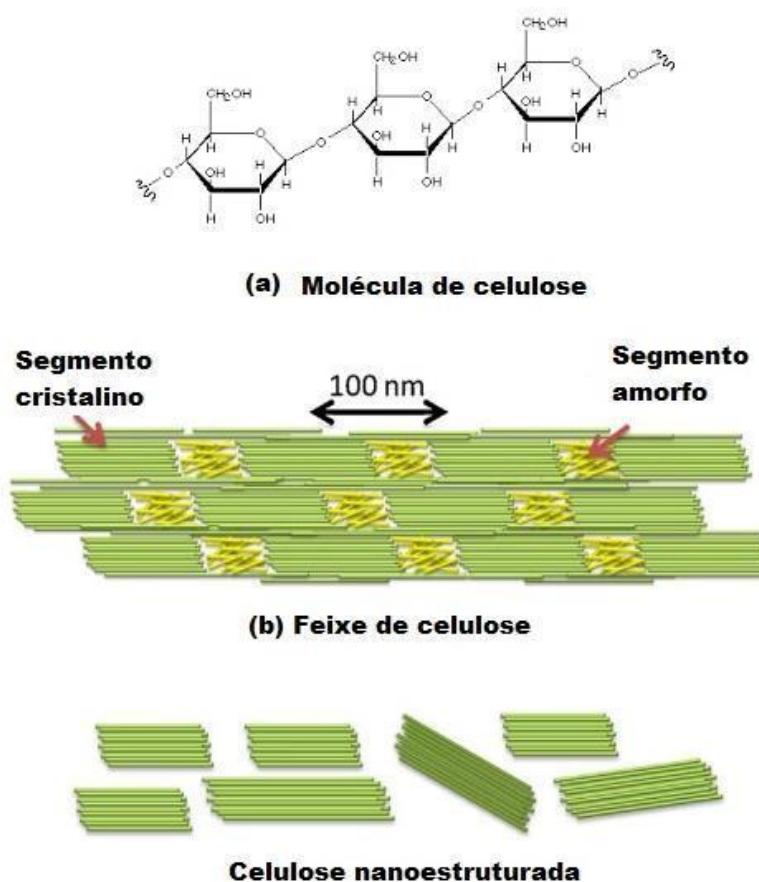


Figura 3. Esquemas de (a) uma cadeia de celulose. (b) microfibrilas de celulosas que representam as disposições de regiões cristalinas e amorfas. (c) e nanocristais de celulose após hidrólise ácida. Fonte: adaptado de Reddy et al. (2013).

2.5.Celulases

É necessária a ação de diversas enzimas denominadas celulases para a quebra da celulose. O “complexo celulase” inclui três grandes classes de enzimas hidrolíticas: (1) Endoglucanase (EG); (2) Celulases totais (CBH) e (3) β -glicosidase (BG) (MARTIN, 1983; TERRA e FERREIRA, 1994; LYND et al., 2002). O Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) classifica as enzimas com um número EC (Enzyme Commission Numbers), as enzimas supracitadas estão alocadas no grupo E.C 3.2.1 para enzimas que degradam ligações glicosídicas. Esses três grandes grupos trabalham sinergicamente em seus respectivos locais de atuação no substrato celulósico da seguinte forma:

- Endoglucanase - Atua no processo de hidrólise aleatória de ligações glicosídicas nas regiões amorfas da fibra de celulose, sendo gerado duas novas extremidades, uma redutora e uma não redutora (CASTRO e PEREIRA JR., 2010) (Figura 4). Essas enzimas podem ser conhecidas

como endo-1,4- β -glucanases e carboximetil celulases (CMCase), tendo como substratos naturais celulose, xiloglicana, carboximetil celulose (CMC), avicel (celulose microcristalina), β -glicana e xilana;

- Exoglucanase - Enzima que atua hidrólise das extremidades redutoras e não redutoras das fibras de celulose, sendo gerada glicose ou celobiose como produto final. Essas enzimas também são chamadas de celulases totais ou 1,4- β -D-glucanocelobiohidrolase (EC 3.2.1.91 e EC 3.2.1.176) ou avicelases (Figura 4);
- β -glicosidase – Essa enzima trabalha diretamente na liberação de monômeros de D-glicose por meio de catálise da hidrólise de celobiose, atuando nas extremidades não redutoras de celulose. Podem também ser conhecidas como gentobiasas, celobiasas e amigdalases, possuem ampla especificidade por β -D-glicosídeos (DAVIES e HENRISSAT, 1995) (Figura 4).

Essas enzimas atuam na degradação da celulose alterando a função, morfologia e a conformação da estrutura cristalina e amorfa do arranjo celular presentes nas fibras celulolíticas (PARK *et al.*, 2009). Entretanto, as ações sinérgicas dos três tipos de enzimas são fundamentais para a utilização e viabilidade da celulose. Dessa forma, a inibição ou ausência de uma das três enzimas torna a degradação da celulose inviável ou realizada parcialmente.

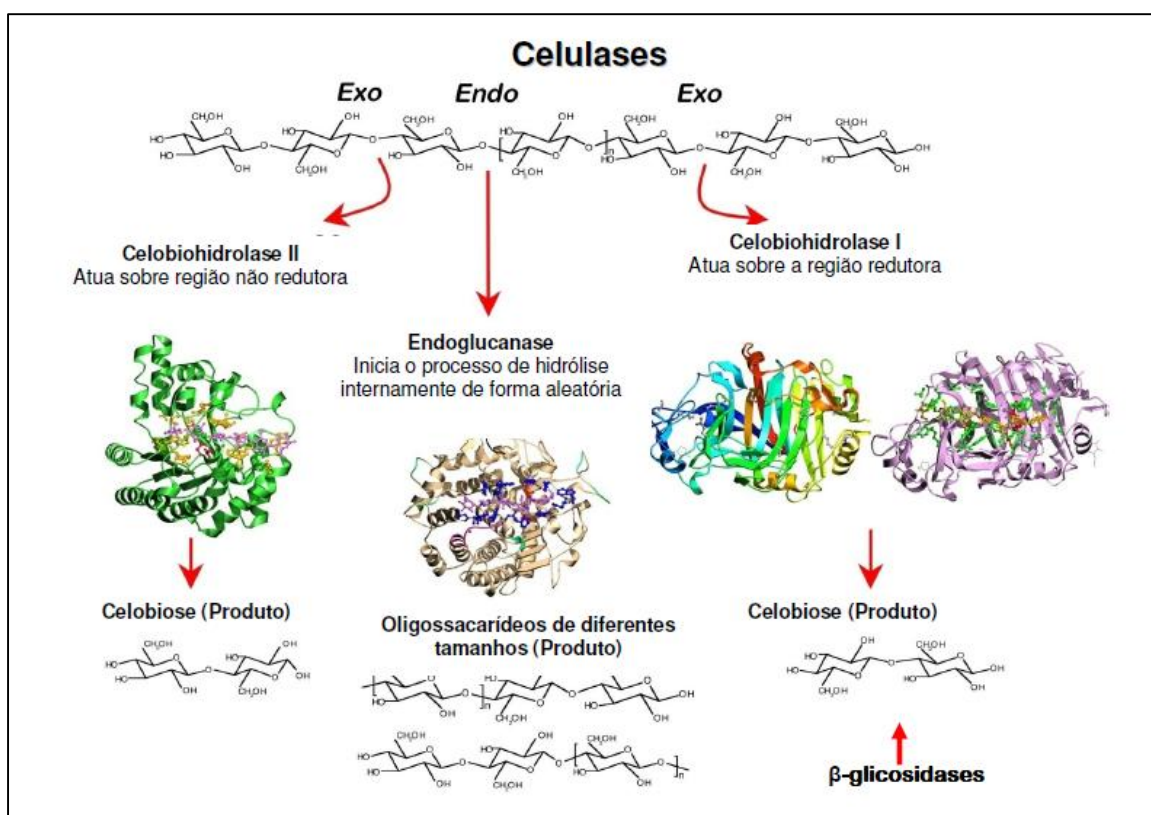


Figura 4. Mecanismo de ação das celulases em seus locais de atuação. Fonte: Santana, (2010).

2.6. Produção de celulase de interesse biotecnológico

As enzimas celulolíticas possuem grande importância biotecnológica, contribuindo com aproximadamente 20% do mercado global de enzimas (MRUDULA e MURUGAMMAL, 2011; PATEL et al., 2019). São caracterizadas como moléculas, em grande maioria de origem proteica, capazes de acelerar diversos processos químicos e ainda tem a vantagem de serem ecologicamente viáveis, em comparação aos reagentes químicos (NELSON e COX, 2004; MONTEIRO e SILVA, 2009).

Os estudos sobre enzimas aumentaram a partir do século passado, com a determinação de suas estruturas e funções. O conhecimento gerado possibilitou a utilização de enzimas em diversos processos industriais nas áreas médica, alimentícia, têxtil, química e celulose para produção, entre outras. As enzimas possuem diversas vantagens quando comparadas a substâncias químicas em processos industriais, por exemplo: não tóxicas, específicas para determinadas ações e, podem alterar as características de diversos tipos de resíduos contribuindo com a redução de poluição ambiental (MUSSATO, 2007; MCKELVEY e MURPHY, 2017).

Os microrganismos destacam-se na bioindústria de enzimas quando comparadas às de origem animal e vegetal, sendo: maior variedade de atividades catalíticas; altos rendimentos; a fácil manipulação genética dos organismos maior regularidade na sua produção; segurança e pureza (HASAN et al., 2006; GEOFFRY e ACHUR, 2018). Apesar das pesquisas com enzimas celulolíticas serem realizadas tradicionalmente com plantas e fungos comerciais, há poucos relatos sobre a atividade celulolítica de rizobactérias (NAPOLI et al., 1975; DAZZO et al., 1984; MATEOS et al., 1995; DIEZ-MENDEZ et al., 2015). Estudos dessa natureza podem direcionar a bioprospecção de microrganismos e suas interações, assim como a caracterização e purificação de enzimas com aplicações biotecnológicas. De acordo com Koeck *et al.* (2014) e Medie *et al.* (2012), metade das espécies de bactérias conhecidas possuem genes que expressam a síntese de celulase, sendo algumas descritas, qualitativamente, quanto a produção de celulasas (Tabela 1).

Tabela 1 - Espécies de bactérias produtoras de enzimas celulolíticas.

Microrganismos	Enzima	Autor
<i>Bacillus megaterium</i>	CMCase	Ferbiyanto et al. (2015)
<i>Paracoccus yeei</i>		
<i>Bacillus cereus aquático</i>	CMCase	Chantarasiri (2015)
<i>Bacillus vallismortisi</i>	Celulase	Gaur e Tiwari (2015)
<i>Bacillus subtilis</i>	Celulase	Prakash et al. (2009)
<i>Bacillus cereus</i>		
<i>Cellulosibacter</i>	CMCase; celobiohidrolase,	Baramée et al. (2015)
<i>alkalithermophilus</i>	β -glicosidade	
<i>Klebsiella oxytoca</i>	CMCase	Dantur et al. (2015)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
<i>Klebsiella variicola</i>		
<i>Bacillus pumilus</i>		
<i>Bacillus subtilis</i>	CMCase	Yang et al. (2014)
<i>Caldicellulosiruptor</i>	Celulase	Brunecky et al. (2013)
<i>bescii</i>		
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Exoglucanase	Tran et al. (2013)
<i>Paenibacillus</i>	Celulase	Asha et al. (2012)
<i>barcinonensis</i>		
<i>Paenibacillus</i>	β -1,4-endoglucanase	Adlakha et al. (2011)
<i>Cellulomonas sp.</i>	Endoglucanase	Yin et al. (2010)
<i>Fervidobacterium</i>	Endoglucanase	Zheng et al. (2009)
<i>nodosum</i>		
<i>Thermotoga neapolitana</i>	β -glicosidase	Kulkarni et al. (2017)
<i>Rhizobium</i>	Celulase	Mateos et al. (1995)
<i>leguminosarum;</i>		
<i>Streptomyces sp.</i>		
<i>Rhizobium</i>	Celulase	Diez-Mendez et al. (2015)
<i>cellulosilyticum</i>		
<i>Rhizobium trifolli</i>	Celulase	Napoli et al. (1975); Dazzo et al. (1984)

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Complexos enzimáticos são utilizados por diversas indústrias, incluindo as de biocombustíveis, alimentos, bebidas, papel, têxteis e farmacêutica. Nas indústrias de alimentos, as enzimas celulolíticas são combinadas com hemicelulases e pectinases na preparação de sucos de frutas e legumes, e produção de ração animal (MENENDEZ et al., 2015; SAJITH et al., 2016; SINGH et al., 2016). Essas enzimas celulolíticas são amplamente utilizadas combinadas para promover o maceramento, melhorar o desempenho do processo e reduzir a viscosidade dos néctares e purês de frutas como damasco, pêssego, ameixa e mamão (MINUSSI et al., 2002; DE CARVALHO et al., 2008; KUHAD et al., 2011). Na indústria de alimentação animal, as enzimas celulolíticas são muito utilizadas na digestibilidade dos alimentos à base de cereais (HIMMEL et al., 1999; DHIMAN et al., 2002; BEAUCHEMIN et al., 2003). A exemplo disto, o *Bacillus subtilis* é utilizado para produção de celulases para degradação da casca da soja com intuito de enriquecer seu valor nutricional para alimentação monogástrica de animais (WONGPUTTISIN et al., 2014; MENENDEZ et al., 2015).

Nas indústrias de bebidas, as celulases são empregadas durante o processo de fermentação para melhorar a qualidade e rendimento das bebidas, sendo responsáveis por reduzir a viscosidade e propriedade sensorial (KUHAD et al., 2011). No segmento industrial de tecido, as celulases são empregadas para proporcionar limpeza, polimento e acabamento do tecido, participando diretamente da hidrólise dos componentes celulósicos de superfície considerados como impureza na produção (SHAH, 2013; SINGH et al., 2016). A principal aplicação de celulases na produção de papel é prevenir efeitos adversos no meio ambiente, substituindo compostos químicos utilizados na fabricação de papel e reduzindo o uso de consumo de aditivos branqueadores, como o cloro (KUHAD et al., 2011; SHWETA, 2012).

2.7. Rizobacterias produtoras de celulases

A celulose, o polímero orgânico mais abundante na biosfera, constitui o principal componente estrutural das paredes celulares de plantas e é caracterizada por cadeias lineares de glicose unidas por ligações β -1,4 (LYND et al., 2002). A degradação dessa macromolécula, que é altamente cristalina e resistente à hidrólise, depende da ação de um complexo enzimático denominado celulases, que inclui endoglucanases (EC 3.2.1.4), celulases totais ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) e β -glicosidases (EC 3.2.1.21) (BEGUIN e AUBERT, 1994; ZHANG e LYND, 2004). Tradicionalmente, fungos filamentosos como *Trichoderma reesei* foram os principais organismos explorados industrialmente por sua elevada secreção de celulases (VIIKARI et al., 2007). No entanto, o crescente interesse por fontes microbianas

alternativas, como bactérias provenientes de rizosferas de plantas, tem revelado uma diversidade funcional significativa com potencial biotecnológico (BHAT, 2000; SINGH et al., 2016).

As rizobactérias são definidas como bactérias que colonizam a rizosfera, ou seja, a região de solo diretamente influenciada pelas raízes das plantas, apresentam repertório metabólico diversificado e adaptado à degradação de substratos complexos, incluindo celulose e hemiceluloses (COMPANT et al., 2010; MENDES et al., 2011). Essa capacidade está associada à elevada disponibilidade de resíduos vegetais ricos em celulose na rizosfera e à dinâmica de exsudação radicular, que fornece fontes de carbono acessíveis e sinais químicos que estimulam a expressão de genes codificadores de enzimas hidrolíticas (BAIS et al., 2006; OLANREWAJU E BABALOLA, 2022).

Historicamente, bactérias celulolíticas foram descritas em diversos gêneros, incluindo *Cellulomonas*, *Fibrobacter*, *Ruminococcus* e espécies de *Bacillus* e *Pseudomonas* (BHAT, 2000; DAS e MUKHERJEE, 2007). Entre as rizobactérias, estudos têm destacado linhagens de *Bacillus* como produtoras eficientes de celulasas, com vantagens ecológicas e fisiológicas para colonização intensa da rizosfera e secreção de enzimas extracelulares (PRIEST, 1977; SCHALLMEY et al., 2004; HASHEM et al., 2017). Essas bactérias apresentam notável adaptabilidade a variações ambientais e capacidade de operar em consórcios comunitários, o que pode resultar em sinergias funcionais que potencializam a degradação da matéria lignocelulósica (SINGH et al., 2016; JOHNS et al., 2016).

A produção de celulasas por rizobactérias é de particular interesse tanto do ponto de vista ecológico quanto biotecnológico. Ecologicamente, a atividade celulolítica microbiana contribui para a degradação da serapilheira e resíduos vegetais, facilitando a ciclagem de carbono e nutrientes no solo, promovendo a disponibilidade de substratos para outros microrganismos e para a planta hospedeira (LYND et al., 2002; MENDES et al., 2011). Em termos aplicados, as enzimas celulolíticas bacterianas têm sido exploradas em contextos industriais variados, como produção de biocombustíveis de segunda geração, processamento de alimentos, clarificação de sucos, tratamento de resíduos agrícolas, biorremediação e produção de produtos de alto valor agregado (BHAT, 2000; KUMAR et al., 2008; SINGH et al., 2016).

Rizobactérias celulolíticas isoladas de solos tropicais e rizosferas apresentam características funcionais que podem superar limitações observadas em fontes fúngicas tradicionais, como maior tolerância a condições extremas de temperatura, pH e salinidade e produção enzimática eficiente em ambientes heterogêneos (BERG e SMALLA, 2009; COMPANT et al., 2010). Estudos de bioprospecção em ecossistemas tropicais têm revelado

novas espécies e cepas com repertórios enzimáticos únicos, capazes de produzir celulases com alta atividade catalítica e estabilidade em faixas amplas de condições físico-químicas (ZHAO et al., 2016; SINGH et al., 2016).

A produção enzimática bacteriana é frequentemente avaliada inicialmente por ensaios qualitativos em meio contendo carboximetilcelulose (CMC), nos quais a formação de halos de degradação ao redor das colônias indica atividade celulolítica, com posteriores quantificações de endoglucanases (CMCase), celulases totais (como FPase) e β -glicosidases utilizando métodos colorimétricos como o reagente DNS ou kits específicos de quantificação de glicose (MILLER, 1959; GHOSE, 1987). A expressão de celulases bacterianas é regulada por mecanismos induzidos por substratos, com genes específicos de celulases sendo ativados na presença de celulose ou oligossacarídeos derivados de celulose, por meio de sinalização metabólica que integra vias de regulação transcricional adaptativas (RATSOGI et al., 2009; KUMAR et al., 2008).

A formação de consórcios microbianos ou co-cultivos se mostraram uma estratégia promissora para intensificar a produção de celulases, uma vez que diferentes linhagens podem expressar classes complementares de enzimas ou metabolizar produtos intermediários de forma cooperativa, resultando em sinergias que aumentam a eficiência geral da degradação da celulose (JOHNS et al., 2016; MEE et al., 2014). Por exemplo, a combinação de endoglucanases robustas com β -glicosidases eficientes pode minimizar o acúmulo de celobiose, que inibe a atividade de outros componentes do complexo enzimático, promovendo eficiência catalítica superior à observada em culturas puras (HORN et al., 2012; SINGHANIA et al., 2013).

Além disso, o potencial biotecnológico de rizobactérias produtoras de celulases está sendo explorado em engenharia genética e bioprocessos industriais, onde genes codificadores de celulases bacterianas são clonados e expressos em sistemas heterólogos (como *Escherichia coli* e leveduras) para produção em larga escala de enzimas com características desejáveis, como termoestabilidade e atividade em pH amplo (ZHANG et al., 2014; SHARMA et al., 2016). A integração de abordagens ômicas, genômica, transcriptômica e proteômica, tem permitido a identificação de vias biossintéticas, sistemas de transporte de oligossacarídeos e redes regulatórias que controlam a produção de celulases, abrindo perspectivas para otimização dirigida por engenharia metabólica (RATSOGI et al., 2009; ZHAO et al., 2016).

Em síntese, as rizobactérias produtoras de celulases representam um grupo funcional de grande relevância ecológica e biotecnológica, cuja diversidade metabólica e adaptabilidade ecológica tornam esses microrganismos promissores para aplicações na valorização de resíduos

lignocelulósicos, produção de biocombustíveis, melhoria da qualidade do solo e incremento da eficiência de bioprocessos industriais.

2.8. Consórcios de microrganismo para a produção de celulases

A produção de celulases, enzimas que degradam a celulose em monossacarídeos como glicose, é um processo complexo que pode ser significativamente otimizado por meio da utilização de consórcios de microrganismos, ou seja, comunidades microbianas compostas por duas ou mais espécies que interagem de forma sinérgica. Esses consórcios podem ser naturais, encontrados em ambientes ricos em matéria lignocelulósica como solos, resíduos agrícolas e a rizosfera, ou artificiais, desenvolvidos em laboratórios para maximizar a degradação de celulose e a produção enzimática (HORN et al., 2012; LYND et al., 2002; ZHANG e LYND, 2004).

A sinergia entre os microrganismos é um dos fatores centrais para o aumento da eficiência na produção de celulases. Diferentes espécies possuem repertórios enzimáticos complementares: enquanto algumas secretam endoglucanases, capazes de quebrar ligações internas da celulose, outras produzem celulases totais ou celobiohidrolases, que atuam nas extremidades das cadeias de celulose, e β -glicosidases, que convertem oligossacarídeos em glicose (SINGHANIA et al., 2013; JOHNS et al., 2016). A interação coordenada entre essas enzimas reduz a inibição por intermediários como celobiose e aumenta a taxa de hidrólise do polímero celulósico (HORN et al., 2012; KUMAR et al., 2008).

Estudos têm mostrado que consórcios artificiais podem superar limitações de culturas monocultivo, permitindo o controle preciso de fatores como proporção de espécies, ordem de inoculação e tempo de crescimento, com consequente aumento da produtividade enzimática (ZHAO et al., 2016; SINGHANIA et al., 2013). Por exemplo, a combinação de bactérias celulolíticas como *Bacillus subtilis* e fungos filamentosos como *Trichoderma reesei* apresenta sinergias significativas, em que os fungos produzem grandes quantidades de enzimas altamente específicas e as bactérias degradam componentes menos cristalinos da celulose, liberando oligossacarídeos que estimulam a atividade enzimática dos fungos (VIAKARI et al., 2007; HORN et al., 2012).

Além das interações enzimáticas, os microrganismos em consórcios podem compartilhar metabólitos secundários, cofatores e nutrientes essenciais, criando um ambiente microecológico favorável à produção contínua de celulases. Estudos indicam que a presença de microrganismos não celulolíticos pode ainda auxiliar na remoção de produtos inibitórios ou na

manutenção do pH ideal, aumentando a estabilidade do sistema (MEE et al., 2014; SINGH et al., 2016).

Os substratos lignocelulósicos utilizados pelos consórcios podem variar desde resíduos agrícolas como bagaço de cana, palha de milho, casca de arroz, até resíduos florestais e industriais. A natureza do substrato influencia diretamente a composição enzimática do consórcio e a eficiência da degradação, uma vez que diferentes microrganismos possuem preferências por diferentes graus de cristalização e composição química da celulose (KUMAR et al., 2008; ZHANG et al., 2014).

No âmbito industrial, consórcios microbianos oferecem vantagens significativas, incluindo redução de custos de pré-tratamento, aumento da estabilidade operacional e maior tolerância a variações ambientais, em comparação com culturas puras. Eles são particularmente importantes em processos de produção de biocombustíveis, bioetanol, açúcares fermentáveis e produtos de alto valor agregado (BHAT, 2000; SHARMA et al., 2016; ZHANG et al., 2014).

A análise moderna de consórcios é reforçada por ferramentas de genômica, transcriptômica e metabolômica, que permitem mapear interações microbianas, fluxos metabólicos e expressão gênica, identificando combinações mais eficientes para degradação enzimática (RATSOGI et al., 2009; JOHNS et al., 2016). Essas abordagens também permitem a engenharia racional de consórcios, ajustando proporções, seleção de espécies e expressão gênica para maximizar a produção de celulasas, reduzindo subprodutos indesejáveis e aumentando a produtividade do sistema (RATSOGI et al., 2009; VIKARI et al., 2007).

Em termos ecológicos, consórcios de microrganismos refletem interações naturais observadas em ambientes ricos em biomassa vegetal, como a rizosfera e o solo agrícola, onde diferentes espécies cooperam na degradação de matéria orgânica complexa (COMPANT et al., 2010; MENDES et al., 2011). A replicação dessas interações em biorreatores industriais permite a criação de sistemas robustos, estáveis e sustentáveis, com maior resistência a flutuações ambientais e capacidade de adaptação a diferentes tipos de resíduos lignocelulósicos (HORN et al., 2012; JOHNS et al., 2016).

Portanto, os consórcios de microrganismos representam uma estratégia promissora para a produção de celulasas, integrando conhecimentos ecológicos, fisiológicos e biotecnológicos. Eles oferecem soluções eficientes, sustentáveis e economicamente viáveis para a bioconversão de resíduos lignocelulósicos, com impactos positivos tanto para a indústria quanto para o meio ambiente. Também constituem uma área de pesquisa em expansão, com grande potencial para inovação em bioprocessos e bioeconomia. Portanto, a busca por novas espécies com potencial biotecnológico associados a um substrato alternativo, rizosfera, é promissora para a bioindústria

de enzimas. Dessa forma, este estudo pode embasar estratégias sobre a utilização da rizobactérias amazônicas e determinação quantitativa de enzimas de microrganismos com potencial biotecnológico. Para isso, esta pesquisa, buscou responder às seguintes perguntas:

- A rizosfera de plantas amazônicas abriga rizobactérias com capacidade de produzir enzimas celulolíticas relevantes do ponto de vista ecológico e biotecnológico?
- As rizobactérias associadas às plantas hospedeiras *Pueraria phaseoloides* e *Inga edulis* diferem quanto ao seu potencial celulolítico?
- Quais grupos bacterianos predominam entre as rizobactérias amazônicas com maior capacidade de produção de celulases?
- As rizobactérias selecionadas apresentam capacidade individual eficiente e estável para a produção de celulases totais, endoglucanases e β -glicosidasases?
- A formação de consórcios bacterianos (co-cultivos) pode intensificar e estabilizar a produção de enzimas celulolíticas em comparação aos cultivos individuais?
- A rizosfera amazônica pode ser considerada uma fonte estratégica para a bioprospecção de bactérias produtoras de celulases de interesse industrial?

3. JUSTIFICATIVA

A crescente necessidade de desenvolvimento de tecnologias sustentáveis para a conversão de biomassa lignocelulósica em produtos de valor agregado, como açúcares, biocombustíveis, enzimas industriais e bioinsumos agrícolas, tem impulsionado a busca por microrganismos capazes de produzir complexos enzimáticos celulolíticos eficientes. Embora avanços significativos tenham sido obtidos nas últimas décadas, a maior parte das pesquisas permanece concentrada em fungos filamentosos e em microrganismos oriundos de ambientes temperados, o que evidência uma lacuna relevante no conhecimento acerca do potencial celulolítico de bactérias associadas a ecossistemas tropicais, particularmente da rizosfera amazônica. Considerando a elevada biodiversidade da Amazônia e a complexidade funcional das interações planta–microrganismo nesse ambiente, é plausível supor que esse ecossistema abriga rizobactérias com elevada capacidade metabólica e enzimática ainda pouco explorada sob a perspectiva biotecnológica.

Do ponto de vista científico, ainda são escassos os estudos que avaliam de forma integrada a influência da planta hospedeira na seleção funcional de comunidades bacterianas produtoras de celulases, bem como aqueles que investigam a contribuição das interações microbianas para a intensificação da produção enzimática. Em ambientes naturais, a degradação da celulose ocorre de forma cooperativa envolvendo diferentes microrganismos. No entanto, grande parte

dos estudos laboratoriais avalia isolados em monocultivo, desconsiderando a complexidade ecológica e funcional dos consórcios microbianos. Essa abordagem limitada restringe a compreensão dos mecanismos de sinergismo metabólico e reduz o potencial de aplicação prática dos microrganismos selecionados, configurando uma lacuna metodológica relevante na área.

A execução desta tese justifica-se, portanto, pela necessidade de ampliar o conhecimento sobre a diversidade funcional de rizobactérias amazônicas, identificando linhagens com elevado potencial celulolítico e avaliando sistematicamente o desempenho enzimático tanto em monocultivo quanto em sistemas de co-cultivo. Ao investigar rizobactérias associadas a diferentes plantas hospedeiras, com destaque para *Pueraria phaseoloides* e *Inga edulis*, este estudo buscou compreender se plantas hospedeiras influenciam na seleção de microrganismos especializados na degradação da biomassa vegetal. Essa abordagem permite avançar na compreensão da ecologia funcional da rizosfera, integrando aspectos taxonômicos, fisiológicos e metabólicos das comunidades bacterianas associadas às raízes.

Do ponto de vista aplicado, os resultados esperados incluem a identificação de bactérias com elevada capacidade de produção de celulases, especialmente espécies pertencentes ao gênero *Rhizobium* ou *Bacillus*, amplamente reconhecidas por sua eficiência na secreção de enzimas extracelulares, robustez fisiológica e histórico de uso em processos industriais. A seleção de isolados bacterianos com altos índices enzimáticos, aliada à formação de consórcios bacterianos sinérgicos, poderá resultar em sistemas microbianos mais eficientes e estáveis para a produção de endoglucanases, celulases totais e β -glicosidases. Esses sistemas apresentam potencial para aplicação em processos fermentativos, degradação de resíduos agroindustriais e valorização de biomassas lignocelulósicas de origem agrícola e florestal.

Adicionalmente, os conhecimentos gerados por esta tese podem contribuir para o desenvolvimento de estratégias biotecnológicas sustentáveis voltadas ao manejo do solo e à ciclagem de nutrientes, uma vez que rizobactérias celulolíticas desempenham papel central na mineralização da matéria orgânica e na disponibilização de carbono no solo. A integração dos resultados laboratoriais com perspectivas de aplicação ambiental e industrial reforça a relevância científica e tecnológica do estudo, posicionando a rizosfera amazônica como uma fonte de microrganismos com elevado potencial para a produção de celulases e para a inovação biotecnológicas.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial celulolítico de rizobactérias associadas às plantas hospedeiras *Pueraria phaseoloides* e *Inga edulis*, visando à identificação taxonômica de linhagens bacterianas com elevada capacidade de produção de celulasas e à análise da atividade celulolítica em sistemas de monocultivo e co-cultivo, com foco na aplicação biotecnológica na degradação de biomassa lignocelulósica.

4.2. Objetivos específicos

- a) Reativar, selecionar e caracterizar preliminarmente rizobactérias associadas às plantas hospedeiras *Pueraria phaseoloides* e *Inga edulis*, provenientes da Coleção de Microrganismos do LEBMAM/INPA, quanto à viabilidade fisiológica, morfologia celular e coloração de Gram.
- b) Avaliar o potencial celulolítico das rizobactérias por meio de ensaios qualitativos e semiquantitativos em meio contendo carboximetilcelulose (CMC), utilizando o índice enzimático (IE) como critério de triagem e seleção de linhagens promissoras.
- c) Comparar o potencial celulolítico das rizobactérias associadas às diferentes plantas hospedeiras, analisando estatisticamente os valores de índice enzimático, a fim de verificar a influência da espécie vegetal na seleção funcional da microbiota rizosférica.
- d) Identificar taxonomicamente, por meio de análises moleculares do gene 16S rRNA, as rizobactérias com maiores índices enzimáticos, visando à correta caracterização das linhagens com potencial biotecnológico.
- e) Avaliar a produção de celulasas totais (Fpase), endoglucanases (CMCase) e β -glicosidases pelas rizobactérias selecionadas em sistemas de monocultivo, determinando o perfil temporal da atividade enzimática.
- f) Investigar o efeito de sistemas de co-cultivo bacteriano sobre a intensidade e

estabilidade da produção de enzimas celulolíticas, comparando diferentes consórcios com cultivos individuais e com uma estirpe controle, visando à seleção de arranjos microbianos com maior potencial para aplicações biotecnológicas.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Seleção e reativação de microrganismos

Foi realizado um levantamento de rizobactérias que apresentaram capacidade de produzir enzimas hidrolíticas, degradação petróleo e surfactantes que estão depositados na Coleção de Microrganismos do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Microrganismos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (LEBMAM) – INPA. Foi estabelecido como critério que as rizobactérias selecionadas tenham sido coletadas em nódulos de raízes ou solo próximo as diferentes plantas isca. Selecionou-se um total de 133 bactérias armazenadas, sem contaminação, em tubos de ensaios com meio solido YMA (Yeast Manitol Agar), das quais 86 cresceram durante o processo reativação (Tabela 2).

Tabela 2 - Rizobactérias reativadas, seus respectivos locais de coleta e plantas associadas, sendo coletadas e isoladas em estudos anteriores intuito de identificar bactérias com atividade hidrolítica.

Bactérias	Local	Planta
INPA R267		
INPA R300		
INPA R265	Rio Preto da Eva	<i>Rhynchosia phaseoloides</i>
INPA R273	S 2°40'13" W 59°43'20,7"	(Tento)
INPA R302		
INPA R270	Rio Preto da Eva	<i>Mimosa pudica</i> (Dorme-
INPA R341	S 2°39'35,5" W 59°43'25,5"	dorme)
INPA R274	Rio Preto da Eva	
INPA R293	S 2°44'15,9" W 59°46'50,1"	<i>Inga edulis</i> (Ingá)
INPA R281	Rio Preto da Eva	<i>Desmodium triflorum</i> (Amor-
	S 2°40'13" W 59°43'20,7"	do-campo)
INPA R283	Rio Preto da Eva	<i>Oxalis acetosella</i> (Trevinho)

INPA R307	S 2°40'13" W 59°43'20,7"	
INPA R313		
INPA R314	Rio Preto da Eva	<i>Indigofera</i> sp. (Timbó)
INPA R315	S 2°40'13" W 59°43'20,7"	
INPA R316		
INPA R332	Rio Preto da Eva S 2°44'10,1" W 59°46'2,3"	
INPA R401	Irاندوبا; Comunidade Jandira, Várzea S 3°15'20,7" W 60°15'15,5"	<i>Inga heterophylla</i>
INPA R552	Irاندوبا: Ramal do Caldeirão km3 S 30 12' 26,9" W 600 12' 2,5"	<i>Pueraria phaseoloides</i> (Feijão Bravo)
INPA R547		
INPA R555		
INPA R565	Irاندوبا: Ramal do Caldeirão km3 S 30 13' 41,9" W 600 13' 27,8"	<i>Pueraria phaseoloides</i> (Feijão Bravo)
INPA R571		
INPA R583		
INPA R598	Estrada para Jandira; Beira do Rio Solimões, Várzea S 030 15' 21,3" W 0600 15' 17,2"	<i>Inga edulis</i> (Ingá)
INPA R613	Estrada para Jandira; Propriedade São João S 030 15' 20,3" W 0600 15' 33,1"	<i>Vignia unguiculata</i> (Feijão Caupi)
INPA R666	INPA, campus V8 S 030 05' 28,6" W 0590 59' 36,7"	<i>Swartzia polyphylla</i> (Arabá)
INPA R685	Manacapuru; Estrada do Acajatuba S 3°13'36,1" W 60°34'20,5"	<i>Desmodium ovalifolium</i> (Desmódio)
INPA R686		
INPA R692		
INPA R695		
INPA R720		
INPA R727	Manacapuru; Lago do Paru S 3°15'24,7" W 60°32'3,4"	<i>Inga edulis</i> (Ingá)
INPA R723		
INPA R729		
INPA R738	Manacapuru; Estrada do Acajatuba S 3°13'36,1" W 60°34'20,5"	<i>Pueraria phaseoloides</i> (Feijão Bravo)
INPA R735		
INPA R734		

INPA R731		
INPA R699		
INPA R740		
INPA R741		
INPA R746		
INPA R758		
INPA R757		
INPA R762		
INPA R763		
INPA R764		
INPA R765		
INPA R770		
INPA R774		
INPA R779		
INPA R754		
INPA R713		
INPA R710	Manacapuru; Ramal do Laranjal	
INPA R702	S 3°15'24,7" W 60°31'0,5"	<i>Tephrosia cinera</i> (Anil bravo)
INPA R715		
INPA R719		
INPA R001		
INPA R012		
INPA R014	Novo Ayrão	Solo floresta
INPA R015		
INPA R028		
INPA R034		
INPA R046		
INPA R178	Manaus; Ramal do Brasileirinho	<i>Inga edulis</i> (Ingá)
INPA R262		
INPA R233		
INPA R236		
INPA R266	Rio Preto da Eva	<i>Inga</i> sp. (Ingá)
INPA R268	Rio Preto da Eva	<i>Inga</i> sp. (Ingá)

INPA R269	Rio Preto da Eva	<i>Mimosa pudica</i> (Dorme-dorme)
INPA R276	Rio Preto da Eva	<i>Inga edulis</i> (Ingá)
INPA R287	Rio Preto da Eva	Trevinho
INPA R288	Rio Preto da Eva	<i>Inga edulis</i> (Ingá)
INPA R296	Rio Preto da Eva	<i>Inga</i> sp. (Ingá)
INPA R318	Rio Preto da Eva	<i>Indigofera</i> sp. (Timbó)
INPA R721	Manacapuru; Lago do Paru S 3°15'24,7" W 60°32'3,4"	<i>Inga edulis</i> (Ingá)
INPA R722	Manacapuru; Lago do Paru S 3°15'24,7"W 60°32'3,4"	<i>Inga edulis</i> (Ingá)
INPA R783	Balbina, Km 2 S 2°4'3,7" W 60°0'7,7"	<i>Desmodium triflorum</i> (Amor-do-campo)
INPA R792	Balbina; Km 42 Sítio Marisa S 2°3'5,2"W 59°40'11,1"	<i>Inga edulis</i> (Ingá)
INPA R961	Itacoatiara; Novo Remanso	<i>Inga edulis</i> (Ingá)
INPA R976	S 030 38,8" W 0580 58' 31,9"	
INPA R1001	Manacapuru; Lago do Paru	<i>Inga edulis</i> (Ingá)
INPA R1062	S 3°15'24,7" W 60°32'3,4"	
INPA R1065	Manacapuru; Lago do Paru S 3°15'24,7" W 60°32'3,4"	<i>Inga edulis</i> (Ingá)

Fontes: VAZ, (2013); COSTA, (2017); CÁUPER, (2018); OLIVEIRA *et al.* (2022).

Após a seleção, as rizobactérias foram reativadas por meio da técnica de estria simples em placa de Petri contendo meio sólido a base de extrato de levedura, manitol e agar (YMA) como fonte de carbono (Tabela 3), sendo um meio bastante utilizado para o cultivo de rizobactérias (VINCENT, 1970; SOMASEGARAN e HOBEN, 1985; HUNGRIA *et al.*, 1994). Após a inoculação, as placas foram incubadas a 28°C até o crescimento de colônias de bactérias (3 a 5 dias), sendo repicadas para novas placas nas mesmas condições com o intuito de evitar contaminações. Posteriormente, os isolados reativados no segundo repique foram armazenados em tubos de ensaio contendo o meio YMA inclinado, seguindo as recomendações de Vincent (1970) e Somasegaran e Hoben (1985).

Tabela 3 - Meio de Cultura Yeast Manitol Ágar – YMA (Adaptado)

Compostos	Quantidade
Agar	15,0 g
Manitol*	10,0 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
Extrato de levedura*	0,2 g
Água destilada	1000,0 mL

Fonte: Vicent (1970). *Composto substituído em ensaios enzimáticos utilizando CMC (1 %.) e redução em 50% da quantidade de Extrato de levedura.

5.2.Avaliação da produção de enzimas celulolíticas das rizobactérias

Foi realizada a seleção de linhagem de bactérias quanto a capacidade destas em crescer em meio contendo uma única fonte de carbono celulósica. Para isso foi utilizado o meio YMA, com modificações, sendo retirado o manitol e adicionado 1 % de carboximetilcelulose (CMC) ao meio (VINCENT, 1970; HANKIN e ANAGNOSTAKIS, 1975; RUEGGER e TAUKE-TORNISIELO, 2004). As placas foram incubadas por 5 dias a 28 °C e em seguida submetidas a choque térmico de 50 °C em estufa por 30 minutos para inativar a ação enzimática das rizobactérias avaliadas. A atividade enzimática foi verificada pela formação de halos de degradação do polímero, os quais foram revelados a partir da incubação das placas em 10 mL de solução corante de vermelho Congo (1%) em tampão Tris HCl 0,1 M, pH 8,0. Após 30 min a solução foi descartada e as culturas foram lavadas com 5 mL de solução de NaCl 0,5 M nas mesmas condições do tampão supracitado (NOGUEIRA e CAVALCANTE, 1996) (Figura 5). O método de coloração com corante vermelho Congo é uma forma indireta e qualitativa para a avaliação do potencial celulolítico de microrganismos. Para isso, os diâmetros das colônias e dos halos produzidos foram medidos com auxílio de um paquímetro digital (mm). Os ensaios foram realizados, em quadruplicatas, em uma única placa de petri contendo CMC (Figura 5B).

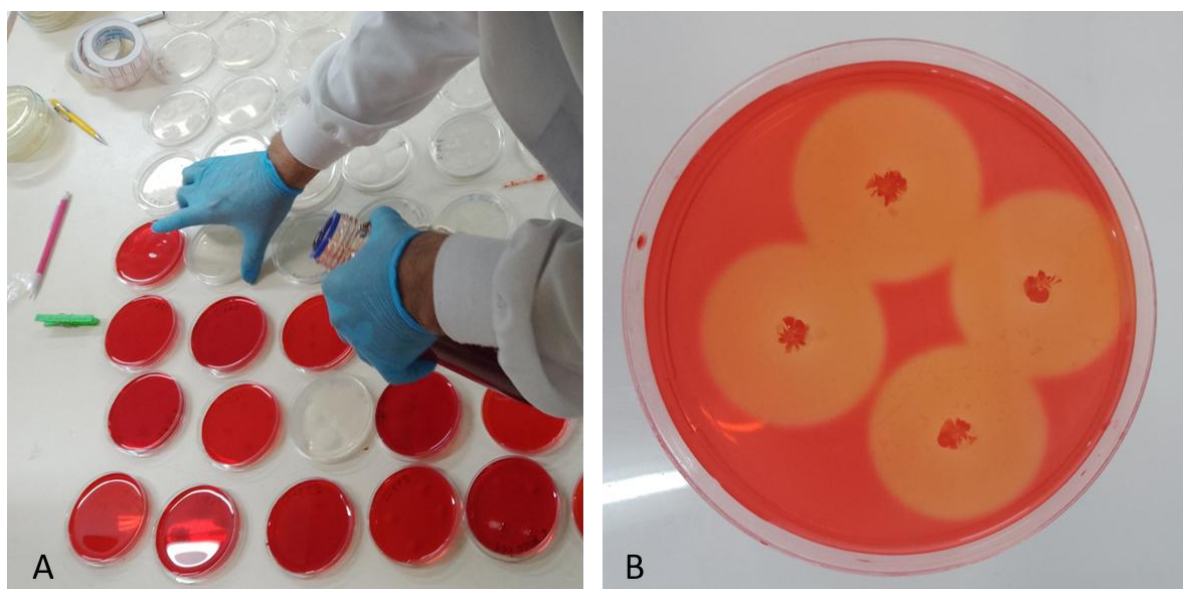


Figura 5. Avaliação semiquantitativa em meio com CMC. A – Revelação dos halos de hidrólise com o corante vermelho Congo; B – Placa com repetições de bactérias coradas.

A atividade enzimática foi expressa em índice enzimático (IE) mediante a relação do diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia ($IE = dh/dc$) (HANKIN e ANAGNOSTAKIS, 1975; NOGUEIRA e CAVALCANTE, 1996; FLORENCIO *et al.*, 2012). Os diâmetros das colônias e dos halos produzidos foram medidos com auxílio de um paquímetro (mm). A partir desses resultados foram selecionadas as rizobactérias com maior potencial biotecnológico, sendo consideradas as que alcançaram IE acima de 2,0 como potenciais rizobactéria a para a produção de enzimas celulolíticas (LEALEM; GASHE, 1994).

5.3. Avaliação de plantas hospedeiras para a bioprospecção de rizobactérias com atividade celulolítica

Foram selecionados 50 isolados de rizobactérias previamente obtidos a partir de nódulos radiculares de duas espécies vegetais de interesse, *Pueraria phaseoloides* e *Inga edulis*, com o objetivo de identificar plantas para bioprospecção de bactérias na produção de enzimas celulolíticas. Padronizamos quantidade de isolados analisados, 24 foram provenientes de *P. phaseoloides* e 26 de *I. edulis*, espécies amplamente estudadas devido à sua relevância ecológica e capacidade de associação com microrganismos do solo (Hernández *et al.*, 2013). A escolha desses isolados baseou-se no fato de terem sido previamente coletados em *P. phaseoloides* e *I. edulis*, sendo caracterizados como bactérias hidrolíticas conforme os estudos de VAZ, (2013);

COSTA, (2017); CÁUPER, (2018); OLIVEIRA *et al.* (2022). Esses trabalhos forneceram suporte quanto à diversidade microbiana associada às espécies vegetais avaliadas, bem como à viabilidade dos isolados para aplicações biotecnológicas.

5.4. Coloração de Gram

O procedimento de coloração de Gram das rizobactérias foi realizado no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), no Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Microrganismos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (LEBMAM). Foi realizada a coloração de Gram com o intuito de auxiliar da identificação molecular das rizobactérias com resultado positivo para produção de enzimas celulolíticas. As rizobactérias foram cultivadas a 28 °C, por sete dias, em placas de Petri com meio de cultura YMA (VINCENT, 1970; SOMASEGARAN; HOBEN, 1985). Em seguida foi retirada uma pequena amostra da cultura, com alça de platina e depositada em uma alíquota de água destilada autoclavada em lâmina microscopia, sendo realizado um esfregaço de forma oval, uniforme e fino. As lâminas de cada rizobactéria avaliada foram identificadas e aquecidas no bico de Bunsen para fixação. Após o processo de fixação das bactérias, cada lâmina foi tratada com o reagente Cristal Violeta, deixando agir por um minuto e lavada com água esterilizada de forma corrente dos dois lados. Cobriu-se com Lugol por um minuto e novamente lavada conforme procedimento anterior. Foi decolorada com álcool-cetona, lavada e, adicionado sob a lâmina Fucsina por 30 segundos, e, novamente lavou-se em água corrente (MARTINS *et al.*, 1997).

Posteriormente, as lâminas foram visualizadas ao microscópio óptico Leica DM 5500 com câmera acoplada, sendo utilizada a lente objetiva de 40x ou 100x sob óleo de imersão. As rizobactérias que apresentaram células de cor roxa foram identificadas como Gram positivas e aquelas de coloração rósea como Gram negativas. A partir das características morfológicas e coloração de Gram, foram selecionadas as rizobactérias distintas e com os maiores resultados obtidos de IE, sendo as mesmas utilizadas nos ensaios de determinação das celulases em mono e co-cultivo.

5.5. Análise molecular

As rizobactérias com maiores IE foram reativadas em erlenmeyers contendo 50 mL de meio líquido YMA (K_2HPO_4 : 0,5g L⁻¹; $MgSO_4$: 0,2 g L⁻¹; NaCl: 0,1 g L⁻¹; extrato de levedura: 0,5g L⁻¹; Manitol: 10,0 g L⁻¹) à 28°C, em agitação a 125 rpm por 24 h. Para extração

do DNA genômico utilizou-se os reagentes e o protocolo do Qiasm DNA Kit (250) (QIAGEN, Alemanha) e de CHAPAVAL et al. (2008). As amostras foram identificadas e autenticadas a nível molecular através da amplificação do gene 16S onde utilizou-se os oligonucleotídeos iniciadores: 530 F (5'-TGA CTG ACT GAG TGC CAG CMG CCG CGG -3') e 1492R (5'-TGA CTG ACT GAG AGC TCT ACC TTG TTA CGM YTT-3') recomendados por BORNEMAN e amp; TRIPLETT (1997). Para a visualização dos fragmentos amplificados, 4µL do produto da PCR adicionado de 1 µL de *loading buffer* foram separados por eletroforese a 100 volts, por 60 minutos a temperatura ambiente, em gel de agarose a 2% adicionado de 2µL de gel red TM (Biotium), em cuba de eletroforese horizontal, utilizando tampão TAE 1X. Os fragmentos de DNA foram visualizados no transiluminador iBrighTM Imaging System. O sequenciamento foi realizado em sequenciador ABI 3500 de 8 capilares, sendo realizado sob a supervisão da servidora Michele Silva de Jesus, vinculada ao ILMD/Fiocruz Amazônia.

A amplificação da região 16S do rDNA foi realizada por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), conduzida no Laboratório Multiusuário do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/Fiocruz Amazônia). O processo de identificação molecular dos isolados foi executado sob a supervisão da servidora Michele Silva de Jesus, vinculada ao ILMD/Fiocruz Amazônia, assegurando a padronização e a confiabilidade das análises moleculares realizadas.

5.6. Identificação taxonômica

As sequências nucleotídicas obtidas a partir de ambas as fitas de DNA (*forward* e *reverse*) das amostras analisadas foram inicialmente editadas, avaliadas quanto à qualidade e posteriormente alinhadas para a geração das sequências consenso, utilizando o software Geneious Prime® Trial versão 9.0.5 (Kearse et al., 2012). Esse procedimento permitiu a correção de possíveis ambiguidades e a obtenção de sequências representativas e confiáveis para as análises subsequentes.

A identificação taxonômica das rizobactérias celulolíticas foi realizada por meio da comparação das sequências consenso ~~obtidas com sequências de referência~~ disponíveis no banco de dados de genomas depositados no GenBank. Para isso, foi utilizado o algoritmo Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., 1990), disponibilizado pelo National Center for Biotechnology Information (NCBI). A classificação dos microrganismos foi determinada com base nos maiores valores de similaridade e cobertura das sequências, considerando-se os alinhamentos com maior significância estatística.

5.7. Condições de cultivo, obtenção das estirpes das rizobactérias e controle

Para induzir as rizobactérias selecionadas a produzir celulases, optou-se como meio basal para cultivá-las, o meio YMA líquido (Tabela 3) + glicose 1%, substituindo o composto Manitol (1%) por celulose microcristalina (1%) (Avicel). As rizobactérias foram incubadas em *shaker*, sob agitação de 125 rpm, a 28 °C em frascos Erlenmeyers de 100 mL. Foram mantidas até que a concentração celular alcance um valor entre 0,6 e 0,8 de absorbância, mensurado em espectrofotometro, a 600 nm, sendo o valor de absorbância determinado corresponderá a 10^{-7} células/mL (DIAS, 2012; DAS e MUKHERJEE, 2007).

Em seguida, foi retirado um volume de 1 mL das bactérias crescidas em meio basal + glicose 1% e adicionado em 250 mL de avicel em triplicata. Os fatores físicos do pré-inóculo foram baseados com descrito na literatura para bactérias produtoras de enzimas celulolíticas: a temperatura em torno de 28 a 30 °C, pH em torno de 5,0. A cada 12 h foi retirada uma amostra, centrifugada e armazenada para a realização dos ensaios.

5.8. Condições de cultivo, obtenção das estirpes de controle

Para uma comparação mais efetiva da produção de enzimas pelas rizobactérias selecionadas em mono e co-cultivo, foi realizada uma avaliação controle através de comparação com estipe INPA R302, sendo previamente indetificada como *Paenibacillus* sp nos estudos de CÁUPER et al. (2021). As *Bacillus* e *Paenibacillus*, possuem a capacidade de degradar tanto carboximetilcelulose (CMC) quanto Avicel, forma cristalina da celulose (WANG et al. 2008; SHETTY, et al. 2019), bem como resíduos lignocelulolíticos provenientes da agroindústria (LEE et al. 2008; KO et al. 2010). Apesar de uma identificação previa, a estipe INPA R302 foi identificada taxonomicamente através da análise molecular.

Para induzir a produção de celulase de *Paenibacillus* sp (INPA R302) para comparação, optou-se por utilizar como fonte de carbono a celulose microcristalina (Avicel) nas mesmas condições de meio basal utilizado nas rizobacterias avaliadas em mono e co-cultivo supracitados.

Em seguida, foi retirado um volume de 20 mL do pré-inóculo crescido em meio basal + glicose 1% e adicionado em 200 mL de Avicel em triplicata. Os fatores físicos do pré-inóculo foram baseados com descrito na literatura para fungos produtores de enzimas celulolíticas: a

temperatura em torno de 30 °C, pH em torno de 5,0. A cada 12 h foi retirada uma amostra, centrifugada e armazenada para a realização dos ensaios.

5.9. Preparação da curva padrão

Foi utilizado os valores de glicose em concentrações de 0,1 a 2,0 g/L para determinação da curva padrão através do método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS). Em tubos de ensaio contendo 1 mL de solução DNS, foi adicionado 1 mL de cada solução padrão de glicose, sendo agitados e aquecidos por 5 min à temperatura de 100 °C e após atingir a temperatura ambiente sendo adicionado 13 mL de água destilada. O tubo apenas com água destilada foi utilizado como controle (branco) e as leituras de absorbância foram realizadas a 540 nm, utilizando um espectrofotômetro de microplacas (Thermo Scientific, Multiskan® FC).

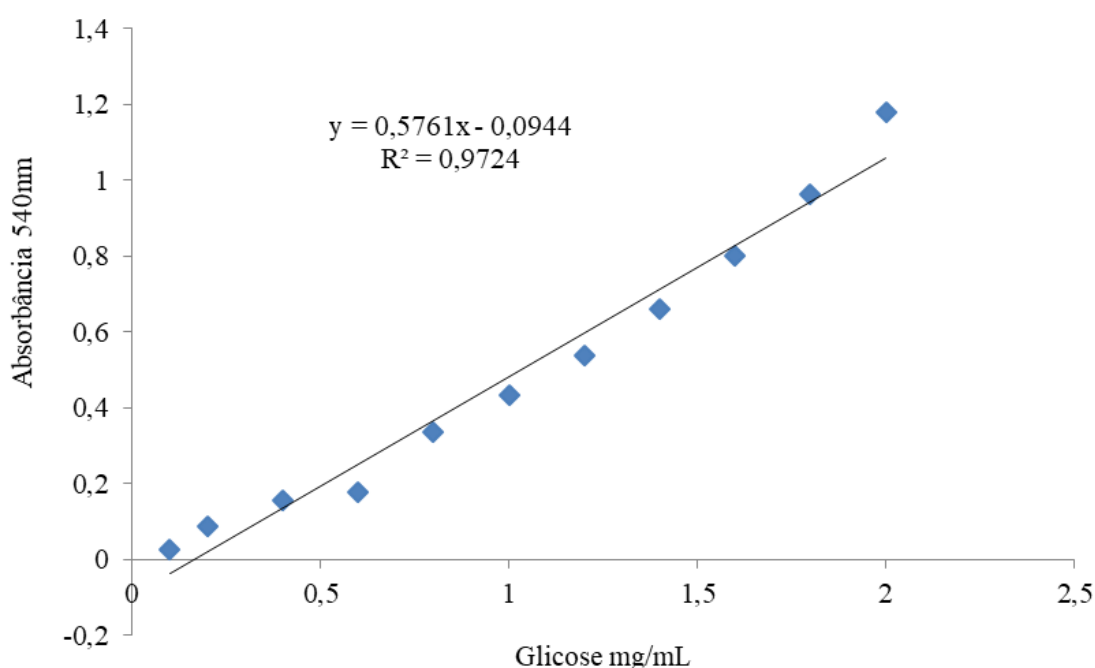


Figura 6. Curva padrão de glicose e equação da reta utilizada nos ensaios de FPase e CMCase.

A curva padrão foi construída a partir da quantificação da glicose liberada nas reações utilizando o sobrenadante dos cultivos, em triplicata (Figura 6). Os valores de absorbância de glicose foram definidos como padrão conhecida: curva padrão de DNS para endoglucanase e kit GOD para β -glucosidase. De acordo com Miller, (1959) o método DNS é adequado e possui sensibilidade de detecção de 1 a 20 μ mol de glicose padrão. Os resultados obtidos foram medidos em U (unidade de atividade). Onde uma unidade de atividade foi definida como a

quantidade de enzima que libera 1 μmol de glicose por minuto (Figura 6). A atividade enzimática em U/ml foi calculada utilizando-se as equações para cada atividade enzimática definida pelas derivações de Ghose (1987). Foi utilizada a fórmula abaixo para estimar a porcentagem das proteínas correspondentes às enzimas celulolíticas, calculando a atividade específica:

$$\frac{U}{mg} = \frac{\left(\frac{U}{mL}\right)}{\left(\frac{mg}{mL}\right)}$$

Onde: U/mL = Atividade enzimática; mg/mL = Concentração de proteínas totais.

5.10. **Determinação da Atividade de celulases totais – Fpase**

Foi utilizada a metodologia de Ghose, (1987), onde uma tira de papel de filtro Whatman nº 1 de 1x6 cm foi inserida em tubos contendo 1 mL de tampão citrato pH 4,8 e 0,5 mL do extrato enzimático, onde foram investigadas pelo menos duas diluições que liberem aproximadamente 2,0 mg (quantidade absoluta) de glicose e/ou açúcares redutores como a glicose nas condições da reação. Os tubos foram incubados imediatamente a 50 °C por 1 hora, em seguida os tubos foram agitados em vortex e foi retirado 100 μL para outro tubo, adicionando 200 μL de reagente DNS e incubando-os a 100 °C por 5 min. Em seguida foi adicionado 1,5 mL de água e homogeneizado por inversão. A intensidade da cor formada foi quantificada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm. O branco reacional foi constituído pela tira de papel de filtro e o tampão, e utilizado para zerar o equipamento. Além do branco reacional foi feito também o branco da enzima que se constituirá de tampão e extrato enzimático, sem adição do substrato, os valores de absorbância foram subtraídos dos valores obtidos dos tubos de reação.

Para determinar a concentração de açúcares redutores liberados na reação foi utilizada a equação da curva padrão de glicose construída a partir de uma solução padrão na concentração de 10 mg/mL. Em seguida a atividade enzimática foi calculada utilizando a equação abaixo, onde [E] é a concentração expressa de acordo com a diluição de enzima adicionada necessária para liberar 2 mg de glicose (quantidade absoluta) durante o tempo de reação, e foi determinada

por plotagem de duas diluições que liberarão glicose variável em relação a quantidade absoluta de glicose, através da representação gráfica da glicose liberada (mg/mL) em função da concentração de extrato enzimático.

$$Atividade(FPU) = \frac{0,37}{[E]_{para\ liberar\ 2,0\ mg\ de\ glicose}} U/mL$$

Obtenção de [E] a partir da diluição usada

$$Concentração = \frac{1}{diluição} = \left(\frac{Volume\ de\ extrato\ enzimático\ utilizado}{Volume\ total\ da\ diluição} \right)$$

5.11. Determinação de Atividade endoglucanásica – CMCase

A quantificação da atividade enzimática endoglucanásica foi realizada de acordo com Ghose (1987). Com objetivo de utilizar quantidades reduzidas de amostras e reagentes, os ensaios de CMCase foram realizados em uma escala microvolumétrica com redução da escala em 1 Log. Para a reação foram adicionados 50 µL de extrato enzimático diluído em tampão citrato pH 4,8, e 50 µL de solução de CMC 2% (m/v), em seguida foi incubado imediatamente a 50 °C por 30 min. Após o período de incubação foi determinada a quantidade liberada de açúcares redutores totais pelo método do DNS adicionando-se 300 µL de reagente de DNS, e incubado a 100 °C por 5 min.. Após foi completado o volume com água destilada e homogeneizado, sendo registro da absorbância em espectrofotômetro a 540 nm. O equipamento foi zerado com o branco reacional, obtido nas mesmas condições da amostra, sendo que durante a reação a 50 °C no tubo haverá somente a solução de CMC em tampão. O branco reacional de enzima contendo o extrato enzimático em tampão foram reagidos com DNS e os valores obtidos das absorbâncias foram subtraídos dos valores das reações apropriadas.

A quantidade de glicose foi comparada entre equação da reta padrão e para a atividade enzimática de endoglucanases utilizando a equação abaixo:

$$Atividade(CMC) = \frac{0,185}{[E]_{para\ liberar\ 0,5\ mg\ de\ glicose}} U/mL$$

Na equação [E] é a concentração expressa de acordo com a diluição de enzima adicionada necessária para liberar 0,5 mg de glicose durante o tempo de reação. Para valores de glicose liberada encontrados abaixo de 0,5 mg de glicose no tempo de reação, mesmo tendo utilizado o extrato enzimático não diluído, a atividade endoglucanásica foi calculada conforme equação abaixo:

$$Atividade(CMC) = mgdeglicoseliberada \times 0,37 \text{ U/mL}$$

5.12. Determinação de atividade β -glicosidase

A atividade β -glicosidase foi quantificada seguindo o protocolo de Ghose (1987), utilizando 50 μ L de celobiose dissolvida em tampão citrato pH 4,8. A solução de celobiose foi adicionada em microtubos tipo Eppendorf® de 2 mL, contendo 50 μ L de extrato enzimático diluído no mesmo tampão. Em seguida, os tubos foram agitados em vórtex e incubados a 50 °C por 30 min. Decorrido o tempo de incubação, foi determinada a concentração de glicose liberada utilizando o KIT GOD (glicose oxidase) seguindo-se instruções do fabricante. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 500 nm, sendo o branco utilizado para zerar o equipamento. A equação abaixo foi utilizada para calcular a atividade enzimática β -glicosidase, sendo que [E] é a concentração expressa de acordo com a diluição de enzima adicionada necessária para liberar 1,0 mg de glicose durante o tempo de reação:

$$Atividade(Beta - glico) = \frac{0,0926}{[E]_{\text{para liberar 1,0 mg de glicose diluição crítica}}} \text{ U/mL}$$

5.13. Análise de dados

Os ensaios de formação de halo de degradação em meio contendo carboximetilcelulose (CMC) foram realizados em quadruplicata, sendo os resultados expressos a partir da média das repetições para cada bactéria avaliada. Os valores do índice enzimático (IE) foram inicialmente

submetidos à análise estatística descritiva, com o objetivo de caracterizar a distribuição e a variabilidade dos dados, incluindo o cálculo de médias e desvios-padrão. Posteriormente, os dados foram submetidos à teste t de Student para amostras independentes, com o objetivo de comparar os valores de IE entre as rizobactérias associadas às diferentes espécies de plantas hospedeiras (*Pueraria phaseoloides* e *Inga edulis*), bem como em relação aos diferentes locais de coleta. Os isolados que apresentaram maiores valores de IE foram considerados detentores de maior potencial biotecnológico e selecionados para etapas posteriores, incluindo a identificação taxonômica por meio de análises moleculares, visando à caracterização dos microrganismos com maior atividade celulolítica. Os dados obtidos nos ensaios de atividade enzimática (Fpase, CMCase e β -glicosidase) também foram analisados por meio de estatística descritiva com determinação dos desvios-padrão para todos os conjuntos de dados. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando os softwares BioEstat® versão 5.3 e ORIGIN® versão 8.0, adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$) para todos os testes.

6. RESULTADOS

6.1. Avaliação da produção de enzimas celulolíticas das rizobactérias

Foram reativadas e avaliadas 86 rizobactérias, sendo 54 isolados (62,8%) apresentaram formação de halo de hidrólise, indicando atividade celulolítica (Tabela 4). Em meio contendo CMC, os halos de hidrólise formados pelas rizobactérias apresentaram índices enzimáticos variando de 1,1 a 5,0.

Do total de rizobactérias que formaram halos de degradação, 40 (74,1%) apresentaram índice enzimático (IE) igual ou superior a 2,0, sendo classificadas como potenciais produtoras de celulasas. Os valores de índice enzimático foram obtidos a partir de avaliações realizadas em quadruplicata, sendo calculadas as médias e os respectivos desvios-padrão para cada isolado. Os resultados referentes à formação dos halos de hidrólise, bem como os valores individuais de índice enzimático, média e desvio-padrão, estão apresentados na Tabela 4, juntamente com a identificação da planta hospedeira, da qual cada rizobactéria foi isolada. A representação visual da atividade celulolítica das rizobacterias com maior potencial enzimático observadas no ensaio com CMC encontra-se ilustrada na Figura 7.

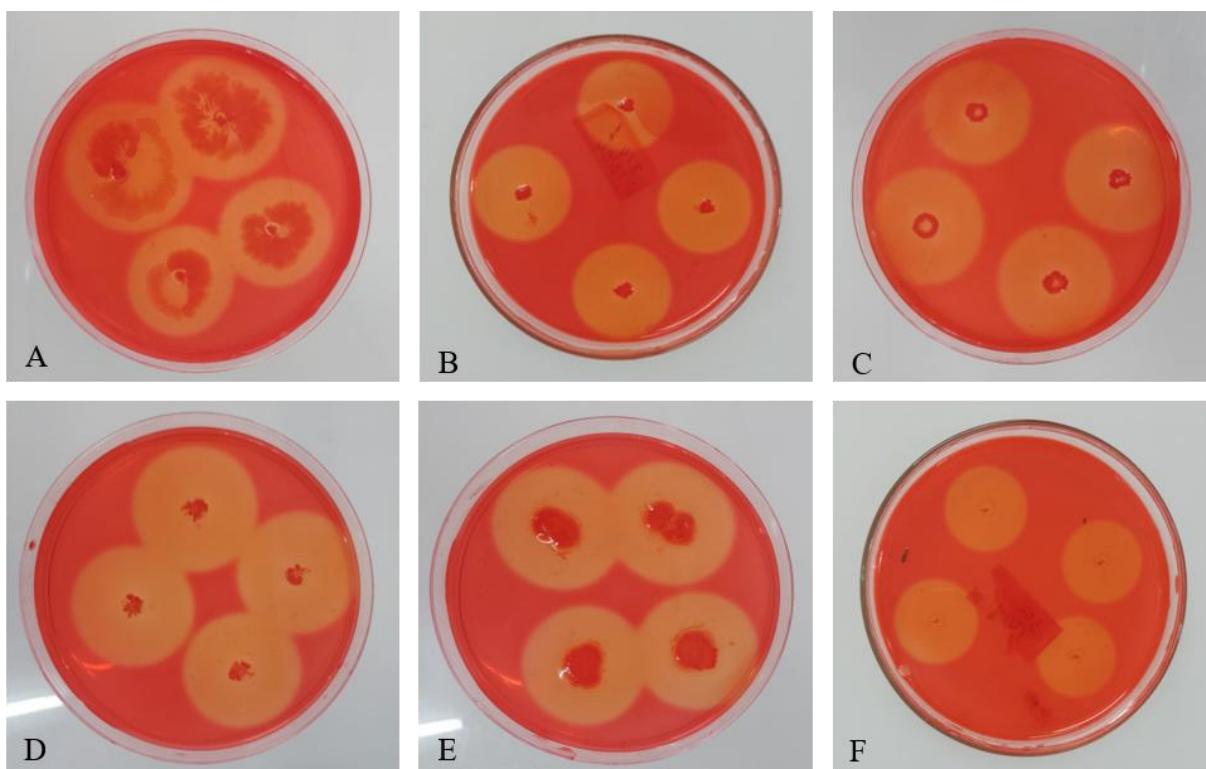


Figura 7. Placas de Petri contendo meio com CMC como principal fonte de carbono para avaliação da degradação de celulose. A zona clara ao redor das colônias corresponde ao halo de degradação das respectivas rizobactérias avaliadas: A. INPA-R583; B. INPA-R314; C. INPA-R 779; D. INPA-R774; E. INPA-R762 e F. CONTROLE (INPA-R302).

Quando comparadas, as médias do Índice Enzimático (IE), não foi observado diferença entre os valores médios, indicando uma distribuição relativamente homogênea do potencial celulolítico entre os isolados selecionados (Tabela 4). Ainda assim, foi possível identificar linhagens com maior destaque na produção de enzimas celulolíticas, sobretudo aquelas com IE médio superior a 4,0.

A rizobactéria INPA R583, isolada de *Pueraria phaseoloides* (feijão-bravo), apresentou o maior IE médio ($5,00 \pm 1,25$), evidenciando elevado potencial para degradação de celulose. Apesar da variabilidade observada entre as repetições, refletida pelo desvio padrão relativamente alto, todos os valores individuais permaneceram acima do limiar de seleção ($IE > 2,0$), reforçando sua capacidade celulolítica consistente. Resultados semelhantes foram observados para os isolados INPA R314 (*Indigofera* sp.) e INPA R779 (*P. phaseoloides*), com IE médios de $4,56 \pm 1,50$ e $4,51 \pm 0,47$, respectivamente, indicando desempenho enzimático elevado e estável, especialmente no caso de INPA R779, que apresentou menor variabilidade entre as repetições.

Outros isolados oriundos de *P. phaseoloides*, como INPA R774, INPA R762, INPA R741 e INPA R746, também apresentaram IE médios entre 3,50 e 4,18, confirmando que essa planta hospedeira concentrou um número expressivo de rizobactérias com alto potencial celulolítico. Entre os isolados provenientes de *Inga edulis*, destacaram-se INPA R1001, INPA R178, INPA R792 e INPA R276, com IE médios variando de 3,44 a 3,80, demonstrando potencial celulolítico moderado a elevado. Isolados de outras plantas hospedeiras, como *Rhynchosia phaseoloides*, *Desmodium ovalifolium*, *Mimosa pudica* e *Tephrosia cinerea*, também apresentaram IE superiores a 3,0, como INPA R302, INPA R685, INPA R341 e INPA R713.

Rizobactérias com IE médio entre 2,0 e 3,0 constituíram a maior parte dos isolados avaliados, sendo consideradas moderadamente celulolíticas. Apesar do menor desempenho relativo, essas linhagens ainda atenderam ao critério mínimo de seleção (IE > 2,0), demonstrando capacidade de produzir celulasas em meio contendo CMC como única fonte de carbono. A maioria das rizobactérias apresentou atividade celulolítica, com destaque para isolados associados a *Pueraria phaseoloides*.

Tabela 4 - Atividade celulolítica de rizobactérias e suas respectivas plantas hospedeiras, cultivadas em meio sintético com carboximetilcelulose (CMC) por 4 dias a 28 °C. IE = índice enzimático; dh – diâmetro do halo/dc- diâmetro da colônia. O índice enzimático foi calculado para cada repetição do teste, sendo destacadas em negrito as médias > 2,0 com potencial enzimático.

Plantas isca	Teste de Gram	Rizobactéria	IE dh/dc 1	IE dh/dc 2	IE dh/dc 3	IE dh/dc 4	IE média	Desvio padrão
<i>Pueraria</i>								
<i>phaseoloides</i> (Feijão Bravo)	-	INPA R583	6,36	4,57	5,58	3,49	5,00	1,25
<i>Indigofera</i> sp. (Timbó)	-	INPA R314	4,32	4,35	6,58	2,97	4,56	1,50
<i>Pueraria</i>								
<i>phaseoloides</i> (Feijão Bravo)	-	INPA R779	4,09	4,70	5,08	4,19	4,51	0,47

<i>Pueraria</i>								
<i>phaseoloides</i>	-	INPA R774	5,09	3,57	4,15	3,90	4,18	0,65
(Feijão Bravo)								
<i>Pueraria</i>								
<i>phaseoloides</i>	-	INPA R762	3,73	4,58	3,60	3,95	3,96	0,44
(Feijão Bravo)								
<i>Rhynchosia</i>								
<i>phaseoloides</i>	+	INPA R302	3,21	3,93	3,55	4,62	3,83	0,60
(Tento)								
<i>Inga edulis</i> (Ingá)	-	INPA R1001	3,99	3,30	4,23	3,68	3,80	0,40
<i>Tephrosia cinera</i>	-	INPA R713	4,17	5,36	1,29	4,37	3,80	1,75
(Anil bravo)								
<i>Inga edulis</i> (Ingá)	-	INPA R178	3,94	3,34	4,42	3,25	3,74	0,55
<i>Desmodium</i>								
<i>ovalifolium</i>	-	INPA R685	3,65	3,62	2,71	4,70	3,67	0,81
(Desmódio)								
<i>Mimosa pudica</i>	-	INPA R341	4,00	4,20	3,48	2,96	3,66	0,56
(Dormçe-dorme)								
<i>Swartzia</i>	-	INPA R666	3,98	3,87	3,15	3,55	3,64	0,37
<i>polyphylla</i> (Arabá)								
<i>Pueraria</i>	-	INPA R741	3,84	3,97	3,20	3,35	3,59	0,37
<i>phaseoloides</i>								
(Feijão Bravo)								
<i>Pueraria</i>	-	INPA R746	3,57	3,46	3,75	3,23	3,50	0,22
<i>phaseoloides</i>								
(Feijão Bravo)								
<i>Inga edulis</i> (Ingá)	-	INPA R792	3,88	2,56	3,87	3,66	3,49	0,63
<i>Inga edulis</i> (Ingá)	-	INPA R276	3,72	4,26	2,02	3,77	3,44	0,98
<i>Inga edulis</i> (Ingá)	+	INPA R233	3,54	3,43	3,38	3,26	3,40	0,12
<i>Indigofera</i> sp.	-	INPA R318	2,88	2,31	5,73	2,35	3,32	1,63
(Timbó)								

<i>Rhynchosia</i>								
<i>phaseoloides</i>	-	INPA R267	3,19	3,14	3,26	3,50	3,27	0,16
(Tento)								
<i>Inga edulis</i> (Ingá)	+	INPA R296	2,95	2,83	3,93	3,00	3,18	0,51
<i>Pueraria</i>								
<i>phaseoloides</i>	-	INPA R735	2,18	3,08	4,27	3,17	3,17	0,86
(Feijão Bravo)								
<i>Desmodium</i>								
<i>ovalifolium</i>	-	INPA R692	3,35	3,00	3,08	3,09	3,13	0,15
(Desmódio)								
<i>Tephrosia cinera</i>	-	INPA R332	2,86	2,57	3,70	3,01	3,04	0,48
(Anil bravo)								
<i>Pueraria</i>								
<i>phaseoloides</i>	-	INPA R757	2,99	2,61	3,41	2,73	2,94	0,35
(Feijão Bravo)								
<i>Inga heterophylla</i>	-	INPA R401	2,82	3,05	2,83	2,57	2,82	0,20
<i>Inga edulis</i> (Ingá)	-	INPA R236	3,07	2,72	2,81	2,39	2,75	0,28
<i>Pueraria</i>								
<i>phaseoloides</i>	-	INPA R565	2,82	3,34	2,38	2,25	2,70	0,49
(Feijão Bravo)								
<i>Pueraria</i>								
<i>phaseoloides</i>	-	INPA R764	2,57	2,90	2,82	2,41	2,67	0,22
(Feijão Bravo)								
<i>Inga edulis</i> (Ingá)	-	INPA R729	2,32	2,85	2,87	2,64	2,67	0,25
<i>Rhynchosia</i>								
<i>phaseoloides</i>	-	INPA R300	5,73	2,23	2,63	0,00	2,65	2,36
(Tento)								
<i>Oxalis acetosella</i>	-	INPA R287	2,38	2,37	2,45	3,25	2,61	0,43
(Trevinho)								
<i>Pueraria</i>								
<i>phaseoloides</i>	-	INPA R571	3,21	1,97	2,05	3,07	2,58	0,66
(Feijão Bravo)								

<i>Rhynchosia</i>								
<i>phaseoloides</i>	-	INPA R273	2,66	2,40	2,42	2,38	2,46	0,13
(Tento)								
Indigofera sp.	-	INPA R316	1,72	3,94	1,33	2,88	2,46	1,18
(Timbó)								
<i>Inga edulis</i> (Ingá)	-	INPA R722	2,54	1,99	2,27	2,94	2,44	0,40
Indigofera sp.	-	INPA R315	3,61	1,92	2,02	2,20	2,44	0,79
(Timbó)								
<i>Inga edulis</i>	-	INPA R274	1,53	2,21	2,63	2,65	2,26	0,52
<i>Oxalis acetosella</i>	-	INPA R307	1,95	2,13	2,50	2,16	2,18	0,23
(Trevinho)								
<i>Pueraria</i>								
<i>phaseoloides</i>	-	INPA R555	2,13	3,50	0,00	3,01	2,16	1,55
(Feijão Bravo)								
<i>Inga edulis</i> (Ingá)	-	INPA R266	2,31	1,62	2,08	2,24	2,06	0,31
<i>Pueraria</i>								
<i>phaseoloides</i>	-	INPA R552	2,47	2,54	1,03	1,87	1,98	0,70
(Feijão Bravo)								
<i>Vigna</i>								
<i>unquiculata</i>	-	INPA R613	1,30	1,48	3,28	1,46	1,88	0,94
(Feijão Caupi)								
<i>Inga edulis</i> (Ingá)	-	INPA R046	2,20	1,41	1,36	2,04	1,75	0,43
<i>Inga edulis</i> (Ingá)	-	INPA R262	1,72	1,68	1,72	1,78	1,72	0,04
<i>Rhynchosia</i>								
<i>phaseoloides</i>	-	INPA R265	1,80	1,41	1,50	1,47	1,55	0,17
(Tento)								
<i>Oxalis acetosella</i>	-	INPA R283	1,10	1,08	1,48	2,10	1,44	0,48
(Trevinho)								
Solo floresta	-	INPA R014	1,05	1,42	1,49	1,32	1,32	0,19
<i>Mimosa pudica</i>	-	INPA R269	1,35	1,29	1,35	1,20	1,30	0,07
(Dorme-dorme)								
<i>Inga edulis</i> (Ingá)	-	INPA R034	1,27	1,32	1,34	1,26	1,30	0,04

<i>Mimosa pudica</i> (Dorme-dorme)	-	INPA R270	1,18	1,27	1,21	1,51	1,29	0,15
<i>Tephrosia cinera</i> (Anil bravo)	-	INPA R715	1,24	1,24	1,30	1,26	1,26	0,03
Solo floresta	-	INPA R015	1,31	1,16	1,09	1,18	1,19	0,09
<i>Pueraria</i> <i>phaseoloides</i> (Feijão Bravo)	-	INPA R699	1,17	1,09	1,12	1,08	1,12	0,04
Solo floresta	-	INPA R028	1,12	1,11	1,09	1,12	1,11	0,01

6.2. Avaliação de plantas hospedeiras para a bioprospecção de rizobactérias com atividade celulolítica

Com base em estudos anteriores (Cáuper, 2018; Costa, 2017; Oliveira et al., 2022; Vaz, 2013) e resultados dos ensaios enzimáticos qualitativos, observou-se que duas espécies de plantas podem ser fontes para isolamento de bactérias com potencial celulolítico. As espécies de plantas hospedeiras *P.phaseoloides* (Feijão Bravo) e *I. edulis* (Ingá), foram comparadas quanto a associação de rizobacterias celulolíticas. Foram avaliadas um total de 50 isolados rizobacterianos cresceram em meio YMA e foram avaliados quanto à sua capacidade de produzir enzimas degradadoras de celulose, sendo avaliadas 24 isolados de nódulos radiculares de *P.phaseoloides* e 26 de *I. edulis*. A formação de halos de degradação foi observada em 31 cepas (62%). Em meio CMC, os isolados produziram halos de hidrólise com valores de índice enzimático (IE) variando de 1,0 a 5,57. Dentre estes, 22 rizobactérias foram consideradas potenciais produtoras de celulase, uma vez que apresentaram valores de índice enzimático (IE) $\geq 2,0$ (Tabela 5).

Tabela 5. Rizobactérias celulolíticas isoladas de *Pueraria phaseoloides* e *Inga edulis* na região central da Amazônia brasileira. *IE = índice enzimático (média $\pm$ DP, n = 3).

Plantas hospedeiras	Rizobacterias	Coloração de Gram	IE*
<i>Pueraria phaseoloides</i> (Roxb.) Benth.	INPA R583	-	5.57 $\pm$ 0.62

<i>Pueraria phaseoloides</i> (Roxb.) Benth.	INPA R779	-	4.69 ± 0.27
<i>Pueraria phaseoloides</i> (Roxb.) Benth.	INPA R774	-	4.14 ± 0.62
<i>Pueraria phaseoloides</i> (Roxb.) Benth.	INPA R762	-	3.94 ± 0.44
<i>Pueraria phaseoloides</i> (Roxb.) Benth.	INPA R741	-	3.84 ± 0.58
<i>Pueraria phaseoloides</i> (Roxb.) Benth.	INPA R746	-	3.56 ± 0.14
<i>Inga edulis</i> Mart.	INPA R233	+	3.38 ± 0.08
<i>Pueraria phaseoloides</i> (Roxb.) Benth.	INPA R571	-	3.34 ± 0.11
<i>Inga edulis</i> Mart.	INPA R1001	-	3.29 ± 0.11
<i>Pueraria phaseoloides</i> (Roxb.) Benth.	INPA R555	-	3.21 ± 0.24
<i>Pueraria phaseoloides</i> (Roxb.) Benth.	INPA R735	-	3.16 ± 1.04
<i>Pueraria phaseoloides</i> (Roxb.) Benth.	INPA R757	-	2.99 ± 0.36
<i>Inga edulis</i> Mart.	INPA R296	+	2.94 ± 0.08
<i>Inga edulis</i> Mart.	INPA R178	-	2.94 ± 0.31
<i>Pueraria phaseoloides</i> (Roxb.) Benth.	INPA R764	-	2.89 ± 0.13
<i>Pueraria phaseoloides</i> (Roxb.) Benth.	INPA R565	-	2.82 ± 0.46
<i>Inga edulis</i> Mart.	INPA R236	-	2.71 ± 0.22
<i>Inga edulis</i> Mart.	INPA R729	-	2.64 ± 0.26
<i>Inga edulis</i> Mart.	INPA R792	-	2.56 ± 0.91
<i>Pueraria phaseoloides</i> (Roxb.) Benth.	INPA R552	-	2.46 ± 0.56
<i>Inga edulis</i> Mart.	INPA R266	-	2.07 ± 0.32
<i>Inga edulis</i> Mart.	INPA R276	-	2.02 ± 0.15

<i>Inga edulis</i> Mart.	INPA R722	-	1.90 ± 0.10
<i>Inga edulis</i> Mart.	INPA R261	-	1.71 ± 0.01
<i>Inga edulis</i> Mart.	INPA R274	-	1.53 ± 0.21
<i>Inga edulis</i> Mart.	INPA R046	-	1.36 ± 0.11
<i>Inga edulis</i> Mart.	INPA R034	-	1.31 ± 0.03
<i>Pueraria phaseoloides</i> (Roxb.) Benth.	INPA R699	-	1.11 ± 0.04
<i>Pueraria phaseoloides</i> (Roxb.) Benth.	INPA R547	-	1 ± 0
<i>Inga edulis</i> Mart.	INPA R721	-	1 ± 0.57
<i>Inga edulis</i> Mart.	INPA R293	-	1 ± 0

Com base no teste de normalidade de Lilliefors, verificou-se que a distribuição dos dados apresentou um padrão normal ao comparar as espécies vegetais e as bactérias isoladas, uma vez que o valor de p não foi significativo (ns). De forma consistente, o teste de Shapiro–Wilk também indicou distribuição normal dos dados, visto que os valores de p foram superiores a 0,05, especificamente acima de 0,3 para ambos os índices enzimáticos analisados.

As bactérias isoladas de *P. phaseoloides* apresentaram uma média de IE = 3,25 ($\pm 1,19$), maior capacidade de produzir enzimas celulolíticas quando comparadas àquelas isoladas de *I. edulis*, com média de IE = 2,15 ($\pm 0,79$). Quando comparamos os IE das bactérias isoladas nas diferentes plantas, observamos uma diferença estatisticamente significativa ($t = 3,05$; $gl = 29$; $p = 0,0048$), confirmando a hipótese alternativa de que existe uma diferença significativa na produção enzimática entre isolados bacterianos provenientes de diferentes plantas hospedeiras. Portanto, esses resultados sugerem que a planta hospedeira pode exercer influência direta sobre o perfil funcional das comunidades microbianas associadas.

Estudos com *P. phaseoloides* indicam que essa espécie leguminosa abriga uma diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio, destacando seu potencial para enriquecer o solo com nitrogênio biologicamente disponível (Wedage et al., 2019). O valor de p utilizado neste teste inferencial foi bicaudal, uma vez que o resultado poderia indicar três possíveis desfechos: (i) isolados de *P. phaseoloides* mais eficientes, (ii) isolados de *I. edulis* mais eficientes ou (iii) ausência de diferença significativa entre os grupos. Em um nível de confiança de 95%, a diferença média de IE entre os dois grupos foi de -1,1025, com intervalo de confiança (IC) variando de -1,8415 a -0,3634.

6.3. Coloração de Gram

De acordo com a coloração de Gram, a grande maioria das rizobactérias apresentou coloração rósea, sendo portanto, Gram negativas. Apenas os isolados INPA R302 (controle), INPA R296 e INPA R233 apresentaram coloração roxa (Gram positiva). Korpole et al. (2011) e Alves et al. (2021), caracterizaram bactérias produtoras de celulase capazes de degradar carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono como Gram positivas. Entretanto, estudos relacionados a rizobactérias amazônicas tendem a apresentar coloração Gram negativa (VAZ, 2013; COSTA, 2017; CÁUPER, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2022), uma vez que foram isoladas de nódulos de leguminosas e são consideradas como rizóbios.

Os resultados de coloração da Gram estão descritos na tabela 4 e figura 8, que também representam as principais rizobactérias com potencial enzimático. Na coloração de Gram, foi observado que as rizobactérias avaliadas, apresentaram os tipos morfológicos de cocos (Figura 7C, 7D, 7E) e a maioria, bastonetes com disposições de diplobacilos e estreptobacilos (Figura 7A, 7B, 7F, 7G, 7H). A partir desses resultados, selecionamos rizobactérias para a realização dos ensaios enzimáticos de determinação das celulases: INPA-R583, Gram negativa, bastonete com estreptobacilos e com maior IE= 5,57; INPA R-774, Gram negativa, cocos e IE= 4.14 e INPA R-762, Gram negativa, cocos e IE= 3,95. Também foi realizada a identificação molecular de INPA-R302, gram positiva, bastonete com dibacilos e IE= 3,83, sendo considerada o controle para comparação na determinação da atividade enzimática de Fpase, endoglucanases e beta-glucosidases.

As rizobactérias selecionadas apresentaram coloração de Gram e aspectos morfológicos distintos, sendo considerados, até o momento, características para avaliá-las em monocultivo. Entretanto, há necessidade de mais parâmetros de seleção após os resultados obtidos nos ensaios de determinação de cada enzima em monocultivo. A partir desses resultados, as rizobactérias em co-cultivos foram agrupadas para avaliar produção das enzimas como complexo de celulases que funcionarão em sinergia entre as rizobactérias.

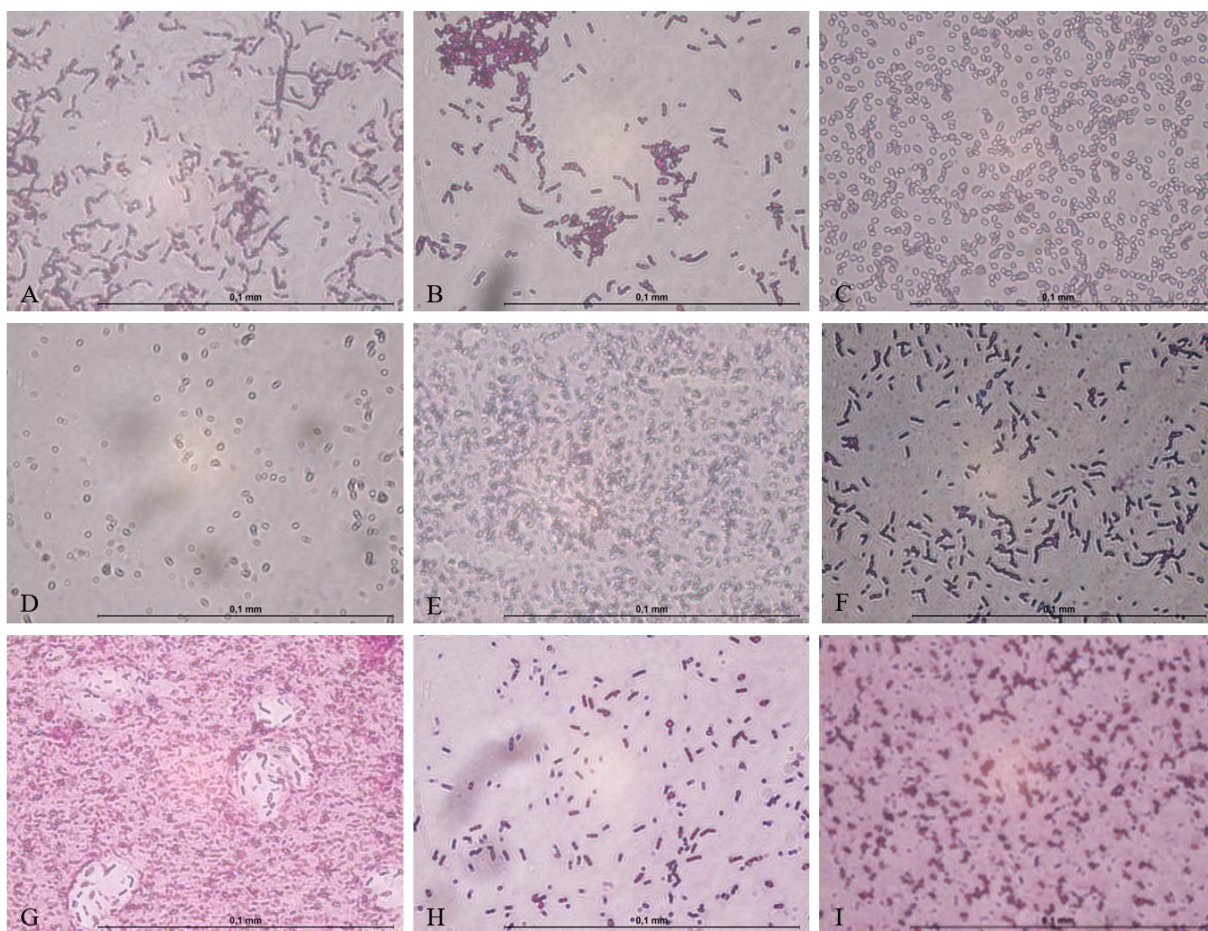


Figura 8. A coloração de Gram das nove rizobactérias com maiores IE para produção de celulase, sendo possível observar tipos morfológicos e arranjos: A. INPA-R583; B. INPA-R314; C. INPA-R 779; D. INPA-R774; E. INPA-R762 e F. INPA-R302; G. INPA-R1001; H. INPA-R178; I. INPA-R741.

6.4. Análise molecular

A extração de DNA genômico foi realizada a partir de seis isolados de rizobactérias que apresentaram os maiores IE para a produção de celulases. Após a extração, o rendimento e a qualidade do DNA obtido foram avaliados por espectrofotometria utilizando o equipamento Nanodrop™. As amostras de DNA (5 µL de cada) foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 0,5%, sendo distribuídas nos poços do gel na seguinte ordem: 2. INPA-R302 (controle); 4. INPA-R314; 6. INPA-R762; 8. INPA-R583; 10. INPA-R583B; 12. INPA-R774; e 13. INPA-R779 (Figura 8). De modo geral, as extrações apresentaram bons rendimentos e adequada integridade do material genético, conforme evidenciado pelo padrão de bandas observadas na eletroforese (Figura 8).

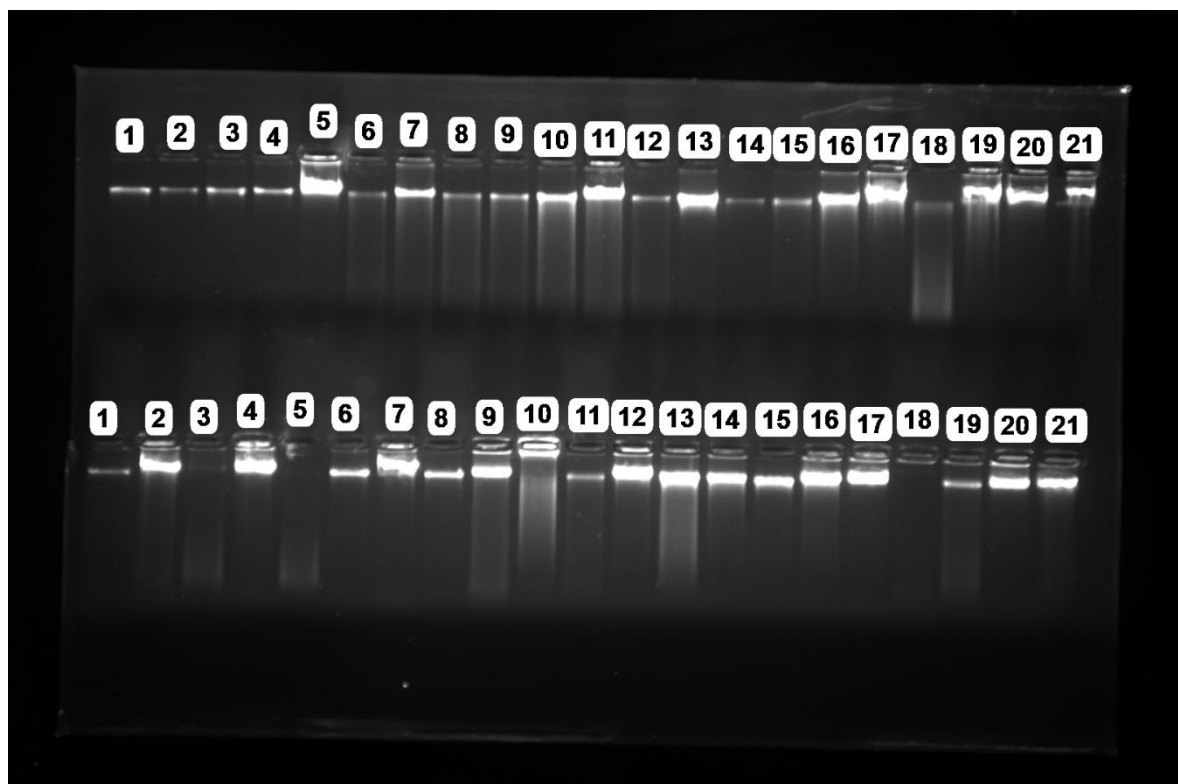


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose das rizobactérias com maiores IE para a produção de celulases. As amostras de DNA (5 μ L de cada) foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 0,5% e estão distribuídas nos poços do gel na seguinte ordem numérica: 2. INPA-R302 (Controle); 4. INPA-R314; 6. INPA-R762; 8. INPA-R583; 10. INPA-R583B; 12. INPA-R774 e 13. INPA-R 779.

As concentrações de DNA variaram entre 54,6 e 1.118,8 ng/ μ L (Tabela 6), indicando variação no rendimento entre as amostras, o que é esperado em extrações provenientes de diferentes isolados bacterianos. Apesar dessa variação, todas as amostras apresentaram qualidade satisfatória para análises moleculares subsequentes. As razões de absorbância 260/280 nm e 260/230 nm, utilizadas como indicadores de pureza do DNA, permaneceram dentro dos valores considerados ideais para DNA genômico (entre 1,8 e 2,2), sugerindo baixa contaminação por proteínas, fenóis ou outros compostos orgânicos.

Tabela 6 - Amostras de DNA quantificadas em equipamento Nanodrop das seis rizobactérias com maiores IE.

Identificação	Amostra	Nanodrop™ (ng/μL)	Absorbância (nm) Pureza DNA (260/280)	Absorbância (nm) Pureza DNA (260/230)
2	R302	1118,8	2,1	2,08
4	R314	948,4	2,06	2,05
6	R762	1014,6	2,1	2,12
8	R583.1	1020,9	2,14	2,03
10	R583.2	54,6	1,93	1,99
12	R774	89	1,91	1,98
13	R779	59,9	1,91	1,99

6.5. Taxonomia

A identificação molecular dos seis isolados bacterianos com maiores índices enzimáticos (IE) $\geq 2,0$ revelou a predominância de espécies pertencentes ao gênero *Bacillus* (Tabela 7). Os isolados INPA R-583, INPA R-779 e INPA R-774 foram identificados como *Bacillus* spp., apresentando percentuais de similaridade de 99.39%, 90.91% e 98.39%, respectivamente, quando comparados às sequências depositadas nos bancos de dados NCBI e UNITE. O isolado INPA R-762 foi identificado como *Bacillus* sp. 3, com similaridade de 97.55% em relação às sequências de referência disponíveis nesses bancos de dados.

Os isolados INPA R-583, INPA R-779, INPA R-774 e INPA R-762 foram todos obtidos da rizosfera de *P. phaseoloides* e apresentaram elevados índices enzimáticos, indicando alto potencial para a produção de enzimas celulolíticas. Além dos isolados provenientes de *P. phaseoloides*, outros isolados com índices enzimáticos elevados também foram identificados. O isolado INPA R-314, obtido de *Indigofera* sp., foi identificado como *Bacillus* sp., apresentando 91,33% de similaridade com sequências de referência. Já o isolado INPA R-302 selecionado como controle, isolado da rizosfera de *Rhynchosia phaseoloides*, foi identificado como *Bacillus* sp. 4, exibindo o maior percentual de similaridade entre os isolados analisados (95,19%), o que confere maior robustez à sua identificação taxonômica.

Os resultados da identificação molecular indicam que espécies do gênero *Bacillus* estão fortemente associadas às plantas hospedeiras analisadas e apresentam elevado potencial funcional relacionado à produção de enzimas celulolíticas, reforçando a importância desse gênero bacteriano em estudos voltados à bioprospecção de microrganismos com aplicações biotecnológicas. Dentre as identificações,

os isolados *Bacillus* sp.1 (INPA R-583), *Bacillus* sp. 2 (INPA R-774) e *Bacillus* sp. 3 (INPA R-762) tiveram os percentuais de similaridade acima de 97%, valor frequentemente adotado como limiar para identificação inequívoca em nível de espécie. Entretanto, utilizamos apenas gênero para maior confiabilidade taxonômica. Essas cepas também foram selecionadas para análises de atividade enzimática celulolítica mais detalhadas, por apresentar os maiores índice enzimático médio e coletadas isoladas em *P. phaseoloides*.

Tabela 7. Identificação molecular dos isolados que apresentaram índice enzimático $\geq 2,0$ após crescimento em meio sintético contendo carboximetilcelulose. IE = índice enzimático (média $\pm$ DP, n = 3); (*) = porcentagem de similaridade entre nossas sequências e aquelas disponíveis nos bancos de dados NCBI e UNITE.

Isolados	Plantas hospedeiras	Identificação	Identidade (*)	Nº de acesso
INPA R-583	<i>Pueraria phaseoloides</i>	<i>Bacillus</i> sp. 1	99.39%	<u>OP115602.1</u>
INPA R-779	<i>Pueraria phaseoloides</i>	<i>Bacillus</i> sp.	90.91%	<u>MN220534.1</u>
INPA R-774	<i>Pueraria phaseoloides</i>	<i>Bacillus</i> sp. 2	98.39%	<u>MG004175.1</u>
INPA R-762:	<i>Pueraria phaseoloides</i>	<i>Bacillus</i> sp. 3	97.55%	<u>CP021011.1</u>
INPA R-314	<i>Indigofera</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.	91.33%	OM978656.1
INPA R-302:	<i>Rhynchosia phaseoloides</i>	<i>Bacillus</i> sp. 4	95.19%	CP018197.1

6.6.Determinação da Atividade Enzimática Celulolítica

O apêndice A apresenta os valores sinérgicos de Fpase, CMCase e β -glicosidase produzida por *Bacillus* sp. 1 (INPA R-583), *Bacillus* sp. 2 (INPA R-774) e *Bacillus* sp. 3 (INPA R-762) em cultivos individuais, em diferentes combinações de co-cultivo, bem como pelo controle *Bacillus* sp. 4 (INPA R-302), ao longo de 240 h de fermentação. Os dados evidenciam diferenças entre os sistemas avaliados, tanto em relação à magnitude da produção enzimática quanto sinergia, destacando-se o efeito positivo dos co-cultivos quando comparados aos cultivos individuais e ao controle.

6.6.1. Determinação da Atividade de celulases totais – Fpase

Nos cultivos individuais, a produção de Fpase foi relativamente baixa e apresentou variações discretas ao longo do tempo. *B. sp. 1* (INPA R-583) mostrou o menor desempenho, com atividade inicial de 0,031 U/mL em 24 h e valor máximo em 48 h (0,033 U/mL), seguido por uma redução gradual até 120 h, quando atingiu 0,024 U/mL (Apêndice A). A partir desse

ponto, a atividade permaneceu praticamente constante até 240 h, indicando limitada capacidade de manutenção da produção enzimática. *B. sp. 2* (INPA R-774) apresentou comportamento semelhante, porém com valores ligeiramente superiores, atingindo atividade máxima de 0,038 U/mL em 48 h, cerca de 15% maior que a observada para INPA R-583. Após esse pico, houve queda progressiva, com estabilização entre 0,028 e 0,034 U/mL nos tempos finais (Apêndice A). Entre os cultivos individuais, *B. sp. 3* (INPA R-762) apresentou o melhor desempenho, alcançando 0,038 U/mL em 48 e 168 h e mantendo valores relativamente mais constantes ao longo do experimento. A comparação entre os cultivos individuais das linhagens *B. sp. 1* (INPA R-583), *B. sp. 2* (INPA R-774) e *B. sp. 3* (INPA R-762) com a bactéria controle *B. sp. 4* (INPA R-302) evidencia que as quatro bactérias apresentaram níveis semelhantes de produção de Fpase, com variações sutis ao longo do tempo e valores máximos concentrados entre 48 e 168 h de cultivo (Figura 10).

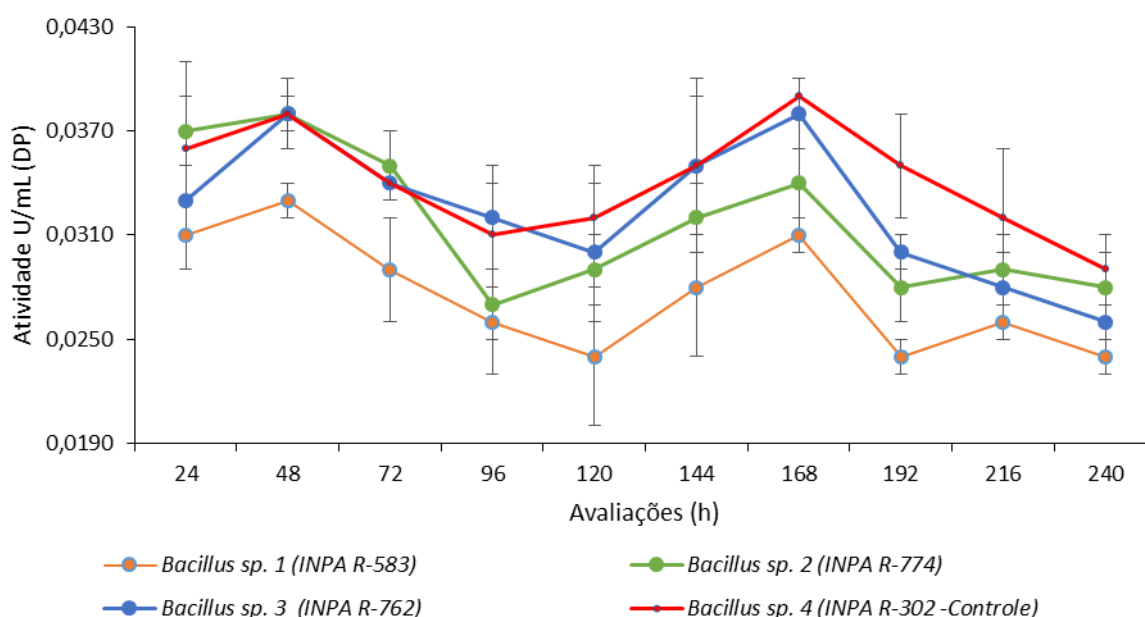


Figura 10. Atividade da enzima Fpase (U/mL) produzida por *Bacillus sp. 1* (INPA R-583), *Bacillus sp. 2* (INPA R-774), *Bacillus sp. 3* (INPA R-762) e *Bacillus sp. 4* (INPA R-302, controle) em cultivos individuais, ao longo de 240 h de fermentação. Os valores correspondem à média $\pm$ desvio-padrão (DP) de três repetições independentes ($n = 3$).

Em contraste, os co-cultivos promoveram aumentos expressivos na produção de Fpase, evidenciando efeito sinérgico entre as linhagens. O co-cultivo entre *B. sp. 2* (INPA R-774) e *B. sp. 3* (INPA R-762) destacou-se pela rápida indução da produção enzimática inicial em 24 h com atividade de 0,056 U/mL, valor aproximadamente 70% superior à média dos cultivos individuais nesse mesmo período (Apêndice B). O pico ocorreu em 48 h, com 0,064 U/mL,

representando um incremento de cerca de 68% em relação ao melhor cultivo individual. Entretanto, após esse período, observou-se redução acentuada da atividade, que se aproximou gradualmente dos níveis individuais a partir de 96–120 h, indicando um efeito sinérgico intenso, porém pouco sustentado ao longo do tempo. Já o co-cultivo entre *B. sp. 1* (INPA R-583) e *B. sp. 2* (INPA R-774) apresentou um perfil intermediário, com atividade máxima de 0,057 U/mL em 48 h, cerca de 50% superior aos valores máximos observados nos cultivos individuais (Apêndice B). Embora tenha ocorrido redução progressiva após esse pico, a produção manteve-se consistentemente acima dos cultivos individuais até aproximadamente 168 h, sugerindo um sinergismo moderado e relativamente estável entre essas duas linhagens (Figura 11).

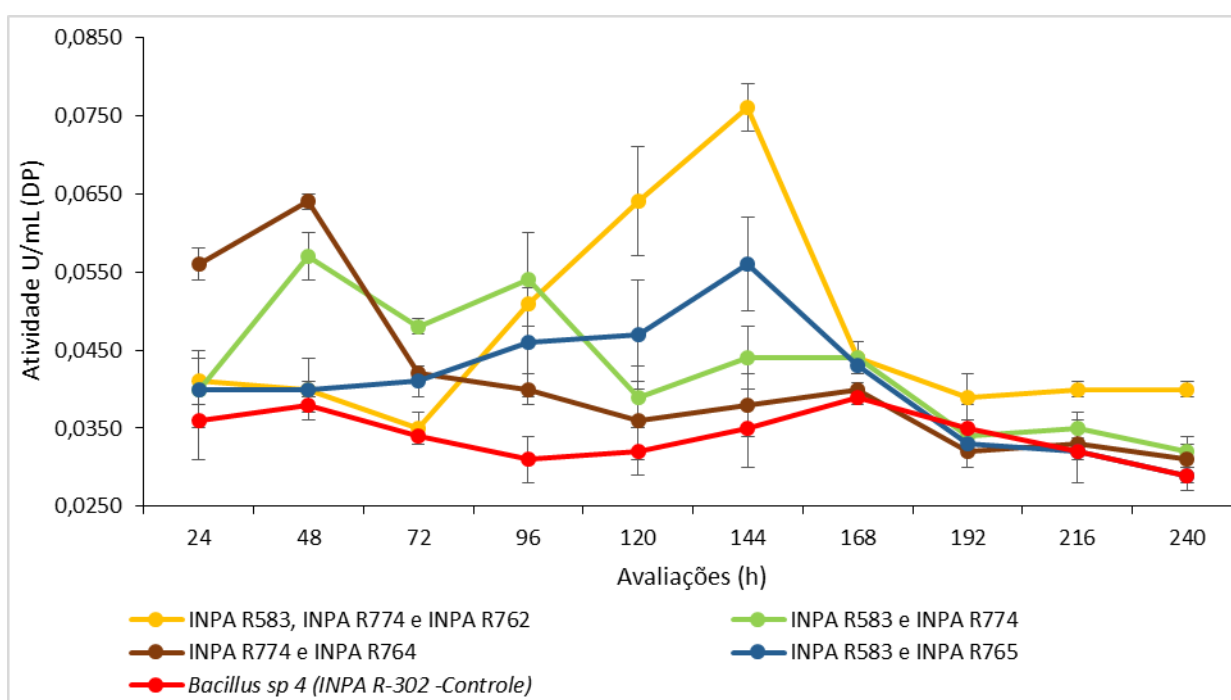


Figura 11. Atividade da enzima Fpase (U/mL) produzida em diferentes sistemas de co-cultivo de *Bacillus sp. 1* (INPA R-583), *Bacillus sp. 2* (INPA R-774), *Bacillus sp. 3* (INPA R-762) e *Bacillus sp. 4* (INPA R-302, controle), avaliados ao longo de 240 h de fermentação. Os valores correspondem à média $\pm$ desvio-padrão (DP) de três repetições independentes ($n = 3$).

O maior destaque foi observado no co-cultivo triplo envolvendo *B. sp. 1* (INPA R-583), *B. sp. 2* (INPA R-774) e *B. sp. 3* (INPA R-762). Esse sistema apresentou atividade inicial elevada em 24 h (0,041 U/mL) e aumento gradual ao longo do tempo, atingindo 0,064 U/mL em 120 h e o maior valor registrado em todo o estudo em 144 h (0,076 U/mL). Esse pico corresponde a aproximadamente o dobro da média observada nos cultivos individuais e a um incremento de cerca de 19% em relação ao melhor co-cultivo duplo. Mesmo após o pico, a

atividade permaneceu relativamente elevada até 240 h, variando em torno de 0,040–0,044 U/mL, o que demonstra maior estabilidade produtiva (Apêndice A).

Quando comparado os co-cultivos bacterianos e a bactéria controle *B. sp. 4* (INPA R-302), há uma diferença marcantes na produção de Fpase ao longo do tempo, confirmando que a associação entre linhagens promove ganhos significativos de atividade enzimática quando comparada ao cultivo isolados. Em conjunto, os resultados indicam que os cultivos individuais apresentam baixa e pouco duradoura produção de Fpase, enquanto os co-cultivos, especialmente o sistema triplo, favorecem tanto o aumento da atividade máxima quanto a manutenção da produção ao longo do tempo. Esses resultados reforçam que o grau de interação microbiana exerce papel determinante na eficiência da produção de Fpase, sendo o co-cultivo das três linhagens, uma estratégia mais promissora para aplicações biotecnológicas que demandem alta e estável produção enzimática provenientes de rizobactérias (Figura 11).

6.6.2. Determinação de Atividade endoglucanásica – CMCase

Nos cultivos individuais, todas as linhagens apresentaram produção de CMCase já nas primeiras 24 h, com valores próximos ou ligeiramente superiores ao controle (0,190 U/mL). *B. sp. 1* (INPA R-583) destacou-se inicialmente, apresentando a maior atividade em 24 h ($0,236 \pm 0,007$ U/mL), valor cerca de 24% superior ao do controle. Entretanto, após esse período, observou-se queda gradual da atividade, com estabilização entre 0,164 e 0,179 U/mL a partir de 96 h, valores inferiores aos do controle nos tempos finais (Apêndice C). Esse comportamento indica que, embora INPA R-583 apresente boa capacidade inicial de produção de CMCase, sua eficiência não é sustentada ao longo do cultivo quando comparada ao controle (Figura 12).

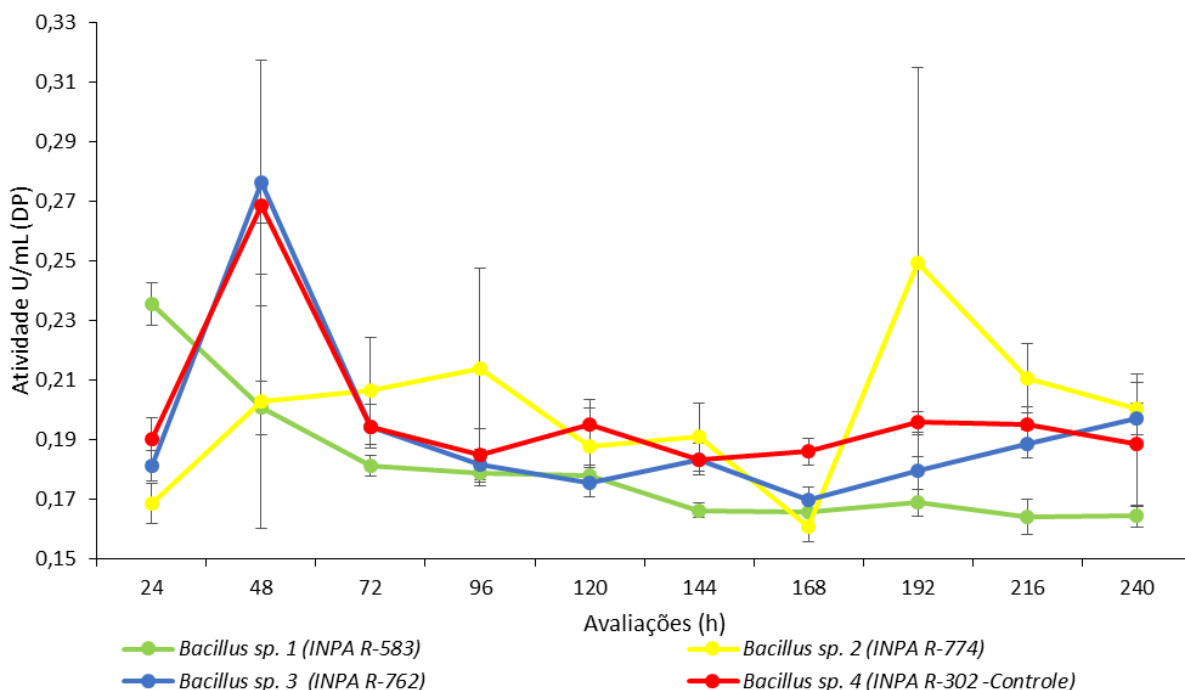


Figura 12. Atividade da enzima CMCase (U/mL) produzida por *Bacillus sp.1* (INPA R-583), *Bacillus sp. 2* (INPA R-774), *Bacillus sp. 3* (INPA R-762) e *Bacillus sp. 4* (INPA R-302, controle) em cultivos individuais, ao longo de 240 h de fermentação. Os valores correspondem à média $\pm$ desvio-padrão (DP) de três repetições independentes ($n = 3$).

O pico de produção ocorreu nos horários finais de avaliação, em 192 h ($0,249 \pm 0,065$ U/mL), valor aproximadamente 27% superior ao do controle no mesmo tempo ($0,196 \pm 0,004$ U/mL) (Apêndice C). Apesar desse aumento pontual, a atividade permaneceu próxima ou apenas ligeiramente superior à do controle na maior parte do experimento, indicando desempenho individual comparável, mas não significativamente superior. Já *B. sp. 3* (INPA R-762) apresentou perfil de produção mais estável ao longo de todo o período experimental. Em 48 h, atingiu $0,276 \pm 0,041$ U/mL, valor semelhante ao do controle ($0,269 \pm 0,006$ U/mL). Nos demais tempos, a atividade variou entre 0,170 e 0,197 U/mL, permanecendo muito próxima à do controle, sem apresentar aumentos expressivos (Figura 13). O controle *B. sp. 4* (INPA R-302) apresentou produção relativamente estável ao longo do cultivo. O maior valor foi observado em 48 h (0,269 U/mL), seguido por manutenção da atividade em torno de 0,185–0,196 U/mL até 240 h. Esse perfil estável torna o controle um bom parâmetro para comparação, evidenciando que as linhagens avaliadas individualmente não superaram de forma consistente a produção basal de CMCase apresentada por *B. sp. 4* (controle) (Apêndice C).

Nos co-cultivos, a quantidade de CMCase foi diferente, sendo observado valores de

maiores quando comparados aos cultivos individuais e controle. O co-cultivo triplo (INPA R-583 + INPA R-774 + INPA R-762) se destacou, pois teve uma atividade inicial semelhante à do controle em 24 e 48 h, porém a partir de 72 h ocorreu aumento progressivo da produção (Apêndice D). Em 120 h, a atividade atingiu $0,313 \pm 0,011$ U/mL e alcançou o pico em 144 h ($0,318 \pm 0,032$ U/mL), valores aproximadamente 70–74% superiores ao controle no mesmo período ($0,183$ U/mL). Mesmo após o pico, a atividade manteve-se igual ou superior à do controle até 240 h, demonstrando sinergismo efetivo e sustentado entre as três linhagens (Figura 13).

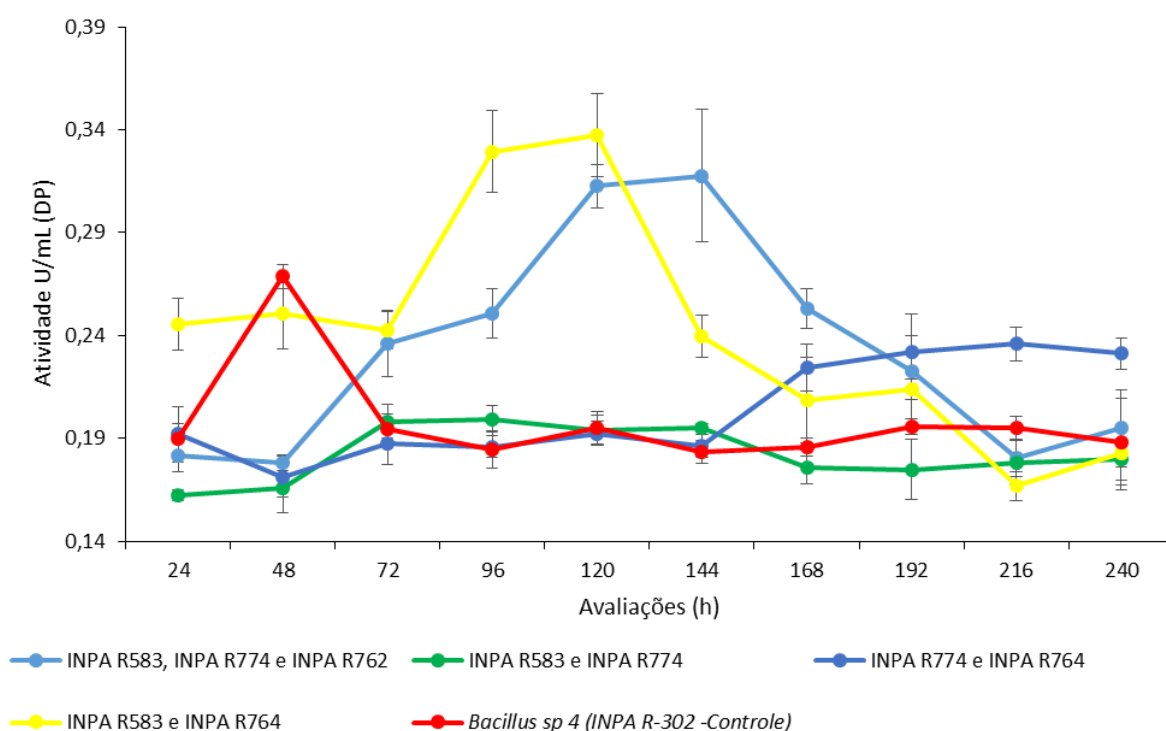


Figura 13. Atividade da enzima CMCase (U/mL) produzida em diferentes sistemas de co-cultivo de *Bacillus* sp. 1 (INPA R-583), *Bacillus* sp. 2 (INPA R-774), *Bacillus* sp. 3 (INPA R-762) e *Bacillus* sp. 4 (INPA R-302, controle), avaliados ao longo de 240 h de fermentação. Os valores correspondem à média $\pm$ desvio-padrão (DP) de três repetições independentes ($n = 3$).

O co-cultivo INPA R-583 + INPA R-774 produziram CMCase muito próximos aos do controle durante todo o experimento, variando entre 0,162 e 0,199 U/mL. Em nenhum dos tempos avaliados esse sistema superou significativamente o controle, indicando que a interação entre essas duas linhagens não favoreceu de maneira expressiva a produção de CMCase. O co-cultivo INPA R-774 + INPA R-764 foram inicialmente semelhante ou inferior à do controle, observou-se aumento nos tempos finais, com valores entre 0,224 e 0,236 U/mL entre 168 e 240

h, ligeiramente superiores aos do controle nesses períodos (Apêndice D). Ainda assim, o ganho foi moderado, sugerindo sinergismo limitado. O maior destaque entre os co-cultivos foi o sistema INPA R-583 + INPA R-764, que apresentou produção elevada desde os tempos iniciais. Esse co-cultivo atingiu $0,329 \pm 0,020$ U/mL em 96 h e o maior valor de todo o estudo em 120 h ($0,337 \pm 0,020$ U/mL), correspondendo a um aumento de aproximadamente 73% em relação ao controle no mesmo período ($0,195 \pm 0,008$ U/mL). Embora a atividade tenha diminuído após esse pico, manteve-se comparável ou superior à do controle até 240 h, evidenciando forte interação positiva entre essas linhagens (Figura 13).

De forma geral, a comparação com *Bacillus* sp. 4 (INPA R-302) demonstra que, enquanto os cultivos individuais apresentaram produção de CMCase semelhante ou inferior à do controle, alguns co-cultivos promoveram aumentos expressivos e prolongado da atividade enzimática. Em particular, o co-cultivo triplo e o co-cultivo INPA R-583 + INPA R-764 destacaram-se quando comparado ao controle e cultivos individuais, tanto em termos de valores máximos quanto de estabilidade ao longo do tempo. Esses resultados reforçam que a produção de CMCase pode ser realizada através de estratégias de co-cultivo, sendo uma abordagem promissora para potencializar a síntese dessa enzima em processos biotecnológicos.

6.6.3. Determinação de atividade β -glicosidase

Nos cultivos individuais, todos os isolados apresentaram produção inicial de β -glicosidase em 24 h, com valores entre 0,212 e 0,309 U/mL, próximos ou ligeiramente superiores ao controle (0,235 U/mL). *B. sp. 3* (INPA R-762) destacou-se nas fases iniciais do cultivo, apresentando a maior atividade em 24 h (0,309 U/mL), aproximadamente 31% superior à do controle. Em 48 e 72 h, esse isolado manteve valores elevados ($\approx 0,300$ – $0,332$ U/mL), semelhantes aos do controle, indicando desempenho equivalente nesse período inicial (Apêndice E).

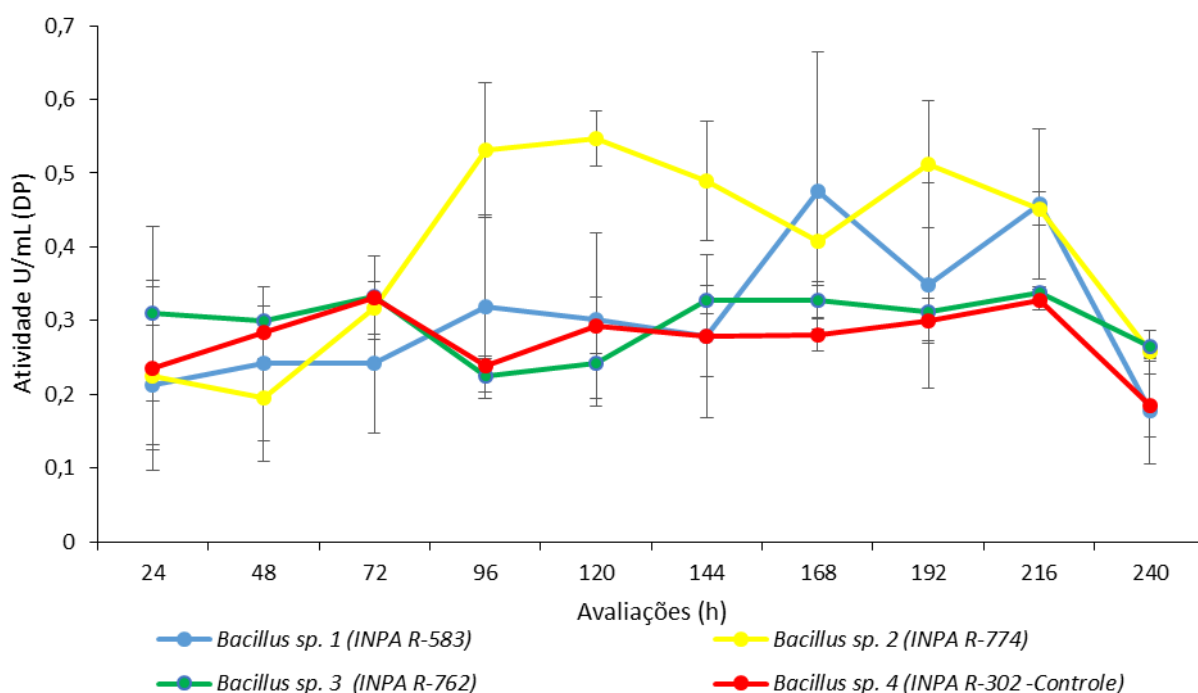


Figura 14. Atividade da enzima β -glicosidase (U/mL) produzida por *Bacillus* sp. 1 (INPA R-583), *Bacillus* sp. 2 (INPA R-774), *Bacillus* sp. 3 (INPA R-762) e *Bacillus* sp. 4 (INPA R-302, controle) em cultivos individuais, ao longo de 240 h de fermentação. Os valores correspondem à média $\pm$ desvio-padrão (DP) de três repetições independentes ($n = 3$).

O isolado *B. sp. 2* (INPA R-774) se destacou aumentando o rendimento expressivo da produção enzimática a partir de 72 h. Em 96 e 120 h, atingiu 0,532 e 0,547 U/mL, respectivamente. Esses valores são mais que o dobro da atividade apresentada pelo controle nos mesmos tempos (0,239 e 0,293 U/mL) (Apêndice E). Esse padrão evidencia elevada capacidade desse isolado em sustentar e intensificar a produção de β -glicosidase em fases intermediárias do cultivo. A *B. sp. 1* (INPA R-583) apresentou produção mais variável, com aumento tardio e pico em 168 h (0,476 U/mL), cerca de 69% superior ao controle no mesmo horário avaliado (0,281 U/mL). O controle *B. sp. 4* apresentou perfil relativamente estável ao longo do tempo, com valores intermediários, entre 0,185 e 0,330 U/mL, atingindo seu máximo em 72 h (0,330 U/mL) (Apêndice E). No entanto, exceto nas fases iniciais, o controle foi consistentemente superado pelos isolados INPA R-774 e, em alguns horários avaliados, pela INPA R-583, demonstrando que essas linhagens possuem maior potencial individual para produção de β -glicosidase (Figura 14).

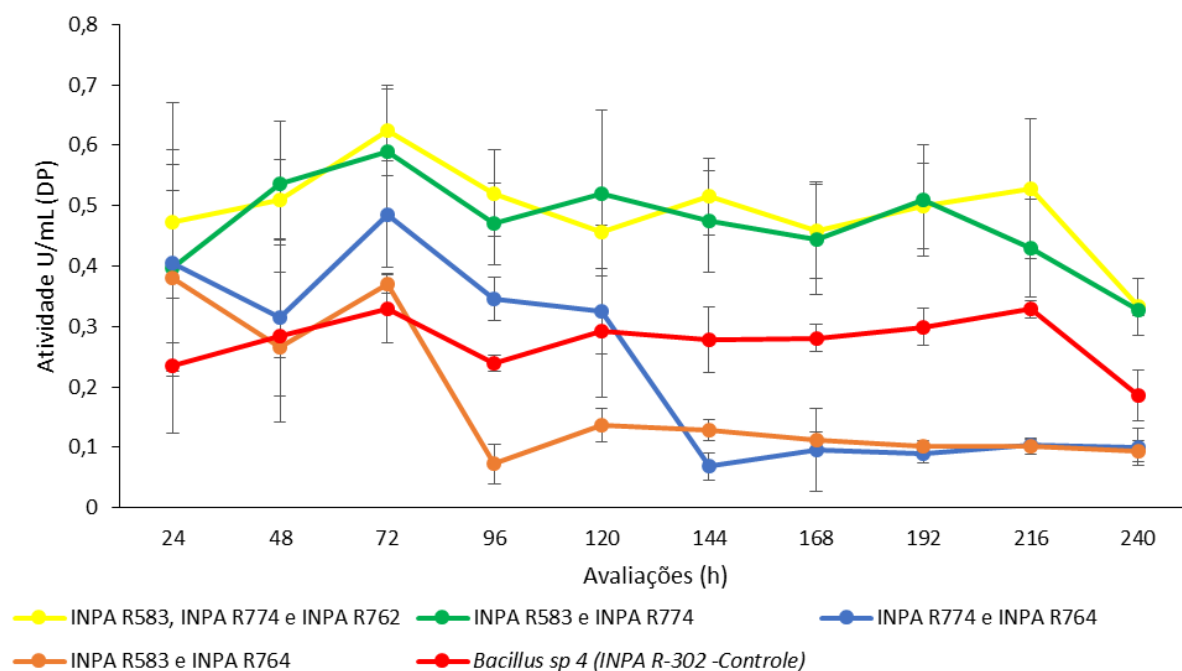


Figura 15. Atividade da enzima β -glicosidase (U/mL) produzida em diferentes sistemas de co-cultivo de *Bacillus* sp. 1 (INPA R-583), *Bacillus* sp. 2 (INPA R-774), *Bacillus* sp. 3 (INPA R-762) e *Bacillus* sp. 4 (INPA R-302, controle), avaliados ao longo de 240 h de fermentação. Os valores correspondem à média $\pm$ desvio-padrão (DP) de três repetições independentes ($n = 3$).

Nos co-cultivos, os ganhos em relação ao controle foram ainda mais evidentes. O co-cultivo triplo (INPA R-583 + INPA R-774 + INPA R-762) apresentou atividade já elevada em 24 h (0,472 U/mL), valor aproximadamente duas vezes maior que o do controle (Apêndice F). Esse co-cultivo atingiu o maior valor registrado em todo o experimento em 72 h (0,625 U/mL), o que representa um rendimento de cerca de 89% em relação ao controle (0,330 U/mL) e desempenhos observados nos cultivos individuais (Apêndice F). Além disso, a atividade manteve-se elevada ao longo do tempo ($\approx 0,456$ – $0,528$ U/mL até 216 h), evidenciando maior estabilidade produtiva quando comparada ao controle, que apresentou declínio após 72 h. O co-cultivo INPA R-583 + INPA R-774 também se destacou, apresentando valores elevados entre 48 e 120 h, com pico de 0,589 U/mL em 72 h, cerca de 78% superior ao controle. Mesmo nas avaliações finais (192–240 h), esse co-cultivo manteve atividades próximas ou superiores a 0,327 U/mL, enquanto o controle reduziu para valores entre 0,185 e 0,299 U/mL (Apêndice F). Em contraste, os co-cultivos INPA R-774 + INPA R-764 e INPA R-583 + INPA R-764 apresentaram comportamento menos favorável em comparação ao controle ao longo das avaliações. Embora tenham exibido valores relativamente elevados nas primeiras 72 h (até 0,486 U/mL), a atividade de β -glicosidase caiu drasticamente após 96 h, atingindo valores

inferiores a 0,15 U/mL nos tempos finais. Nessas condições, esses co-cultivos passaram a apresentar produção inferior à do controle, indicando interações microbianas desfavoráveis à manutenção da atividade enzimática (Figura 15).

De forma geral, a comparação com *B. sp.* 4 (INPA R-302) demonstra que o controle apresenta produção basal de β -glicosidase moderada e relativamente constante, porém é amplamente superado pelos co-cultivos mais eficientes, especialmente o co-cultivo triplo e o co-cultivo INPA R-583 + INPA R-774. Esses sistemas não apenas duplicaram a atividade observada no controle em determinados períodos, como também mantiveram níveis elevados por mais tempo. Assim, os resultados evidenciam que a associação estratégica das linhagens potencializa significativamente a produção de β -glicosidase em relação ao cultivo isolado da bactéria controle (Figura15).

7. DISCUSSÃO

7.1. Avaliação da produção de enzimas celulolíticas das rizobactérias

A elevada taxa de reativação das rizobactérias avaliadas, com 65,15% dos isolados apresentando crescimento em meio YMA, indica a viabilidade fisiológica da maior parte da coleção microbiana analisada, sugerindo que as condições de preservação e reativação foram adequadas (BERG et al., 2014). Entre os isolados reativados, a expressiva proporção de rizobactérias capazes de produzir enzimas celulolíticas (62,8%) evidencia o papel funcional desses microrganismos na ciclagem de carbono no solo, uma vez que a celulose constitui o principal polissacarídeo estrutural da biomassa vegetal. Assim, sua degradação microbiana representa um processo-chave para a mineralização da matéria orgânica e a consequente liberação de nutrientes essenciais para as plantas (LYND et al., 2002).

Os halos de hidrólise observados em meio contendo carboximetilcelulose (CMC) confirmam a secreção extracelular de celulasas (BEGUIN e AUBERT, 1994). A variação dos índices enzimáticos entre 1,11 e 5,0 constitui um forte indicativo de diferentes rendimentos enzimáticos entre os isolados. Resultados semelhantes foram amplamente descritos na literatura, evidenciando grande heterogeneidade funcional entre rizobactérias, mesmo quando isoladas de um mesmo hospedeiro vegetal ou ambiente, refletindo diferenças genéticas, fisiológicas e de adaptação ecológica entre os microrganismos (COMPANT et al., 2010; LYND et al., 2002; MENDES et al., 2011; BULGARELLI et al., 2013). O fato de 74,1% das rizobactérias celulolíticas apresentarem índice enzimático igual ou superior a 2,0 reforça o

potencial biotecnológico desses isolados. Índices enzimáticos elevados estão geralmente associados a maior eficiência na produção e secreção de enzimas hidrolíticas, sendo um critério amplamente utilizado no *screening* de microrganismos promissores (KASANA et al., 2008).

O potencial celulolítico entre as rizobactérias avaliadas teve uma distribuição relativamente homogênea, sugerindo que a capacidade de produzir celulasas constitui uma característica funcional amplamente conservada na microbiota da rizosfera. Essa ampla ocorrência está diretamente relacionada à grande disponibilidade de resíduos vegetais ricos em celulose nesse ambiente, o que favorece a seleção de microrganismos capazes de hidrolisar polímeros complexos e utilizá-los como fonte de carbono e energia (LYND et al., 2002; COMPANT et al., 2010). A atuação dessas bactérias contribui de forma significativa para a mineralização da matéria orgânica, promovendo a ciclagem de nutrientes e influenciando a fertilidade e a estrutura do solo (MENDES et al., 2011). Apesar dessa distribuição homogênea, alguns isolados destacaram-se por apresentar Índice Enzimático (IE) superior a 4,0, o que indica maior eficiência na produção e secreção extracelular de celulasas. Microrganismos com alta atividade celulolítica tendem a apresentar maior competitividade ecológica, pois conseguem explorar nichos ricos em substratos recalcitrantes e estabelecer interações mais estáveis com as raízes das plantas (BHAT, 2000; KUHAD et al., 2011).

A maioria dos isolados com alto IE foram coletados em *P. phaseoloides*, sugerindo forte influência da planta hospedeira na seleção funcional da microbiota rizosférica. Estudos anteriores demonstram que plantas leguminosas atuam na modulação da diversidade e do potencial metabólico das comunidades microbianas do solo, favorecendo microrganismos envolvidos na ciclagem de carbono (BERENDSEN et al., 2012; PHILIPPOT et al., 2013; BADRI e VIVANCO, 2009; BULGARELLI et al., 2013).

Os isolados que apresentaram IE entre 2,0 e 3,0, foram classificados como moderadamente celulolíticos, mas ainda funcionalmente relevantes no contexto ecológico, no qual a degradação da celulose ocorre de forma cooperativa entre diferentes microrganismos (LYND et al., 2002; TRIVEDI et al., 2020). Esses resultados reforçam que a seleção de isolados com potencial biotecnológico deve considerar não apenas o valor médio do IE, mas também a estabilidade da atividade enzimática e o contexto ecológico dos isolados, especialmente quando se busca aplicação em processos de degradação de resíduos lignocelulósicos ou melhoria da qualidade do solo.

7.2. Avaliação de plantas hospedeiras para a bioprospecção de rizobactérias com atividade celulolítica

As espécies *Pueraria phaseoloides* e *Inga edulis* constituem fontes relevantes de microrganismos com elevado potencial enzimático. Esses resultados podem ser explicados pelas características fisiológicas e ecológicas dessas espécies, que favorecem o estabelecimento de comunidades microbianas metabolicamente ativas e funcionalmente diversificadas na rizosfera. Ambas as espécies possuem elevada produção de exsudatos radiculares ricos em carboidratos, aminoácidos e compostos fenólicos, os quais atuam como sinais químicos e fontes de carbono, estimulando o recrutamento e a manutenção de bactérias com capacidade de degradar polímeros complexos, como a celulose (BAIS et al., 2006; BADRI e VIVANCO, 2009).

Em relação a *P. phaseoloides*, a associação com rizobactérias é intensificada pela simbiose com microrganismos fixadores de nitrogênio (HUNGRIA, 1994; COSTA, 2017b). Esse ambiente favorece a seleção de bactérias com elevada atividade metabólicas, como a degradação da biomassa vegetal e ciclagem de nutrientes, especialmente carbono e nitrogênio, contribuindo para a melhoria da qualidade do solo (LYND et al., 2002; MENDES et al., 2011). *Inga edulis*, por sua vez, é uma espécie arbórea típica de sistemas agroflorestais, caracterizada por elevada produção de serapilheira e pela presença de raízes finas de rápida renovação, o que resulta em maior aporte de material lignocelulósico ao solo e favorece a atividade de microrganismos decompositores (VAZ, 2013; LEBLANC et al., 2005; SCHROTH et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2022).

Esse acúmulo de resíduos vegetais cria um ambiente favorável para microgroganimas degradadores de matéria rica em celulose, hemicelulose e lignina (VAZ, 2013; OLIVEIRA et al., 2022; LYND et al., 2002; BHAT, 2000). Além disso, espécies arbóreas nativas favorecem maior diversidade funcional microbiana no solo, devido à heterogeneidade de exsudatos radiculares e serapilheira, ampliando o potencial de bioprospecção de microrganismos com aplicações biotecnológicas. (COMPANT et al., 2010; BERG et al., 2014; MENDES et al., 2011; BERG e SMALLA, 2009). A presença de *P. phaseoloides* e *I. edulis* não apenas favorece a ocorrência de rizobactérias celulolíticas, mas também evidencia o papel dessas plantas na manutenção da dinâmica microbiana do solo, com implicações diretas para a sustentabilidade de sistemas agrícolas e para a prospecção de enzimas de interesse industrial (KUHAD et al., 2011; BHAT, 2000; BERG e SMALLA, 2009).

Foi observada a formação de halos de degradação em 62% no ensaio qualitativo com CMC, sendo um ensaio amplamente utilizado para a detecção inicial de atividade celulolítica, permitindo a triagem eficiente de isolados com potencial biotecnológico (KASANA et al.,

2008). A variação observada nos valores de índice enzimático (IE), entre 1,0 e 5,57, evidencia uma expressiva heterogeneidade funcional entre os isolados, mesmo quando provenientes de plantas hospedeiras específicas. A elevada proporção de isolados celulolíticos reforça o potencial dessas plantas hospedeiras como reservatórios naturais de bactérias com capacidade de degradação de polímeros lignocelulósicos. Um total 22 isolados apresentaram $IE \geq 2,0$, sendo considerados potenciais produtores de celulases. Esse critério de seleção é amplamente empregado em estudos de prospecção de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas, uma vez que valores de IE superiores a 2,0 indicam secreção extracelular eficiente e relevância funcional para aplicações biotecnológicas (BHAT, 2000; KUHAD et al., 2011).

A análise estatística dos dados revelou que os valores de IE apresentaram distribuição normal, conforme indicado pelos testes de Lilliefors e Shapiro–Wilk, o que valida a aplicação de testes paramétricos para a comparação entre os grupos. A diferença estatisticamente significativa observada entre os isolados provenientes de *P. phaseoloides* e *I. edulis* ($p = 0,0048$) demonstra que a planta hospedeira exerce influência direta sobre o potencial funcional das comunidades bacterianas associadas. O maior valor médio de IE observado para os isolados de *P. phaseoloides* sugere que essa espécie cria um ambiente rizosférico mais favorável à seleção de bactérias com maior capacidade de produção de celulases. O intervalo de confiança obtido para a diferença entre o IE entre os grupos de bactérias associadas as plantas, reforça a robustez estatística dos resultados e indica, que os isolados de *P. phaseoloides* apresentam desempenho celulolítico superior aos de *I. edulis*. Esses achados estão em consonância com estudos que demonstram que a identidade da planta hospedeira pode ser um dos fatores para avaliar o potencial enzimático dos microrganismos associados (BERENDSEN et al., 2012; BULGARELLI et al., 2013).

7.3. Identificação dos isolados

A caracterização morfológica e a coloração de Gram das rizobactérias avaliadas revelaram predominância de isolados Gram negativos, sendo os isolados INPA R302, INPA R296 e INPA R233 classificados como Gram positivos. Esse padrão está em concordância com estudos conduzidos com rizobactérias amazônicas associadas a leguminosas, nos quais a predominância de bactérias Gram negativas é frequentemente relatada, especialmente aquelas pertencentes ao grupo dos *Rhizobium* sp. e *Bacillus* sp., isoladas de nódulos radiculares (VAZ, 2013; COSTA, 2017; CÁUPER, 2018; OLIVEIRA et al., 2022).

Com base nos resultados de coloração de Gram, morfologia celular e índice enzimático (IE), foram selecionadas três rizobactérias para os ensaios de determinação das celulases em monocultivo: INPA R583 (Gram negativa, bastonete em estreptobacilos, IE = 5,57), INPA R-774 (Gram negativa, cocos, IE = 4.14) e INPA R-762 (Gram negativa, cocos e IE= 3,95) INPA. A seleção dessas linhagens contempla perfis fisiológicos distintos, permitindo avaliar possíveis diferenças na produção de endoglucanases, celulases totais e β -glicosidases.

Apesar da coloração de Gram e a morfologia celular constituírem importantes critérios iniciais de caracterização, esses parâmetros, isoladamente, não são suficientes para prever o desempenho enzimático das rizobactérias. É necessário realizar a identificação molecular desses microrganismos e para buscar informações na literatura sobre os mecanismos de secreção e interação com o substrato, os quais variam amplamente entre os microrganismos (BEGUIN e AUBERT, 1994; BHAT, 2000).

A identificação molecular revelou a predominância de espécies pertencentes ao gênero *Bacillus* entre os isolados com maiores índices enzimáticos, sendo identificadas as espécies *Bacillus* sp. 1, *Bacillus* sp. 2, *Bacillus* sp. 3 e *Bacillus* sp. 4. Esse resultado é similar com diversos estudos que apontam espécies de *Bacillus* como importantes produtoras de enzimas extracelulares, incluindo celulases, devido à sua elevada capacidade de secreção e adaptação a diferentes ambientes, especialmente solos e rizosferas (BHAT, 2000; PRIEST, 1977; SCHALLMEY et al., 2004).

A recorrente identificação de *Bacillus* spp. entre os isolados com elevado potencial celulolítico reforça o papel dessa espécie como um microrganismo-chave em processos de degradação de polissacarídeos vegetais. A espécie de *Bacillus* é amplamente reconhecida por seu repertório enzimático diversificado, incluindo endoglucanases e β -glicosidases, além de apresentar vantagens biotecnológicas como rápido crescimento, facilidade de cultivo e status de organismo GRAS (Generally Recognized As Safe) (FERREIRA et al., 2018; VAN DIJL e HECKER, 2013). Da mesma forma, *B. sp. 3* é descrita como uma espécie com elevado potencial para produção de enzimas hidrolíticas e metabólitos bioativos, além de desempenhar funções relevantes na promoção do crescimento vegetal e no biocontrole de fitopatógenos (FAN et al., 2018; RABBEY et al., 2019).

Os isolados provenientes da rizosfera de *Pueraria phaseoloides* destacaram-se tanto pelo elevado índice enzimático quanto pela predominância de espécies de *Bacillus*, sugerindo que essa planta hospedeira exerce forte influência na seleção de microrganismos funcionalmente especializados. A rizosfera de leguminosas é caracterizada por elevada disponibilidade de compostos orgânicos liberados pelas raízes, como açúcares, aminoácidos e

ácidos orgânicos, os quais atuam como fontes de carbono e energia para a microbiota associada, favorecendo o estabelecimento de bactérias com alta capacidade metabólica e enzimática (DAKORA e PHILLIPS, 2002; MENDES et al., 2011; BADRI e VIVANCO, 2009).

Espécies de *Bacillus* são frequentemente relatadas na rizosfera de leguminosas devido à sua versatilidade metabólica, capacidade de formar endósporos e produção de uma ampla gama de enzimas extracelulares, como celulasas, proteases e fosfatases, que desempenham papel fundamental na degradação da matéria orgânica e na ciclagem de nutrientes no solo (VESSEY, 2003; COMPANT et al., 2005; SANTOYO et al., 2012). Além disso, esses microrganismos podem contribuir para o crescimento vegetal por meio da solubilização de nutrientes, produção de fitormônios e supressão de fitopatógenos, reforçando a importância das interações planta–microrganismo na rizosfera (LUGTENBERG e KAMILOVA, 2009; BHATTACHARYYA e JHA, 2012).

Embora os percentuais de similaridade obtidos para algumas identificações estejam abaixo de 97%, valor frequentemente adotado como limiar para identificação inequívoca em nível de espécie, esses resultados ainda são suficientes para inferir a afiliação taxonômica ao gênero *Bacillus* (STACKEBRANDT e GOEBEL, 1994; JANDA e ABBOTT, 2007). Essa limitação ressalta a necessidade de abordagens complementares, como análises filogenéticas mais robustas, sequenciamento de múltiplos genes (MLSA) ou genômica comparativa, para refinamento taxonômico futuro.

De forma integrada, os resultados da extração de DNA, da qualidade molecular e da identificação taxonômica reforçam que as rizobactérias selecionadas pertencem a um grupo bacteriano amplamente reconhecido por sua relevância biotecnológica, além do seu elevado potencial celulolítico. A seleção dos isolados *Bacillus* sp. 1 (INPA R-583), *Bacillus* sp. 2 (INPA R-774) e *Bacillus* sp. 3 (INPA R-762), provenientes de *P. phaseoloides*, para análises de produção de endoglucanases, celulasas totais e β -glicosidases, mostra-se estratégica, considerando seus altos índices enzimáticos, maior similaridade taxonômica e histórico de aplicação em processos industriais (SCHALLMEY et al., 2004; CHEN et al., 2025).

7.4. Determinação da Atividade Enzimática Celulolítica

Foi avaliado o desempenho de produção das enzimas celulasas totais (Fpase), endoglucanases (CMCase) e β -glicosidases por isolados *Bacillus* em sistemas de monocultivo e co-cultivo. A degradação eficiente da celulose depende da ação sinérgica desse complexo enzimático, uma vez que cada enzima atua em etapas complementares do processo hidrolítico,

desde a ruptura das regiões amorfas até a liberação final de glicose (BEGUIN e AUBERT, 1994; LYND et al., 2002; HORN et al., 2012).

A produção de enzimas celulolíticas é tradicionalmente atribuída a fungos filamentosos, como *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Trichoderma* spp. reconhecidos pela produção de celulases e pelo forte sinergismo enzimático (LYND et al., 2002; BHAT, 2000). Em contraste, bactérias tendem a apresentar menor atividade celulolítica (SUKUMARAN et al., 2005) quando comparados com fungos filamentosos. De forma geral, os resultados ~~desse ensaio~~ demonstraram o potencial dos consórcios de *Bacillus* para aplicações biotecnológicas na degradação de biomassa lignocelulósica. As estratégias de co-cultivo bacteriano potencializam significativamente a produção de Fpase, CMCase e β -glicosidase, aproximando o desempenho bacteriano daqueles observados em alguns sistemas fúngicos (CARDOSO, 2012; KUMAR et al., 2016; SALIHU et al., 2015). O co-cultivo, em certos casos, oferece benefícios em comparação ao monocultivo, incluindo atividades enzimáticas mais elevadas, redução de custos pela obtenção de coquetéis mais robustos e variados, maior resistência a contaminantes e maior eficiência na hidrólise (SPERANDIO e FILHO, 2019).

7.4.1. **Determinação da Atividade de celulases totais – Fpase**

A determinação da atividade de celulases totais, avaliada por meio da enzima Fpase, evidenciou diferenças entre os sistemas de cultivo individuais e os diferentes arranjos de co-cultivo. De modo geral, os cultivos individuais de *Bacillus* sp. 1 (INPA R-583), *Bacillus* sp. 2 (INPA R-774), *Bacillus* sp. 3 (INPA R-762) e do controle *Bacillus* sp. 4 (INPA R-302) apresentaram baixos níveis de atividade de Fpase, com picos de produção entre 48 e 168 horas de fermentação. Esse comportamento é amplamente descrito na literatura, uma vez que a produção de celulases totais em monocultivo tende a ser limitada pela ausência de complementaridade funcional entre as diferentes classes de enzimas necessárias para a degradação eficiente da celulose cristalina (BEGUIN e AUBERT, 1994; LYND et al., 2002; KOSTYLEV e WILSON, 2012). Entre os cultivos individuais, *B. sp. 3* (INPA R-762) destacou-se por apresentar maior estabilidade temporal da produção de Fpase, mantendo valores relativamente constantes ao longo da fermentação. Esse resultado é similar com relatos que descrevem *B. sp. 3* como uma espécie com expressões gênicas de enzimas hidrolíticas e elevada capacidade secretora, podendo ser favorecem sua adaptação a ambientes complexos como a rizosfera (FAN et al., 2018; RABBEE et al., 2019; CHEN et al., 2020). Ainda assim, mesmo o

melhor desempenho em monocultivo permaneceu inferior aos valores alcançados nos sistemas de co-cultivo, reforçando as limitações inerentes a culturas puras.

Em contraste, os co-cultivos promoveram aumentos expressivos na atividade de Fpase, evidenciando um claro efeito sinérgico entre as rizobactérias avaliadas. O co-cultivo entre *B. sp. 2* (INPA R-774) e *B. sp. 3* (INPA R-762) apresentou rápida indução da produção enzimática nas primeiras 24 horas, com valores significativamente superiores aos observados nos cultivos individuais. Contudo, a redução acentuada da atividade após 96 horas indica que esse sinergismo inicial não foi sustentado, possivelmente em função da competição por substratos, alterações na proporção populacional ou estresse metabólico ao longo do cultivo (ZUROFF e CURTIS, 2012; BERNSTEIN e CARLSON, 2012). No co-cultivo pode haver seis tipos de interações entre os fungos: mutualismo, comensalismo, parasitismos, amensalismo, neutralismo e competição (CHE e MEN, 2019). Presumivelmente, ocorreu amensalismo no co-cultivo de *B. sp. 2* (INPA R-774) e *B. sp. 3* (INPA R-762), uma vez que as bactérias possam ter produzido metabólitos que inibiram mutuamente a produção enzimática, considerando que essa enzima foi produzida nos cultivos individuais.

O comportamento observado no co-cultivo entre *B. sp. 1* (INPA R-583) e *B. sp. 2* (INPA R-774) sugere maior compatibilidade fisiológica entre as diferentes linhagens de bactérias do mesmo gênero, o que pode reduzir antagonismos metabólicos e favorecer a maior produção de Fpase. Estudos indicam que consórcios compostos por espécies ou linhagens do mesmo gênero tendem a apresentar maior estabilidade ecológica e melhor coordenação na produção de enzimas extracelulares (MEE et al., 2014; JOHNS et al., 2016).

O maior destaque foi observado no co-cultivo triplo envolvendo *B. sp. 1* (INPA R-583), *B. sp. 2* (INPA R-774) e *B. sp. 3* (INPA R-762), que apresentou não apenas os maiores valores de atividade de Fpase, mas também maior estabilidade produtiva ao longo do tempo. O pico registrado em 144 horas, aproximadamente duas vezes superior à média dos cultivos individuais, indicando que a combinação de três linhagens aumenta produção de FPases. Além do aumento da atividade máxima, a manutenção de níveis relativamente elevados de Fpase até 240 horas no co-cultivo triplo sugere maior robustez e estabilidade sistema, características altamente desejáveis para aplicações industriais. A literatura mostra que consórcios microbianos são mais eficientes na degradação, quando comparados a culturas puras (BERNSTEIN e CARLSON, 2012; CORTES et al., 2017; ZHOU et al., 2021). Nesse contexto, o desempenho superior do co-cultivo triplo reforça o potencial do uso racional de consórcios bacterianos como estratégia para otimização de processos fermentativos voltados à produção de enzimas lignocelulolíticas.

Quando comparados ao controle *B. sp. 4* (INPA R-302), todos os sistemas de co-cultivo apresentaram ganhos substanciais de atividade de Fpase, confirmando que a associação entre linhagens é determinante para maior rendimento. Esses resultados corroboram com estudos que demonstram que a produção de celulasas em sistemas consorciados não é meramente aditiva, mas resulta de interações sinérgicas entre microrganismos (KOSTYLEV e WILSON, 2012; SINGHANIA et al., 2013; JOHNS et al., 2016). Em conjunto, os dados indicam que, embora os cultivos individuais de *Bacillus* apresentem capacidade limitada e pouco duradoura de produção de Fpase, os co-cultivos, especialmente os consórcios bacterianos de rizobactérias amazônicas (*B. sp. 1* - INPA R-583, *B. sp. 2* - INPA R-774 e *B. sp. 3* - INPA R-762), pode ser uma boa estratégia para aplicações biotecnológicas relacionadas à degradação da biomassa lignocelulósica ou à produção de enzimas industriais.

7.4.2. Determinação de Atividade CMCase (endoglucanases)

A atividade CMCase (endoglucanases) observada neste estudo evidenciou diferenças marcantes entre cultivos individuais e sistemas de co-cultivo, reforçando que a organização microbiana e suas interações pode contribuir na eficiência da degradação da celulose. Nos cultivos individuais, *Bacillus sp. 1* (INPA R-583) apresentou elevada atividade inicial CMCase, sugerindo rápida indução enzimática em resposta à presença de CMC. Esse comportamento é consistente com relatos que descrevem *espécies* de *Bacillus* como um microrganismo altamente responsivo à degradação da parede celular vegetal (PRIEST, 1977; SCHALLMEY et al., 2004). Contudo, a queda progressiva da atividade ao longo do cultivo indica limitação na manutenção da produção, possivelmente associada à redução da disponibilidade de nutrientes ou à competição metabólica intracelular (ZHANG e LYND, 2004; HORN et al., 2012; SINGHANIA et al., 2013).

A linhagem *B. sp. 2* (INPA R-774) apresentou perfil distinto, com produção inicial inferior ao controle, mas incremento gradual ao longo do tempo, culminando em maior atividade nos tempos finais. Esse padrão sugere expressão tardia das endoglucanases, o que pode estar relacionado à regulação dependente da fase de crescimento bacteriano (KUHAD et al., 2011; RATSOGI et al., 2009). Embora tenha apresentado aumento pontual, sua produção permaneceu próxima à do controle durante grande parte do experimento, indicando desempenho individual limitado. *Bacillus sp. 3* (INPA R-762) demonstrou produção de endoglucanases relativamente estável e semelhante à do controle ao longo de todo o período experimental. Essa estabilidade é compatível com estudos que descrevem *B. sp. 3* como uma

espécie metabolicamente versátil, frequentemente associada à rizosfera e capaz de manter atividade enzimática constante em diferentes ambientes (FAN et al., 2018; RABBEE et al., 2019; CHEN et al., 2020a; CHEN et al., 2020b). O controle *B. sp. 4* (INPA R-302) apresentou comportamento semelhante, corroborando sua utilização como referência basal confiável para comparação entre os sistemas avaliados.

Em contraste, os sistemas de co-cultivo evidenciaram ganhos expressivos na atividade CMCase, destacando-se como estratégia eficiente para potencializar a produção desta enzima. O co-cultivo triplo (*B. sp. 1* INPA R-583 + *B. sp. 2* INPA R-774 + *B. sp. 3* INPA R-762) apresentou aumento progressivo e linear, atingindo valores significativamente superiores aos do controle e dos cultivos individuais. Esse resultado indica forte sinergismo metabólico, provavelmente decorrente da complementaridade funcional entre as linhagens e da cooperação na degradação do substrato celulósico (LYND et al., 2002; BADER et al., 2010; ZUROFF e CURTIS, 2012). O destaque observado no co-cultivo INPA R-583 + INPA R-762, com produção elevada desde os tempos iniciais, sugere cooperação entre as linhagens para liberação de oligossacarídeos solúveis ou sinais metabólicos que atuam como indutores enzimáticos (BRENNER et al., 2008; BERNSTEIN e CARLSON, 2012; CORTES et al., 2017). Esse tipo de interação positiva é amplamente descrito em consórcios microbianos naturais e artificiais, nos quais a degradação eficiente de polímeros complexos depende da ação coordenada de múltiplos microrganismos (MEE et al., 2014; JOHNS et al., 2016; ZHOU et al., 2021).

Por outro lado, co-cultivos que não apresentaram ganhos expressivos corroboram que nem todas as combinações microbianas resultam em sinergismo efetivo. Interações competitivas, sobreposição funcional ou desequilíbrio metabólico podem limitar a produção enzimática, evidenciando a necessidade de seleção racional das linhagens para formação de consórcios eficientes (BRENNER et al., 2008; GROßKOPF e SOYER, 2014). De forma integrada, os resultados demonstram que a produção de CMCase em monocultivo é limitada e, em geral, semelhante à produção basal do controle, enquanto sistemas de co-cultivo, especialmente o consórcio com as três linhagens e o consórcio INPA R-583 + INPA R-762, promovem aumentos expressivos atividade CMCase. Esses achados reforçam o potencial do uso de consórcios bacterianos de rizobactérias para otimizar a produção de CMCase.

7.4.3. Determinação de atividade β -glicosidase

A produção de β -glicosidase converte oligossacarídeos como celobiose em glicose, mitigando o efeito inibitório sobre outras enzimas celulolíticas, promovendo uma hidrólise mais

eficiente do substrato (BEGUIN e AUBERT, 1994; LYND et al., 2002). Nos cultivos individuais, a atividade betaglucosidásica inicial por *Bacillus* sp. 3 (INPA R-762) destacou-se em 24 h, com atividade cerca de 31% superior à do controle, evidenciando resposta rápida ao substrato CMC. Esse padrão é consistente com relatos que descrevem *B. sp. 3* como metabolicamente versátil, capaz de expressar rapidamente genes hidrolíticos quando exposta a polissacarídeos complexos (RABBEE et al., 2019; FAN et al., 2018). Entretanto, a manutenção dessa produção ao longo do tempo foi limitada. Padrões semelhantes com maior produção inicial foram observados em outros estudos com β -glicosidases bacterianas (LU e RALPH, 2011; ABDULLAH et al., 2019).

Em contraste, *Bacillus* sp. 2 (INPA R-774) apresentou perfil de produção gradual e sustentado, com atividade máxima entre 96 e 120 h. Essa produção superior em fases intermediárias indica não apenas capacidade produção de β -glicosidase, mas também manutenção da atividade enzimática em condições fermentativas prolongadas. Estudos sobre produção de β -glicosidases por *Bacillus* destacam sua aptidão para secreção eficiente de enzimas extracelulares e adaptação a ambientes ricos em oligossacarídeos solúveis (SCHALLMEY et al., 2004; ZHANG et al., 2014). A produção mais variável observada para *B. sp. 1* (INPA R-583), com pico tardio em 168 h, sugere que diferentes cepas de um mesmo gênero podem possuir regulação enzimática distintos (KIM et al., 2009).

A utilização de sistemas de co-cultivo revelou uma intensificação significativa da produção de β -glicosidase, destacando os benefícios das interações microbianas. No co-cultivo triplo, os valores de atividade foram significativamente superiores às médias observadas nos cultivos individuais e quase dobraram os valores do controle em 72 h. Esse comportamento sinérgico é amplamente relatado na literatura sobre consórcios microbianos: a cooperação entre diferentes espécies pode modular positivamente processos enzimáticos e reduzindo efeitos inibitórios entre espécies (LYND et al., 2002; BADER et al., 2010; BERNSTEIN e CARLSON, 2012; CORTES et al., 2017).

A elevada e sustentada produção de β -glicosidase no co-cultivo triplo sugere que a complementaridade funcional entre as linhagens, promove maior estabilidade produtiva ao longo do tempo. Trabalhos com consórcios microbianos naturais e artificiais reforçam essa sinergia: comunidades diversificadas tendem a superar monoculturas tanto na intensidade quanto na persistência da atividade enzimática (ZUROFF e CURTIS, 2012; MEE et al., 2014).

O co-cultivo INPA R-583 + INPA R-774 apresentou também desempenho notável, com picos de produção comparáveis ao co-cultivo. Esse resultado sugere que mesmo combinações de duas linhagens podem gerar interações positivas, como indicado em outros estudos que

relatam cooperação entre cepas de *Bacillus* em processos hidrolíticos (JOHNS et al., 2016; CORTES et al., 2017). Os resultados deste estudo confirmam que, embora algumas linhagens apresentem boa capacidade individual para produzir β -glicosidase, a formação de consórcios microbianos, potencializa de forma expressiva tanto a intensidade quanto a estabilidade da produção enzimática.

8. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo demonstram de forma consistente que a rizosfera constitui um ambiente altamente funcional para a seleção de rizobactérias com potencial celulolítico, refletindo a estreita interação entre plantas hospedeiras, microbiota do solo e processos de ciclagem de carbono. A elevada taxa de reativação dos isolados bacterianos e a expressiva proporção de rizobactérias capazes de produzir enzimas celulolíticas confirmam não apenas a viabilidade fisiológica da coleção microbiana avaliada, mas também a relevância ecológica desses microrganismos na degradação da matéria orgânica vegetal.

A triagem qualitativa em meio contendo carboximetilcelulose (CMC) revelou ampla ocorrência de atividade celulolítica entre os isolados, com variação significativa dos índices enzimáticos, evidenciando heterogeneidade funcional mesmo entre bactérias associadas a uma mesma planta hospedeira. A predominância de isolados com índices enzimáticos iguais ou superiores a 2,0 reforça o elevado potencial biotecnológico da microbiota rizosférica analisada e valida a eficiência do índice enzimático como ferramenta de seleção inicial para microrganismos produtores de celulasas.

A análise comparativa entre as plantas hospedeiras evidenciou que *Pueraria phaseoloides* exerce influência mais pronunciada na seleção de rizobactérias com maior capacidade celulolítica quando comparada a *Inga edulis*, conforme demonstrado pelos valores de índice enzimático e pela diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Esses achados reforçam que a identidade da planta hospedeira é um fator determinante na estruturação funcional das comunidades bacterianas da rizosfera, influenciando diretamente o potencial

metabólico dos microrganismos associados. Nesse contexto, plantas leguminosas, como *P. phaseoloides*, destacam-se como sistemas estratégicos para a bioprospecção de bactérias envolvidas na ciclagem de carbono e na degradação de biomassa vegetal.

A caracterização morfológica, associada à identificação molecular, revelou a predominância de espécies pertencentes ao gênero *Bacillus* entre os isolados com maiores índices enzimáticos, com destaque para *Bacillus* sp. 1, *Bacillus* sp. 2 e *Bacillus* sp. 3. A recorrente identificação dessas espécies confirma sua elevada capacidade de secreção de enzimas extracelulares e sua adaptação a ambientes ricos em substratos poliméricos, como a rizosfera.

A avaliação da produção de celulasas totais, endoglucanases e β -glicosidases em sistemas de monocultivo evidenciou que, embora as linhagens selecionadas apresentem capacidade individual de produção enzimática, essa produção é limitada e pouco estável ao longo do tempo. Esses resultados indicam que culturas puras não são suficientes para promover degradação eficiente da celulose, corroborando a ideia de que a hidrólise desse componente vegetal depende da ação coordenada de múltiplas enzimas e microrganismos.

Em contraste, os sistemas de co-cultivo promoveram aumentos expressivos tanto na intensidade quanto na estabilidade da produção enzimática, evidenciando a ocorrência de interações sinérgicas e complementaridade funcional entre as linhagens bacterianas. O co-cultivo triplo envolvendo *B. spp.* (INPA R-583 e INPA R-774 e INPA R-762) destacou-se como o arranjo mais eficiente, apresentando os maiores valores de atividade para Fpase, CMCase e β -glicosidase, além de maior rendimento ao longo do tempo.

A rizosfera amazônica, particularmente associada a *Pueraria phaseoloides*, representa uma fonte promissora de rizobactérias com elevado potencial celulolítico. Os resultados reforçam que a utilização estratégica de consórcios bacterianos, especialmente aqueles compostos por espécies do gênero *Bacillus*, constitui uma abordagem eficaz para a intensificação e estabilização da produção de enzimas celulolíticas. Assim, esta tese contribui para o avanço do conhecimento sobre a ecologia funcional da rizosfera e oferece subsídios científicos para o desenvolvimento de processos biotecnológicos sustentáveis voltados à degradação da biomassa lignocelulósica

Embora o estudo tenha avançado na caracterização do potencial celulolítico de rizobactérias amazônicas e na identificação de consórcios bacterianos promissores, ainda há lacunas a serem exploradas, especialmente quanto aos mecanismos moleculares e fisiológicos envolvidos nas interações observadas. Pesquisas futuras podem empregar abordagens ômicas (genômica, transcriptômica e proteômica) para elucidar genes, vias metabólicas e sistemas

regulatórios relacionados à produção de celulases, bem como refinar a identificação taxonômica das linhagens por meio de análises filogenéticas mais robustas, contribuindo para uma compreensão mais precisa da diversidade funcional presente na rizosfera.

Há necessidade de investigar a influência de parâmetros físico-químicos na produção enzimática, visando à otimização e escalabilidade dos consórcios bacterianos, bem como avaliar sua estabilidade e eficiência em condições próximas às ambientais ou industriais. Estudos futuros também devem considerar os efeitos da inoculação desses microrganismos no solo e a caracterização bioquímica detalhada das enzimas produzidas, ampliando seu potencial de aplicação agrícola, ecológica e industrial. Em conjunto, essas perspectivas reforçam que os resultados obtidos constituem uma base sólida para o desenvolvimento de soluções biotecnológicas sustentáveis voltadas à degradação da biomassa lignocelulósica.

9. REFERÊNCIAS

ABDULLAH, R.; CHUDHARY, S. N.; KALEEM, A.; IQTEDAR, M.; NISAR, K.; IFTIKHAR, T.; SALEEM, F.; NAZ, S.. Enhanced production of β -glucosidase by locally isolated fungal strain employing submerged fermentation. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 35, n. 5, p. 1552-1559, set./out. 2019. DOI: 10.14393/BJ-v35n5a2019-47943

ADLAKHA, N.; RAJAGOPAL, R.; KUMAR, S.; REDDY, S. V.; YAZDANI, S. S. Synthesis and characterization of chimeric proteins based on cellulase and xylanase from an insect gut bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 14, p. 4859–4866, 2011.

ADRIO, J. L.; DEMAINE, A. L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. **Biomolecules**, v. 4, n. 1, p. 117–139, 2014.

AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. **Journal of King Saud University - Science**, v. 26, n. 1, p. 1–20, 2014.

ALPER, H.; STEPHANOPOULOS, G. Engineering for biofuels: exploiting innate microbial capacity or importing biosynthetic potential? **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, p. 715–723, 2009.

ALVES, B. A.; ROTTA, I. S.; FERREIRA-MACHADO, A. B.; PAIVA, A. D. Bioprospecção e caracterização de bactérias produtoras de celulase a partir do solo do Cerrado brasileiro. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 8, p. 1–11, 2021.

ANDREWS, J. H. Biological control in the phyllosphere. **Annual Review of Phytopathology**, v. 30, p. 603–635, 1992.

ARAÚJO, A. S.; MARTINS, E. DA S. Produção de α -amilases por *Rhizomucor miehei* e *Syncephalastrum racemosum* em diferentes condições fermentativas. **Nucleus**, v. 15, n. 2, p. 583–592, 2018.

ARANTES, V.; SADLER, J.N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**. 2010 Article in press. doi:10.1186/1754-6834-3-4.

ARIFFIN, H. et al. Production of bacterial endoglucanase from pretreated oil palm empty fruit bunch by *Bacillus pumilus* EB3. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 106, n. 3, p. 231–236, 2008.

ASHA, B. M.; REVATHI, M.; YADAV, A.; SAKTHIVEL, N. Purification and characterization of a thermophilic cellulase from a novel cellulolytic strain, *Paenibacillus barcinonensis*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 1501–1509, 2012.

AZEVEDO, L. C. B. et al. Microbial contribution to the carbon flux in the soil: a literature review. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 2024. DOI: 10.36783/18069657rbcs20230065.

BADER, J.; MAST-GERLACH, E.; POPOVIĆ, M. K.; BAJPAI, R.; STAHL, U. Relevance of microbial coculture fermentations in biotechnology. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 2, p. 371–387, 2010.

BADRI, D; VIVANCO, J. M. Regulation and function of root exudates. **Plant, Cell & Environment**, v. 32, n. 6, p. 666–681, 2009.

BARAMEE, S.; PHITSUWAN, P.; WAEONUKUL, R.; PASON, P.; TACHAAPAUKOON, C.; KOSUGI, A.; RATANAKHANOKCHAI, K. Alkaline xylanolytic-cellulolytic multienzyme complex from the novel anaerobic alkalithermophilic bacterium *Cellulosibacter alkalithermophilus* and its hydrolysis of insoluble polysaccharides under neutral and alkaline conditions. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 4, p. 643–650, 2015.

BEAUCHEMIN, K.; COLOMBATTO, D.; MORGAVI, D.; YANG, W. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 37–47, 2003.

BEGUIN, P.; AUBERT, J. P. **The biological degradation of cellulose**. FEMS Microbiology Reviews, v. 13, n. 1, p. 25–58, 1994. DOI: 10.1111/j.1574-6976.1994.tb00033.x

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, p. 478–486, 2012.

BERG, G.; GRUBE, M.; SCHLOTTER, M.; SMALLA, K. Unraveling the plant microbiome: looking back and future perspectives. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 148, 2014.

BERTHELOT, K.; DELMOTTE, F. M. Purification and characterization of an α -glucosidase from *Rhizobium* sp. (*Robinia pseudoacacia* L.) strain USDA 4280. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 2907–2911, 1999.

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

BHAT, M. K.; BHAT, S. **Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications**. Biotechnology Advances, v. 15, p. 583–620, 1997.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 1327–1350, 2012.

BON, E. P.; GÍRIO, F.; PEREIRA JUNIOR, N. Enzimas na produção de etanol. In: BON, E. P. S. et al. (Eds.). *Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado*. 1. ed. Rio de Janeiro: **Interciência**, 2008. p. 241–271, 2008.

BORNEMAN, J.; TRIPLET, E. W. Molecular microbial diversity in soils from Eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 2647–2653, 1997.

BRENNER, K.; YOU, L.; ARNOLD, F. H. Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 9, p. 483–489, 2008.

BRUNECKY, R.; ALAHUHTA, M.; XU, Q.; DONOHUE, B. S.; CROWLEY, M. F.; KATAEVA, I. A.; BOMBLE, Y. J. Revealing nature's cellulase diversity: the digestion mechanism of *Caldicellulosiruptor bescii* CelA. **Science**, v. 342, n. 6165, p. 1513–1516, 2013.

BULGARELLI, D.; SCHLAEPPI, K.; SPAEPEN, S.; VAN THEMAAT, E. V. L.; SCHULZE-LEFERT, P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, p. 807–838, 2013.

CANOVA, S. P. **Diversidade e bioprospecção de actinobactérias isoladas de manguezais**. 2009. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

CARDOSO, W. S. **Obtenção e caracterização de celulases de fungos de podridão branca em fermentação no estado sólido e sacarificação da palha de sorgo visando a produção de etanol**. Tese. Viçosa, Minas Gerais. 2012

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

CASTRO, R. A.; QUECINE, C. Q.; LACAVA, P. T.; BATISTA, B. D.; LUVIZOTTO, D. M.; MARCON, J.; FERREIRA, A.; MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Isolation and enzyme bioprospection of endophytic bacteria associated with plants of Brazilian mangrove ecosystem. **SpringerPlus**, v. 3, p. 1–9, 2014.

CÁUPER, L. L. D. B. **Degradação de petróleo e derivados por isolados de rizobactérias e *Trichoderma* spp.** 2018. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

CHAKRABORTY, S. S. Microbial lipases: versatile enzymes with immense industrial potential. **International Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 37–42, 2023.

CHANTARASIRI, A. Aquatic *Bacillus cereus* JD0404 isolated from the muddy sediments of mangrove swamps in Thailand and characterization of its cellulolytic activity. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 41, n. 3, p. 257–264, 2015.

CHEN, JILI; DONG, JIABANG; XIAO, ZHIWEN; JIANG, DONG; YU, JIALONG; TIẾN, LƯƠNG HÙNG; TÍN, HOÀNG TRUNG; ZHAO, XIAOJUN; LIU, TAO. Genomics and metabolomics assisted functional characterization of *Bacillus* sp. 3 D83 as a biocontrol and plant growth-promoting bacterium. **Microbiology Spectrum**, v. 13, n. 9, e00300-25, 6 ago. 2025. doi:10.1128/spectrum.00300-25. PMCID: PMC12403654

CHE, S.; MEN, Y. Synthetic microbial consortia for biosynthesis and biodegradation: promises and challenges. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 46, n. 9–10, p. 1343–1358, 2019.

CHEN, L.; SHI, H.; HENG, J.; WANG, D.; BIAN, K. Antimicrobial, plant growth-promoting and genomic properties of *Bacillus* sp. 3. **Journal of Biotechnology**, v. 320, p. 9–17, 2020a.

CHEN, X.; ZHANG, Y.; FU, X.; LI, Y.; WANG, Q. *Bacillus* sp. 3: a potential and efficient biocontrol agent. **Biological Control**, v. 145, p. 104–112, 2020b.

COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 669–678, 2010.

COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLÉMENT, C.; BARKA, E. A. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action,

and future prospects. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 4951–4959, 2005.

CORTES-TOLALPA, L.; SALLES, J, F.; VAN E.; DIRK. J. Bacterial synergism in lignocellulose biomass degradation – complementary roles of degraders as influenced by complexity of the carbon source. *FRONTIERS IN MICROBIOLOGY*, v. 8, art. 1628, 10 out. 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01628.

COSTA, M. A. **Caracterização funcional de rizobactérias associadas a plantas leguminosas**. 2017. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

COSTA, S. C. F. D. C. **Seleção de rizobactérias capazes de degradar a farinha do mesocarpo do babaçu para fins biotecnológicos**. 2017. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

COUGHLAN, M. P. **Cellulose hydrolysis: the potential, the problems and relevant research at Galway**. *Biochemical Society Transactions*, 13 (2): 405–406, 1985. <https://doi.org/10.1042/bst0130405>

DANTUR, K. I.; ENRIQUE, R.; WELIN, B.; CASTAGNARO, A. P. Isolation of cellulolytic bacteria from the intestine of *Diatraea saccharalis* larvae and evaluation of their capacity to degrade sugarcane biomass. **AMB Express**, v. 5, p. 15, 2015.

DAS, K.; MUKHERJEE, A. K. Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid-state fermentation systems using a cheap carbon source: industrial applications of biosurfactants. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 8, p. 1191–1199, 2007.

DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p. 847–867, 2000. DOI: 10.1128/MMBR.64.4.847-867.2000

DAVIES, G.; HENRISSAT, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. **Structure**, v. 3, p. 853–859, 1995. <https://doi.org/10.1128/mmbr.64.4.847-867.2000>

DAZZO, F. B.; TRUCHET, G. L.; SHERWOOD, J. E.; HRABAK, E. M.; ABE, M.; PANKRATZ, S. H. Specific phases of root hair attachment in the *Rhizobium trifolii*-clover symbiosis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, p. 1140–1150, 1984.

DE CARVALHO, L. M. J.; DE CASTRO, I. M.; DA SILVA, C. A. B. A study of retention of sugars in the process of clarification of pineapple juice (*Ananas comosus* L. Merrill) by micro- and ultrafiltration. **Journal of Food Engineering**, v. 87, p. 447–454, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.12.015>

DHIMAN, T.; ZAMAN, M.; MACQUEEN, I.; BOMAN, R. Influence of corn processing and frequency of feeding on cow performance. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 217–226, 2002.

DIEZ-MENDEZ, A.; MENENDEZ, E.; GARCIA-FRAILE, P.; CELADOR-LERA, L.; RIVAS, R.; MATEOS, P. F. *Rhizobium cellulosilyticum* as a co-inoculant enhances *Phaseolus vulgaris* grain yield under greenhouse conditions. **Symbiosis**, v. 67, p. 135–141, 2015.

DODD, I. C.; ZINOVKINA, N. Y.; SAFRONOVA, V. I.; BELIMOV, A. A. Rhizobacterial mediation of plant hormone status. **Annals of Applied Biology**, v. 157, n. 3, p. 361–379, 2010.

EADY, R. R.; POSTGATE, J. R. Nitrogenase. **Nature**, London, v. 249, p. 805–810, 1974.

FAN, B.; WANG, C.; DING, X.; WU, L.; WU, H.; BORRIS, R. *Bacillus* sp. 3 FZB42 in 2018: a Gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2491, 2018.

FARINA, P. F. **Efeito das adições de tratamentos criogênicos e de alívio de tensões no ciclo térmico do aço ferramenta AISI D2**. 2011. Tese (Doutorado em Engenharia) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo.

FERBIYANTO, A.; RUSMANA, I.; RAFFIUDIN, R. Characterization and identification of cellulolytic bacteria from gut of worker *Macrotermes gilvus*. **HAYATI Journal of Biosciences**, v. 22, n. 4, p. 197–200, 2015.

FERREIRA RG, AZZONI AR, FREITAS S. Techno-economic analysis of the industrial production of a low-cost enzyme using *E. coli*: the case of recombinant β -glucosidase. **Biotechnol Biofuels**. 11(81):1-13, 2018.

FLORENCIO, C.; COURI, S.; FARINAS, C. S. Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by *Trichoderma* strains. **Enzyme Research**, p. 1–7, 2012.

FLORES-FÉLIX, J. D.; MENÉNDEZ, E.; RIVERA, L. P.; MARCOS-GARCÍA, M.; MARTÍNEZ-HIDALGO, P.; MATEOS, P. F.; RIVAS, R. Use of *Rhizobium leguminosarum* as a potential biofertilizer for *Lactuca sativa* and *Daucus carota* crops. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 176, p. 876–882, 2013.

FUJISHIGE, N. A.; KAPADIA, N. N.; DE HOFF, P. L.; HIRSCH, A. M. Investigations of *Rhizobium* biofilm formation. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 56, p. 195–206, 2006.

GAIERO, J. R.; MCCALL, C. A.; THOMPSON, K. A.; DAY, N. J.; BEST, A. S.; DUNFIELD, K. E. Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion. **American Journal of Botany**, v. 100, n. 9, p. 1738–1750, 2013. DOI:10.3732/ajb.1200572

GALBE, M.; WALLBERG, O. Pretreatment for biorefineries: a review of common methods for efficient utilization of lignocellulosic materials. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 1–26, 2019.

GAO, Z. et al. A novel salt-tolerant endo-1,4-glucanase Cel 5A in *Vibrio* sp. G21 isolated from mangrove soil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 4, p. 1373–1382, 2010.

GARCÍA-FRAILE, P.; CARRO, L.; ROBLEDO, M.; RAMIREZ-BAHENA, M. H.; FLORES-FÉLIX, J. D.; FERNÁNDEZ, M. T.; VELÁZQUEZ, E. *Rhizobium* promotes non-legumes growth and quality in several production steps: towards a biofertilization of edible raw vegetables healthy for humans. **PLoS ONE**, v. 7, p. 1–7, 2012.

GARCÍA-FRAILE, P.; RIVAS, R.; WILLEMS, A.; PEIX, A.; MARTENS, M.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; MATEOS, P. F.; VELÁZQUEZ, E. *Rhizobium cellulosilyticum* sp. nov., isolated

from sawdust of *Populus alba*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 844–848, 2007.

GAUR, R.; TIWARI, S. Isolation, production, purification and characterization of an organic-solvent-thermostable alkalophilic cellulase from *Bacillus vallismortis* RG-07. **BMC Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 19, 2015.

GEOFFRY, K.; ACHUR, R. N. Screening and production of lipase from fungal organisms. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 241–253, 2018. DOI:10.1016/j.bcab.2018.03.009

GHOSE, T. K. **Measurement of cellulase activities**. Pure and Applied Chemistry, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GLICK, B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological Research**, v. 169, n. 1, p. 30–39, 2014. DOI:10.1016/j.micres.2013.09.009

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

GLICK, B. R.; CHENG, Z.; CZARNY, J.; DUAN, J. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 119, p. 329–339, 2007. DOI: 10.1007/s10658-007-9162-4.

GOMES, M. J. P. **Serviço de Bacteriologia Veterinária**. Repositório Digital, FAVET-UFRGS, 48 p., 2013.

GONZÁLEZ-SISO, M.-I.; BECERRA, M. Novel microbial enzymes with industrial applications. **Microorganisms**, v. 11, n. 4, p. 986, 2023.

GROSSKOPF, T.; SOYER, O. S. Synthetic microbial communities. **Current Opinion in Microbiology**, v. 18, p. 72–77, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.02.002>

GUPTA, G.; PARIHAR, S. S.; AHIRWAR, N. K.; SNEHI, S. K.; SINGH, V. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 7, p. 96-102, 2015.

GUPTA, R.; KHASA, Y. P.; KUHAD, R. C. Evaluation of pretreatment methods in improving the enzymatic saccharification of cellulosic materials. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 1103-1109, 2011.

GUPTA, V. K.; KUBICEK, C. P.; BERRIN, J. P.; WILSON, D. W.; COUTURIER, M.; BERLIN, A.; FILHO, E. X. F.; EZEJI, T. Fungal enzymes for bio-products from sustainable and waste biomass. **Trends in Biochemical Sciences**, London, v. 41, n. 7, p. 633-645, 2016.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, p. 1-9, 2001.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia**, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

HIMMEL, M. E.; DING, S. Y.; JOHNSON, D. K.; ADNEY, W. S.; NIMLOS, M. R.; BRADY, J. W. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**, v. 315, p. 804-807, 2007.

HIMMEL, M. E.; RUTH, M. F.; WYMAN, C. E. Cellulase for commodity products from cellulosic biomass. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, p. 358-364, 1999.

HUBBELL, D. H.; MORALES, V. M.; UMALLI-GARCIA, M. Pectolytic enzymes in *Rhizobium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 210-213, 1978.

HUNGRIA, M. Metabolismo do carbono e do nitrogênio nos nódulos. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. (eds.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa, p. 890, 1994.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p. 2761–2764, 2007.

JIMENEZ-ZURDO, J. I.; MATEOS, P. F.; DAZZO, F. B.; MARTINEZ-MOLINA, E. Cell bound cellulase and polygalacturonase production by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 28, n. 7, p. 917-921, 1996.

JOHNS, N. I.; BLAZEJEWSKI, T.; GOMES, A. L. C.; WANG, H. H. Principles for designing synthetic microbial communities. **Current Opinion in Microbiology**, v. 31, p. 146–153, 2016.

KAPOOR, R. K.; RAJAN, K., eds. Lignocellulosic Biomass and Enzymes: Fundamentals, Emerging Technologies, and Applications. **Catalysis Research**, 5(2): 004. 2025. doi:10.21926/cr.2502004.

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, n. 5, p. 503–507, 2008.

KIM, B. K. et al. Purification and characterization of carboxymethylcellulase isolated from a marine bacterium, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* A-53. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, n. 6-7, p. 411-416, 2009.

KLOEPPER, J. W.; LEONG, J.; TEINTZE, M.; SCHROTH, M. N. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. **Nature**, v. 286, p. 885–886, 1980.

KO, C. H.; TSAI, C. H.; LIN, P. H.; CHANG, K. C.; TU, J.; WANG, Y.-N.; YANG, C.-Y. Characterization and pulp refining activity of a *Paenibacillus campinasensis* cellulase expressed in *Escherichia coli*. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 20, p. 7882–7888, 2010. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.05.043.

KOECK, D. E.; PECHTL, A.; ZVERLOV, V. V.; SCHWARZ, W. H. Genomics of cellulolytic bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, 2014.

KORPOLE, S.; SHARMA, R.; VERMA, D. Characterization and phylogenetic diversity of carboxymethyl cellulase producing *Bacillus* species from a landfill ecosystem. **Indian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 531-535, 2011.

KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; SINGH, A. Microbial cellulases and their industrial applications. **Enzyme Research**, p. 1-11, 2011.

KULKARNI, T. S.; KHAN, S.; VILLAGOMEZ, R.; MAHMOOD, T.; LINDAHL, S.; LOGAN, D. T.; NORDBERG KARLSSON, E. Crystal structure of β -glucosidase 1A from *Thermotoga neapolitana* and comparison of active site mutants for hydrolysis of flavonoid glucosides. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 85, n. 5, p. 872–884, 2017.

KUMAR, A.; GAUTAM, A.; DUTT, D. Co-cultivation of *Penicillium* sp. AKB-24 and *Aspergillus nidulans* AKB-25 as a Cost-Effective method to produce cellulases for the hydrolysis of pearl millet stover. **Fermentation**, v2, p. 12, 2016.

LACAVA, P. T.; AZEVEDO, J. L. Endophytic bacteria: a biotechnological potential in agrobiological system. In: MAHESHWARI, D. K.; SARAH, M.; AERON, A. (eds.). **Bacteria in Agrobiological: Crop Productivity**. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, p. 1-44, 2013.

LEALEM, F.; GASHE, B. A. Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eragrostis tef*). **Journal of Applied Bacteriology**, v. 77, p. 348-352, 1994.

LEBEIS, S. L. et al. PLANT MICROBIOME: Salicylic acid modulates colonization of the root microbiome by specific bacterial taxa. **Science**, v. 349, n. 6250, p. 860–864, 2015.

LEE, YOU-JUNG; KIM, BO-KYUNG; LEE, BO-HWA; JO, KANG-IK; LEE, NAM-KYU; CHUNG, CHUNG-HAN; LEE, YOUNG-CHOON; LEE, JIN-WOO. Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 2, p. 378–386, 2008. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.12.013.

LIU, X.; KOKARE, C. Microbial Enzymes of Use in Industry. In: **Biotechnology of Microbial Enzymes**. [s.l.]: Elsevier, p. 267–298, 2017.

LÓPEZ, M.; SIGNER, E. Degradative enzymes in *Rhizobium meliloti*. In: VERMA, D.; BRISSON, N. (eds.). **Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, p. 185-187, 1987.

LUZ, B. D. D. S.; BICAS, J. L.; SARROUH, B.; LOFRANO, R. C. Z. Bioprospecção de microrganismos produtores de enzimas de interesse industrial realizada no Parque Estadual Serra do Ouro Branco, Brasil. **Interbio**, v. 10, p. 14–24, 2016.

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

LU, F.; RALPH, J. Solution-State NMR of Lignocellulosic Biomass. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, v. 5, n. 2, p. 169-180, 2011. doi:10.1166/jbmb.2011.1131

MANDELS, M.; WEBER, J. **Production of cellulases**. Advances in Chemistry Series, v. 95, p. 391-414, 1969.

MARTIN, M. M. **Cellulose digestion in insects**. Comparative Biochemistry and Physiology. v. 75A, n. 3, p. 313-324, 1983.

MARTINS, C. R. F.; FERREIRA, J. A. P. S.; FERREIRA, L. A. P.; SIQUEIRA, L. F. G.; BAZZO, M. L.; FRANCHINI, M.; BERRO, O. J.; VALLE, S.; RIBINIK, M. L. R.; MARTELETO, M. A. **Técnica de coloração de Gram**. Brasília: Ministério da Saúde, Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS, Série TELELAB, 63 p. 1997.

MARTINEZ-MOLINA, E.; MORALES, V. M.; HUBBELL, D. Hydrolytic enzyme production by *Rhizobium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 1186-1188, 1979.

MARTÍNEZ-ROSALES, C.; CASTRO-SOWINSKI, S. Antarctic bacterial isolates that produce cold-active extracellular proteases at low temperature but are active and stable at high temperature. **Polar Research**, v. 30, p. 7123, 2011.

MATEOS, P. F.; BAKER, D. L.; PHILIP-HOLLINGSWORTH, S.; SQUARTINI, A.; PARUFFO, A. D. B.; NUTI, M. P.; DAZZO, F. B. Direct in situ identification of cellulose microfibrils associated with *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* attached to the root epidermis of white clover. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 202–207, 1995.

MCKELVEY, S. M.; MURPHY, R. A. Biotechnological Use of Fungal Enzymes. In: KAVANAGH, K. (ed.). **Fungi: Biology and applications**. John Wiley & Sons Ltd, p. 179–204, 2017.

MEDIE, F. M.; DAVIES, G. J.; DRANCOURT, M.; HENRISSAT, B. Genome analyses highlight the different biological roles of cellulases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 227–234, 2012.

MEE, M. T.; COLLINS, J. J.; CHURCH, G. M.; WANG, H. H. Syntrophic exchange in synthetic microbial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 20, p. E2149–E2156, 2014.

MENENDEZ, E.; GARCIA-FRAILE, P.; RIVAS, R. Biotechnological applications of bacterial cellulases. **AIMS Journal**, v. 2, n. 3, p. 163-182, 2015.

MILLER, G. L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar**. Analytical Chemistry, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MINELLI-OLIVEIRA, C. **Caracterização das amilases produzidas por isolados de rizóbios e mutantes de *Bacillus* sp. provenientes de solos amazônicos**. Dissertação (Mestrado em Agronomia Tropical) – Universidade Federal do Amazonas, 100 p., 2013.

MINUSSI, R. C.; PASTORE, G. M.; DURÁN, N. Potential applications of laccase in the food industry. **Trends in Food Science and Technology**, v. 13, p. 205-216, 2002.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista Processos Químicos**, v. 3, p. 9-23, 2009.

MORALES, V.; MARTINEZ-MOLINA, E.; HUBBEL, D. Cellulase production by *Rhizobium*. **Plant and Soil**, v. 80, n. 3, p. 407-415, 1984.

MRUDULA, S.; MURUGAMMAL, R. Production of cellulase by *Aspergillus niger* under submerged and solid-state fermentation using coir waste as a substrate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1119-1127, 2011.

MUSSATO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. Enzimas: poderosas ferramentas na indústria. **Ciência Hoje**, v. 41, p. 28-33, 2007.

NAPOLI, C. A.; DAZZO, F. B.; HUBBELL, D. H. Production of cellulose microfibrils by *Rhizobium*. **Applied Microbiology**, v. 30, p. 123–131, 1975.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 975 p., 2004.

NIGAM, P. S. Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications. **Biomolecules**, v. 3, p. 597–611, 2013.

NOGUEIRA, E. B. S.; CAVALCANTI, M. A. Q. Cellulolytic fungi isolated from processed oats. **Revista de Microbiologia**, v. 27, p. 7–9, 1996.

OLIVEIRA, T. C.; MINELLI-OLIVEIRA, C.; MENEZES, N. C.; RODRIGUES, S. P.; DA SILVA, J. C. I.; DE OLIVEIRA, L. A. Atividades amilolíticas de rizobactérias amazônicas em meios de cultura contendo amido de milho (*Zea mays* L.) ou farinha de babaçu (*Orbignya phalerata* Mart.). **Research, Society and Development**, v. 11, n. 5, 2022.

OSÓRIO FILHO, B. D.; GANO, K. A.; BINZ, A.; LIMA, R. F.; AGUILAR, L. M.; RAMIREZ, A.; GIONGO, A. Rhizobia enhance growth in rice plants under flooding conditions. **American and Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Science**, v. 14, n. 8, p. 707-718, 2014.

PAMPHILE, J. A.; COSTA, A. T.; ROSSETO, P.; POLONIO, J. C.; PEREIRA, J. O.; AZEVEDO, J. L. Aplicações biotecnológicas de metabólitos secundários extraídos de fungos endofíticos: o caso do *Colletotrichum* sp. **Revista UNINGÁ**, v. 53, n. 1, p. 113–119, 2017.

PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C. R.; SOCCOL, V. T.; SINGH, D.; MOHAN, R. Advances in microbial amylases. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 31, n. 2, p. 135–152, 2000.

PARK, S.; JOHNSON, D. K.; ISHIZAWA, C. I.; PARILLA, P. A.; DAVIS, M. F. Measuring the crystallinity index of cellulose by solid state C-13 nuclear magnetic resonance. **Cellulose**, v. 16, n. 4, p. 641–647, 2009.

PATEL, A. K.; PANDEY, A.; SINGHANIA, R. R. Production of Cellulolytic Enzymes for Lignocellulosic Biomass Hydrolysis. In: PANDEY, A.; LARROCHE, C.; DUSSAP, C.; GNANSOUNOU, E.; KHANAL, S. K.; RICKE, S. Biofuels: **Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the Production of Liquid and Gaseous Biofuels**. 2. ed. Academic Press, 2019. p. 401–426.

PEIX, A.; RIVAS-BOYERO, A. A.; MATEOS, P. F.; RODRIGUEZ-BORRUECO, C.; MARTINEZ-MOLINA, E.; VELAZQUEZ, E. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, n. 1, p. 103–110, 2001.

PENG, Q.; WANG, X.; SHANG, M.; HUANG, J.; GUAN, G.; LI, Y.; SHI, B. Isolation of a novel alkaline-stable lipase from a metagenomic library and its specific application for milkfat flavor production. **Microbial Cell Factories**, 2014, v. 13, p. 1.

PERCIVAL-ZHANG, Y. H. What is vital (and not vital) to advance economically-competitive biofuels. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 2091–2110, 2006.

PHILIPPOT, L.; RAAIJMAKERS, J. M.; LEMANCEAU, P.; VAN DER PUTTEN, W. H. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 11, p. 789–799, 2013.

PRAKASH, V.; ADHIKARI, S.; GUPTA, G. N.; MISHRA, P. K. Isolation, partial purification and characterization of cellulase from *Bacillus* isolates. **The Allahabad Farmer**, v. LXIV, Jan., p. 69–77, 2009.

PRIEST, F. G. **Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus***. Bacteriological Reviews, v. 41, n. 3, p. 711–753, 1977.

QUEIROZ, G. O.; JORDÃO, R. C. C.; SALGUEIRO, A. A. Seleção de microrganismos produtores de celulasas e de lacases a partir de efluente de fábrica de papel. **Revista de Química e Tecnologia**, v. 1, n. 1, p. 7–10, 2002.

RABBEE, M. F.; ALI, M. S.; CHOI, J. et al. *Bacillus* sp. 3: a valuable member for bioactive molecules production. **Microbiological Research**, v. 223–225, p. 103–111, 2019.

RATSOGI, G.; MUPPIDI, G.; GURRAM, R.; ADHIKARI, A.; BISCHOFF, K.; HUGHES, S.; APEL, W.; BANG, S.; DIXON, D.; SANI, R. Isolation and characterization of cellulose-degrading bacteria from the deep subsurface of the Homestake gold mine, Lead, South Dakota, USA. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 4, p. 585–598, 2009. doi:10.1007/s10295-009-0528-9..

REDDY, M.M., VIVEKANANDHAN, S., MISRA, M., BHATIA, S.K. AND MOHANTY, A.K. (2013) Biobased Plastics and Bionanocomposites: Current Status and Future Opportunities. **Progress in Polymer Science**, 38, 1653–1689. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.05.006>

ROBLEDO, M.; JIMENÉZ-ZURDO, J. I.; VELÁZQUEZ, E.; TRUJILLO, M. E.; ZURDO-PIÑEIRO, J. L.; RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; RAMOS, B.; DÍAZ-MÍNGUEZ, J. M.; DAZZO, F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; MATEOS, P. F. *Rhizobium* cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p. 7064–7069, 2008.

ROBLEDO, M.; RIVERA, L.; JIMENÉZ-ZURDO, J. I.; RIVAS, R.; DAZZO, F.; VELÁZQUEZ, E.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; HIRSCH, M. A.; MATEOS, P. F. Role of

Rhizobium endoglucanase CelC2 in cellulose biosynthesis and biofilm formation on plant roots and abiotic surfaces. **Microbial Cell Factories**, v. 11, p. 125, 2012.

RUEGGER, M. J. S.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, p. 205–211, 2004.

SAJITH, S.; PRIJI, P.; SREEDEVI, S.; BENJAMIN, S. An overview on fungal cellulases with an industrial perspective. **Journal of Nutrition and Food Sciences**, v. 6, n. 1, p. 1–13, 2016.

SALEH-RASTIN, N.; PETERSEN, M.; COLEMAN, S.; HUBBELL, D. H. Rapid plate assay for hydrolytic enzymes of *Rhizobium*. In: KEISTER, D.; GREGON, P. (Eds.). **The Rhizosphere and Plant Growth**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p. 188.

SALIHU, A.; ABBAS, O.; SALLAU, A.B. et al. Agricultural residues for cellulolytic enzyme production by *Aspergillus niger*: effects of pretreatment. 3 **Biotech** v. 5, p. 1101–1106, 2015.

SANTANA, L. A. R. CLARO, E. M. T.; FERNANDES, F. M.; OTENIO, M. H.; RODARTE, M. P. Avanços na biotecnologia de enzimas hidrolíticas industriais: biodigestão anaeróbia como fonte de microrganismos produtores. **Revista Científica da FAMINAS**, v. 19, n. 2, p. 1–12, 2024.

SANTANA, M. S. **Produção, caracterização, aplicação e determinação estrutural de celulase de *Moniliophthora perniciosa***. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, 2010.

SARKO, A. Cellulose – How much do we know about its structure? In: KENNEDY, J. F.; PHILLIPS G. O.; WILLIAMS, P. A.; CHICHESTER, E. H. **Wood and Cellulosics: Industrial Utilization. Biotechnology, Structure and Properties**. British Polymer Journal. New York: John Wiley & Sons, 1997.

SCHAEFER, C. E. G. R. Brazilian latosols and their B horizon microstructure as long-term biotic constructs. **Australian Journal of Soil Research**, v. 39, p. 909–926, 2001.

SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O. P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 1–17, 2004.

SHAH, S. R. Chemistry and Applications of Cellulase in Textile Wet Processing. **Research Journal of Engineering Sciences**, v. 2, n. 7, p. 1–5, 2013.

SHETTY, SANGEETA; SARANGDHAR, VISHWAS C.; KAMAT, SHEELA D. *Study of a cellulase producer, Paenibacillus 50-01*. **Environment & Ecology**, v. 37, n. 1, p. 71–79, 2019.

SHWETA, A. Cellulases of bacterial origin and their applications: A review. **International Journal of Science and Research**, v. 3, p. 1652–1655, 2012.

SILVA ALBUQUERQUE, G. H.; NASCIMENTO COSTA, F.; RODRIGUES BRASIL, S. N.; SILVA, V. M. A.; SILVEIRA MARTINS, S. C., eds. **Atividade celulolítica de actinobactérias de solo do semiárido brasileiro**. In: Anais do I Congresso Internacional da Diversidade do Semiárido, Fortaleza, CE: Universidade Federal do Ceará, 2016.

SILVA, M. C. S. **Bioprospecção e caracterização de micro-organismos endofíticos de isolados de sementes de guaranazeiro e o controle da antracnose (*Colletotrichum spp.*)**. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

SILVA, V. M. A.; MARTINS, C. M.; MARTINS, S. C. S. Atividade Celulolítica de Actinobactérias de Região Semiárida do Ceará. **Enciclopédia Biosfera, Goiânia**, v. 11, p. 2026–2036, 2015.

SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, P. K. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. 3 **Biotech**, v. 6, p. 174, 1–15, 2016.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SUKUMARAN, R. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Role and significance of β glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 127, p. 500–507, 2013.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. J. **Methods in legume-*Rhizobium* technology**. Paia, Maui: University of Hawaii NifTAL Project and MIRCEN, Department of Agronomy and Soil Science, Hawaii Institute of Tropical Agriculture and Human Resources, 1985. 365 p.

SPERANDIO G. B.; FILHO E. X. F. Fungal Co-cultures in the lignocellulosic biorefinery context: A review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.142, p. 109-123, 2019.

SRINIVAS, T. N. R.; KUMAR, P. A.; MADHU, S.; SUNIL, B.; SHARMA, T. V. R. S.; SHIVAJI, S. *Cesiribacter andamanensis* gen. nov., sp. nov., isolated from a soil sample from a mud volcano. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 7, p. 1521–1524, 2011.

STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B. M. Taxonomic note: a place for DNA–DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in bacterial systematics. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, n. 4, p. 846–849, 1994.

SU, L. J.; ZHANG, H. F.; YIN, X. M.; CHEN, M.; WANG, F. Q.; XIE, H.; SONG, A. D. Evaluation of cellulolytic activity in insect digestive fluids. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 3, p. 2432–2441, 2013.

SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A. Microbial cellulases – Production, applications and challenges. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 64, n. 11, p. 832–844, 2005

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 109B, n. 1, p. 1–62, 1994.

TOJU, H. et al. **Core microbiomes for sustainable agroecosystems**. *Nature Plants*, v. 6, p. 247–257, 2020.

TRAN, D. T.; I, Y. P.; LIN, C. W. Developing co-culture system of dominant cellulolytic *Bacillus* sp. THLA0409 and dominant ethanolic *Klebsiella oxytoca* THLC0409 for enhancing

ethanol production from lignocellulosic materials. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 44, n. 5, p. 762–769, 2013.

TRIVEDI, N. et al. An alkali-halotolerant cellulose from *Bacillus flexus* isolated from green seaweed *Ulva lactuca*. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 2, p. 891–897, 2010.

TRIVEDI, P.; LEACH, J. E.; TRINGE, S. G.; SA, T.; SINGH, B. K. Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, p. 607–621, 2020.

US DOE. Breaking the biological barriers to cellulosic ethanol: a joint research agenda. DOE/SC-0095. U.S. **Department of Energy Office of Science and Office of Energy Efficiency and Renewable Energy**, 2006. Disponível em: <http://genomicscience.energy.gov/biofuels/b2bworkshop.shtml> . Acesso em: 15 jul. 2024.

US DOE. Genomics: GTL Roadmap. DOE/SC-0090. U.S. **Department of Energy Office of Science**, 2005. p. 204. Disponível em: https://www.genomicscience.energy.gov/wpcontent/uploads/2021/09/GenomicsGTL_Roadmap_lowres.pdf . Acesso em: 15 jul. 2024.

VAN DER HEIJDEN, M. G. A.; BARDGETT, R. D.; VAN STRAALLEN, N. M. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity. **Ecology Letters**, v. 11, n. 3, p. 296–310, 2008.

VAN DIJL, J. M.; HECKER, M. *Bacillus subtilis*: from soil bacterium to super-secreting cell factory. **Microbial Cell Factories**, v. 12, p. 3, 2013.

VAZ, L. P. N. **Obtenção de isolados de rizóbios com características agronômicas desejáveis provenientes de solos da região do Amazonas**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, 2013.

VIIKARI, L.; ALAPURANEN, M.; PURANEN, T.; VEHEMAANPERÄ, J.; SIIKA-AHO, M. 2007. Thermostable enzymes in lignocellulose hydrolysis. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, 108, 121–145.

VINCENT, J. M. **A manual for practical study of root nodule bacteria**. IBP Handbook, n. 15. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970. 140 p.

VORHOLT, J. A.; VOGEL, C.; CARLSTRÖM, C. I, MÜLLER, D. Establishing causality: opportunities of synthetic communities for plant microbiome research. **Cell Host & Microbe**, v. 22, n. 2, p. 142–155, 2017.

WIRTH, S.; ULRICH, A. Cellulose degrading potentials and phylogenetic classification of carboxymethyl-cellulose decomposing bacteria isolated from soil. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 25, n. 4, p. 584–591, 2002.

WONGPUTTISIN, P.; KHANONGNUCH, C.; KONGBUNTAD, W. Use of *Bacillus subtilis* isolates from Tuanao towards nutritional improvement of soya bean hull for monogastric feed application. **Letters in Applied Microbiology**, v. 59, p. 328–333, 2014.

YANG, W.; MENG, F.; PENG, J.; HAN, P.; FANG, F.; MA, L.; CAO, B. Isolation and identification of a cellulolytic bacterium from the Tibetan pig's intestine and investigation of its cellulase production. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 6, p. 262–267, 2014.

YIN, L. J.; HUANG, P. S.; LIN, H. H. Isolation of cellulase-producing bacteria and characterization of the cellulase from the isolated bacterium *Cellulomonas* sp. YJ5. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 17, p. 9833–9837, 2010.

ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Non-complexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, p. 797–824, 2004.

KOSTYLEV, M.; WILSON, D. Synergistic interactions in cellulose hydrolysis. **BIOFUELS**, v. 3, n. 1, p. 61–70, 2012. DOI: 10.4155/bfs.11.150.

ZHAO, SHUAI; YAN, YU-SI; HE, QI-PENG; YANG, LIN; YIN, XIN; LI, CHENG-XI; MAO, LI-CHUN; LIAO, LU-SHENG; HUANG, JIN-QUN; XIE, SHANG-BO; NONG, QING-DONG; ZHANG, ZHENG; JING, LEI; XIONG, YA-RU; DUAN, CHENG-JIE; LIU,

JUN-LIANG; FENG, JIA-XUN. Comparative genomic, transcriptomic and secretomic profiling of *Penicillium oxalicum* HP7-1 and its cellulase and xylanase hyper-producing mutant EU2106, and identification of two novel regulatory genes of cellulase and xylanase gene expression. . 9, art. 203, 2016. DOI: 10.1186/s13068-016-0616-9.

ZHENG, B.; YANG, W.; WANG, Y.; FENG, Y.; LOU, Z. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of thermophilic cellulase from *Fervidobacterium nodosum* Rt17-B1. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 65, n. 3, p. 219–222, 2009.

ZHOU, JIZHONG; DENG, YE; SHEN, LINA; WEN, CHONGQING; YAN, QINGYUN; NING, DALIANG; QIN, YUJIA; XUE, KAI; WU, LIYOU; HE, ZHILI; VOORDECKERS, JAMES W.; VAN NOSTRAND, JOY D.; BUZZARD, VANESSA; MICHALETZ, SEAN T.; ENQUIST, BRIAN J.; WEISER, MICHAEL D.; KASPARI, MICHAEL; WAIDE, ROBERT; YANG, YUNFENG; BROWN, JAMES H. Temperature mediates continental-scale diversity of microbes in forest soils. **Nature Communications**, v. 7, p. 12083, 05 jul. 2016. DOI: 10.1038/ncomms12083

ZUROFF, T. R.; CURTIS, W. R. Developing symbiotic consortia for lignocellulosic biofuel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 1423–1435, 2012.

APÊNDICES

APÊNDICE-A: produção de Fpase pelas linhagens *Bacillus* sp. 1 (INPA R-583), *Bacillus* sp. 2 (INPA R-774), *Bacillus* sp. 3 (INPA R-762) e *Bacillus* sp. 4 (INPA R-302 -Controle) em cultivadas individualmente.

Tempo (h)	<i>Bacillus</i> sp. 1 (INPA R-583)		<i>Bacillus</i> sp. 2 (INPA R-774)		<i>Bacillus</i> sp. 3 (INPA R-762)		<i>Bacillus</i> sp. 4 (INPA R-302 - Controle)	
	Atividade U/mL	DP	Atividade U/mL	DP	Atividade U/mL	DP	Atividade U/mL	DP
24	0,031	0,002	0,037	0,002	0,033	0,002	0,036	0,005
48	0,033	0,001	0,038	0,002	0,038	0,001	0,038	0,001
72	0,029	0,003	0,035	0,002	0,034	0,001	0,034	0,001
96	0,026	0,003	0,027	0,002	0,032	0,003	0,031	0,003
120	0,024	0,004	0,029	0,002	0,030	0,004	0,032	0,003
144	0,028	0,004	0,032	0,002	0,035	0,004	0,035	0,005
168	0,031	0,001	0,034	0,002	0,038	0,002	0,039	0,001
192	0,024	0,001	0,028	0,002	0,030	0,001	0,035	0,003
216	0,026	0,001	0,029	0,002	0,028	0,002	0,032	0,004
240	0,024	0,001	0,028	0,002	0,026	0,001	0,029	0,002

APÊNDICE-B: Produção de Fpase pelas linhagens *Bacillus* sp. 1 (INPA R-583), *Bacillus* sp. 2 (INPA R-774), *Bacillus* sp. 3 (INPA R-762) e *Bacillus* sp. 4 (INPA R-302 -Controle) cultivadas em co-cultivos triplo e duplos.

Tempo (h)	INPA R583, INPA R774 e						<i>Bacillus</i> sp. 4 (INPA R-302 -Controle)			
	INPA R762		INPA R583 e INPA R774		INPA R774 e INPA R764		INPA R583 e INPA R765			
	Atividade U/mL	DP	Atividade U/mL	DP	Atividade U/mL	DP	Atividade U/mL	DP	Atividade U/mL	DP
24	0,041	0,003	0,040	0,004	0,056	0,002	0,040	0,005	0,036	0,005
48	0,040	0,001	0,057	0,003	0,064	0,001	0,040	0,004	0,038	0,001
72	0,035	0,002	0,048	0,001	0,042	0,001	0,041	0,002	0,034	0,001
96	0,051	0,003	0,054	0,006	0,040	0,002	0,046	0,007	0,031	0,003
120	0,064	0,007	0,039	0,004	0,036	0,005	0,047	0,007	0,032	0,003
144	0,076	0,003	0,044	0,004	0,038	0,004	0,056	0,006	0,035	0,005
168	0,044	0,002	0,044	0,002	0,040	0,0008	0,043	0,001	0,039	0,001
192	0,039	0,003	0,034	0,002	0,032	0,0005	0,033	0,003	0,035	0,003
216	0,040	0,001	0,035	0,002	0,033	0,0008	0,032	0,001	0,032	0,004
240	0,040	0,001	0,032	0,002	0,031	0,002	0,029	0,001	0,029	0,002

APÊNDICE-C: Produção de CMCase pelas linhagens *Bacillus* sp. 1 (INPA R-583), *Bacillus* sp. 2 (INPA R-774), *Bacillus* sp. 3 (INPA R-762) e *Bacillus* sp. 4 (INPA R-302 -Controle) cultivadas individualmente.

Tempo (h)	<i>Bacillus</i> sp. 1 (INPA R-583)		<i>Bacillus</i> sp. 2 (INPA R-774)		<i>Bacillus</i> sp. 3 (INPA R-762)		<i>Bacillus</i> sp. 4 (INPA R-302 - Controle)	
	Atividade U/mL	DP	Atividade U/mL	DP	Atividade U/mL	DP	Atividade U/mL	DP
24	0,236	0,007	0,168	0,007	0,181	0,005	0,190	0,007
48	0,201	0,009	0,203	0,043	0,276	0,041	0,269	0,006
72	0,181	0,003	0,206	0,018	0,194	0,007	0,194	0,007
96	0,179	0,004	0,214	0,034	0,181	0,005	0,185	0,009
120	0,178	0,004	0,187	0,013	0,176	0,005	0,195	0,008
144	0,166	0,002	0,191	0,011	0,183	0,005	0,183	0,005
168	0,166	0,004	0,161	0,005	0,170	0,004	0,186	0,005
192	0,169	0,005	0,249	0,065	0,179	0,012	0,196	0,004
216	0,164	0,006	0,210	0,012	0,189	0,005	0,195	0,006
240	0,164	0,004	0,200	0,012	0,197	0,005	0,188	0,021

APÊNDICE-D: Produção de CMCase pelas linhagens *Bacillus* sp. 1 (INPA R-583), *Bacillus* sp. 2 (INPA R-774), *Bacillus* sp. 3 (INPA R-762) e *Bacillus* sp. 4 (INPA R-302 -Controle) cultivadas em co-cultivos triplo e duplos.

Tempo (h)	INPA R583, INPA R774 e INPA R762		INPA R583 e INPA R774		INPA R774 e INPA R764		INPA R583 e INPA R764		<i>Bacillus</i> sp. 4 (INPA R-302 -Controle)	
	Atividade U/mL	DP	Atividade U/mL	DP	Atividade U/mL	DP	Atividade U/mL	DP	Atividade U/mL	DP
24	0,181	0,008	0,162	0,003	0,192	0,013	0,245	0,013	0,190	0,007
48	0,178	0,004	0,166	0,012	0,171	0,010	0,251	0,017	0,269	0,006
72	0,236	0,016	0,198	0,008	0,187	0,010	0,242	0,009	0,194	0,007
96	0,251	0,012	0,199	0,006	0,186	0,005	0,329	0,020	0,185	0,009
120	0,313	0,011	0,194	0,007	0,192	0,006	0,337	0,020	0,195	0,008
144	0,318	0,032	0,195	0,002	0,186	0,006	0,240	0,010	0,183	0,005
168	0,253	0,010	0,176	0,008	0,224	0,011	0,209	0,021	0,186	0,005
192	0,223	0,028	0,175	0,015	0,232	0,008	0,214	0,005	0,196	0,004
216	0,181	0,009	0,178	0,010	0,236	0,008	0,167	0,007	0,195	0,006
240	0,195	0,019	0,180	0,015	0,231	0,008	0,183	0,013	0,188	0,021

APÊNDICE-E: Produção de Beta-glicosidase pelas linhagens *Bacillus* sp. 1 (INPA R-583), *Bacillus* sp. 2 (INPA R-774), *Bacillus* sp. 3 (INPA R-762) e *Bacillus* sp. 4 (INPA R-302 -Controle) cultivadas individualmente.

Tempo (h)	<i>Bacillus</i> sp. 1 (INPA R-583)		<i>Bacillus</i> sp. 2 (INPA R-774)		<i>Bacillus</i> sp. 3 (INPA R-762)		<i>Bacillus</i> sp. 4 (INPA R-302 - Controle)	
	Atividade U/mL	DP	Atividade U/mL	DP	Atividade U/mL	DP	Atividade U/mL	DP
24	0,212	0,081	0,225	0,129	0,309	0,118	0,235	0,111
48	0,241	0,104	0,196	0,086	0,300	0,020	0,284	0,036
72	0,241	0,094	0,317	0,036	0,332	0,004	0,330	0,057
96	0,319	0,125	0,532	0,092	0,225	0,023	0,239	0,013
120	0,301	0,117	0,547	0,037	0,242	0,048	0,293	0,038
144	0,279	0,110	0,490	0,081	0,328	0,019	0,278	0,054
168	0,476	0,188	0,408	0,061	0,327	0,025	0,281	0,022
192	0,348	0,139	0,512	0,086	0,312	0,040	0,299	0,030
216	0,458	0,102	0,452	0,023	0,337	0,009	0,328	0,014
240	0,178	0,072	0,258	0,009	0,266	0,021	0,185	0,042

APÊNDICE-F: Produção de Beta-glicosidase pelas linhagens *Bacillus* sp. 1 (INPA R-583), *Bacillus* sp. 2 (INPA R-774), *Bacillus* sp. 3 (INPA R-762) e *Bacillus* sp. 4 (INPA R-302 -Controle) cultivadas em co-cultivos tripo e duplos.

	INPA R583, INPA R774 e INPA R762		INPA R583 e INPA R774		INPA R774 e INPA R764		INPA R583 e INPA R764		<i>Bacillus</i> sp. 4 (INPA R-302 -Controle)	
Tempo (h)	Atividade U/mL	DP	Atividade U/mL	DP	Atividade U/mL	DP	Atividade U/mL	DP	Atividade U/mL	DP
24	0,472	0,199	0,397	0,172	0,405	0,188	0,380	0,144	0,235	0,111
48	0,509	0,067	0,537	0,103	0,315	0,130	0,265	0,124	0,284	0,036
72	0,625	0,076	0,589	0,105	0,486	0,089	0,370	0,016	0,330	0,057
96	0,521	0,073	0,470	0,067	0,345	0,036	0,073	0,033	0,239	0,013
120	0,456	0,059	0,521	0,138	0,325	0,142	0,137	0,027	0,293	0,038
144	0,515	0,064	0,474	0,083	0,069	0,022	0,128	0,017	0,278	0,054
168	0,459	0,080	0,444	0,091	0,096	0,068	0,112	0,014	0,281	0,022
192	0,500	0,071	0,509	0,092	0,090	0,016	0,101	0,010	0,299	0,030
216	0,528	0,115	0,430	0,082	0,104	0,009	0,102	0,014	0,328	0,014
240	0,333	0,048	0,327	0,010	0,101	0,030	0,094	0,018	0,185	0,042

