

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E
MOLECULAR DE MICRORGANISMO ASSOCIADOS À
INTERAÇÃO *Langsdorffia hypogaea*-HOSPEDEIRA-RIZOSFERA**

Érica Barbosa Felestrino

Ouro Preto, 2013

Érica Barbosa Felestrino

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E
MOLECULAR DE MICRORGANISMO ASSOCIADOS À
INTERAÇÃO *Langsdorffia hypogaea*-HOSPEDEIRA-RIZOSFERA**

Ouro Preto, 2013

Érica Barbosa Felestrino

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E
MOLECULAR DE MICRORGANISMO ASSOCIADOS À
INTERAÇÃO *Langsdorffia hypogaea*-HOSPEDEIRA-RIZOSFERA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Genômica e Proteômica.

Linha de pesquisa: Bioprospecção de microrganismos associados a plantas.

Orientador: Dr. Leandro Marcio Moreira

Ouro Preto, Minas Gerais - 2013

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe, ao meu irmão e a minha vó por acreditarem na minha capacidade.

Ao meu noivo pelo estímulo e por não me deixar desistir.

Ao meu orientador por compartilhar seus conhecimentos e pela paciência.

Luiz Rosa e Iara pela colaboração.

Jesus Aparecido Ferro e Agda Facincani por sequenciarem as amostras.

Aos professores: Renata Guerra, Silvana de Queiróz Silva, Cynthia Barros e Alessandro Varani que contribuíram cada um de uma forma.

Aos colegas de turma e ao LBBM, em especial a Sol e a Renatinha.

Aos mestres do Programa de Pós-Graduação pelos ensinamentos.

E à Deus!

*“Sede como os pássaros que, ao pousarem um instante sobre ramos muito leves,
sentem-nos ceder, mas cantam! Eles sabem que possuem asas.”*

Victor Hugo

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iv
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
INTRODUÇÃO.....	1
1-Diversidade de microrganismos associados a plantas	1
2-Interações entre plantas e microrganismos	2
3-Microrganismos que interagem com plantas e o controle de fitopatogenias	3
Ácido cianídrico.....	5
Antibióticos	6
Sideróforos.....	6
4-Bactérias promotoras de crescimento de plantas	7
Fixação de Nitrogênio.....	8
Íon amônio	9
Fosfato.....	9
Ácido Indol Acético (AIA)	10
5-Produção de compostos de interesse econômico/científico por microrganismos associados a plantas	11
Enzimas.....	11
Compostos secundários.....	13
6- Modelo de estudo	14
7- Importância do estudo.....	15
OBJETIVOS	17
Objetivo geral	17
Objetivos específicos:.....	17
METODOLOGIA	18
3.1-Área de estudo	18
3.2-Coleta amostral, seleção e isolamento dos microrganismos	19
3.3-Identificação morfológica dos isolados.....	20
3.3.1 – Coloração de Gram	20
3.3.2 – Micro-cultivo	21
3.4 - Identificação molecular de fungos e bactérias	21
3.4.1-Extração de DNA total.....	21
Fungos	21
Bactérias.....	22
3.4.2 - Agrupamento molecular	23
Fungos – PCR com iniciador (GTG)5	23
Bactérias – agrupamento Box.....	23
3.4.3- Obtenção dos amplicons	24
Fungos	24
Bactérias.....	24
3.4.4- Purificação dos amplicons	25
3.4.5- Reações de sequenciamento	25
3.4.6 - Precipitação da reação de sequenciamento	26

3.4.7 - Análise das sequências	26
3.5- Ensaio Bioquímicos	27
3.5.1-Produção de amônia	27
3.5.2-Produção de sideróforo.....	28
3.5.3- Fixação de nitrogênio.....	28
3.5.4- Produção de fosfato.....	28
3.5.5- Produção de ácido cianídrico (HCN)	29
3.5.6- Produção de ácido indol acético (AIA)	29
3.5.7- Produção de amilase	29
3.5.8- Produção de celulase.....	30
3.5.9- Produção de protease.....	30
3.5.10- Produção de pectinase.....	30
3.6 - Testes antimicrobianos	30
RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	32
4.1- Caracterização morfológica e molecular dos isolados	32
Fungos.....	33
Bactérias	36
4.2- Caracterização do potencial biotecnológico (Ensaio Bioquímicos).....	46
Fixação de nitrogênio.....	46
Produção de íon amônio	47
Produção de sideróforos	48
Solubilização de fosfato	49
Produção de ácido cianídrico (HCN).....	50
Produção de ácido indol acético (AIA)	52
Produção das enzimas amilase, celulase, protease e pectinase.....	53
Ensaio de atividade antimicrobiana	55
CONCLUSÕES.....	57
CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
PERSPECTIVAS	61
ANEXOS	72
Anexo I.....	72

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: REPRESENTAÇÃO DAS ASSOCIAÇÕES ENDOFÍTICAS, PATÓGENAS E EPIFÍTICAS.	2
FIGURA 2: PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS POR BACTÉRIAS E SUPRESSÃO DE ORGANISMOS FITOPATÓGENOS POR DIMINUIÇÃO DA DISPONIBILIDADE DE FE DO MEIO.	7
FIGURA 3: RELAÇÃO ENTRE A TAXA DE CRESCIMENTO E A MANUTENÇÃO DA SAÚDE VEGETAL COM BASE NO PERFIL ECOLÓGICO DA MICROBIOTA.....	11
FIGURA 4: CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E DE INTERAÇÃO DE <i>LANGSDORFFIA HYPOGAEA</i>	15
FIGURA 5: DETERMINAÇÃO GEOGRÁFICA DO LOCAL DE COLETA DAS AMOSTRAS.....	18
FIGURA 6: SÍNTESE REPRESENTATIVA DA METODOLOGIA DE SELEÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>LANGSDORFFIA</i> <i>HYPOGAEA</i> , SUA HOSPEDEIRA E RIZOSFERA CORRESPONDENTE.....	20
FIGURA 7: MODELO ESQUEMÁTICO DO TESTE DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA UTILIZANDO O SOBRENADANTE DAS BACTÉRIAS ISOLADAS.	31
FIGURA 8: CARACTERIZAÇÃO MACROMORFOLÓGICA DE ALGUNS DOS ISOLADOS DE FUNGOS, LEVEDURAS E BACTÉRIAS.	32
FIGURA 9: ESTRUTURAS REPRODUTIVAS DOS MORFOTIPOS DE FUNGOS.	33
FIGURA 10: PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO POR OLIGONUCLEOTÍDIO GTG(5) EM GEL DE AGAROSE 1% CORADO COM BROMETO DE ETÍDIO, 90V.....	34
FIGURA 11: CLASSIFICAÇÃO DOS MORFOTIPOS DE FUNGOS NAS 3 PARTES DA AMOSTRA (<i>LANGSDORFFIA</i> <i>HYPONGAEA</i> , SUA HOSPEDEIRA E RIZOSFERA CORRESPONDENTE).	35
FIGURA 12: MORFOTIPOS DE BACTÉRIAS CLASSIFICADAS ATRAVÉS DE MICROSCOPIA.	36
FIGURA 13: PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO POR OLIGONUCLEOTÍDIO BOX EM GEL DE AGAROSE 1% CORADO COM BROMETO DE ETÍDIO, 90V.....	37
FIGURA 14: DNA GENÔMICO DOS 81 ISOLADOS DE BACTÉRIAS, CORADOS COM BROMETO DE ETÍDIO, CORRIDOS EM GEL DE AGAROSE 1%, 90V.....	37
FIGURA 15: ALGUNS DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS BACTERIANAS, COM OS PRIMERS 27F E 1492R.....	38
FIGURA 16: REPRESENTATIVIDADE E DISTRIBUIÇÃO DOS GÊNEROS ENTRE <i>LANGSDORFFIA HYPONGAEA</i> , SUA HOSPEDEIRA E RIZOSFERA CORRESPONDENTE.....	42
FIGURA 17: RELAÇÃO ENTRE OS MICRORGANISMOS IDENTIFICADOS E SEUS RESPECTIVOS NICHOS.	43
FIGURA 18: ANÁLISE DO PERFIL DE DISTRIBUIÇÃO FILOGENÉTICO DOS ISOLADOS BACTERIANOS.	44
FIGURA 19: PERFIL DE CRESCIMENTO BACTERIANO EM MEIO SEM FONTE DE NITROGÊNIO.....	46
FIGURA 20: MEIO SELETIVO PARA DETERMINAÇÃO DE PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS PELOS ISOLADOS BACTERIANOS.	48
FIGURA 21: MEIO SELETIVO PARA DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO INORGÂNICO PELOS ISOLADOS BACTERIANOS.	49
FIGURA 22: RESULTADO QUALITATIVO DO POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE HCN PELOS ISOLADOS BACTERIANOS.	51
FIGURA 23: ESCALA COLORIMÉTRICAS BASEADA NOS RESULTADOS ENCONTRADOS	51
FIGURA 24: RESULTADO QUALITATIVO DO POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE AIA PELOS ISOLADOS BACTERIANOS.	52
FIGURA 25: ESCALA COLORIMÉTRICAS BASEADA NOS RESULTADOS ENCONTRADOS	52
FIGURA 26: TESTES ENZIMÁTICOS DE PRODUÇÃO DE AMILASE, CELULASE, PECTINASE E PROTEASE.....	53
FIGURA 27: REPRESENTATIVIDADE PERCENTUAL DOS ISOLADOS QUANTO AOS RESULTADOS DOS TESTES BIOQUÍMICOS.....	55
FIGURA 28: ANÁLISE DO PERFIL DE AÇÃO ANTIBIÓTICA DOS ISOLADOS CONTRA CINCO TIPOS DE BACTÉRIAS ALVO.....	56

FIGURA 29: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS RELAÇÕES ENTRE LANGSDORFFIA HYPONGAEA (HOLOPARASITA), SUA HOSPEDEIRA, RIZOSFERA E MICRORGANISMOS.....	58
---	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS COM BASE NO SEQUENCIAENTO PARCIAL DO GENE 16S RIBOSSOMAL.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA: Ácido indol acético
AlPO₄: Fosfato de alumínio
AN: Ágar nutriente
APA: Área de Proteção Ambiental
AS: Ágar Sabouraud
ATCC: American Type Culture Collection
ATP: Trifosfato de adenosina
ba: Coco-bacilo
bc: Bacilo fino
bg: Bacilo grande
BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*
BM: Microrganismos benéficos
bp: Bacilo pequeno
BPCPs: Bactérias promotoras do crescimento de plantas
c: Cocos
CaCl₂: Cloreto de cálcio
Ca₃(PO₄)₂: Fosfato de cálcio
CAS: Cromo azurol S
CM: Microrganismos comensais
Cr: Crômo
CTAB: Brometo de cetil trimetilamonio
DNA: Ácido desoxirribonucléico
DNAr: DNA ribossomal
dNTP: Desoxirribonucleotídeos fosfatados
e - Estreptobacilo
ea - Estreptobacilo arredondado
EBPR: Enhanced biological phosphorus removal
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
Fe: Ferro
FeCl₃.6H₂O: Cloreto de ferro hexahidratado
FePO₄: Fosfato de ferro

g/L: Grama por litro
g: Grama
h: Hora
H₂O: Água
HCl: Ácido clorídrico
HCN: Ácido cianídrico
HDTMA: Brometo hexadeciltrimetilamonio
Hg: Mercúrio
Hosp: Hospedeira
Host: Hospedeira
ITS: Internal transcribed spacer
K₂HPO₄: Fosfato de potássio bibásico
KH₂PO₄: Fosfato de potássio monobásico
Langs: *Langsdorffia hypongaea*
LB: Luria-Bertani
m: Metro
M: Molar
MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis
mg/L: Miligrama/litro
mg: Miligrama
MgCl₂: Cloreto de magnésio
MgSO₄.7H₂O: Sulfato de magnésio heptahidratado
min: Minuto
mL: Mililitro
mm: Milímetro
mM: Milimolar
mol/L: Mol por litro
N₂: Nitrogênio
Na₂HPO₄: Dihidrogenofosfato de sódio
NaCl: Cloreto de sódio
NaCO₃: Carbonato de sódio
NaMoO₄.H₂O: Molibdato de sódio di hidratado
NaOH: Hidróxido de sódio
NCBI: *National Center For Biotechnology Information.*

ng: Nanograma
NH⁴⁺: Íon amônio
nm: Nanômetro
°C: Graus Celsius
p.p.m: Partes por milhão
p/v: Peso por volume
Pb: Chumbo
PCR: Reação em cadeia da polimerase
PEG: Polietilenoglicol
pH: Potencial hidrogeniônico
Pi: Fósforo inorgânico
PM: Microrganismos patogênicos
pmol: Picomole
r.p.m.: Rotações por minuto
Rizo: Rizosfera
RPCP: Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas
s: Segundo
S: Sul
SDS: Sódio dodecil sulfato
TBE: Tris borato
Tris-HCl: Tris-hidroximetilaminometano
U: Unidades
V: Volts
w/w: Volume volume
W: Oeste
YIB: Yield increasing bactéria
YNB: Yeast Nitrogen Base
λ: Comprimento de onda
µg/mL: Micrograma/mililitro
µg: Micrograma
µl: Microlitro
(-): Negativo
(+): Positivo

RESUMO

Populações microbianas relacionam-se diretamente com diferentes nichos encontrados no ambiente. O solo é um importante ecossistema onde raízes de plantas e microrganismos contidos nele competem ou se associam pela aquisição de nutrientes. Baseado na relação de complementaridade entre microrganismos e planta, *Langsdorffia hypogaea* foi adotada como planta modelo, uma vez que se trata de uma espécie holoparasita pouco estudada e, por isso, caracteriza-se como um modelo potencial para a descoberta de novos microrganismos de interesse biológico e biotecnológico. O estudo teve como objetivo central bioprospectar a microbiota desse modelo e suas possíveis interações com sua planta hospedeira e rizosfera correspondente. Para isso, foram utilizadas inicialmente técnicas microbiológicas de cultivo e isolamento, seguidas de técnicas moleculares de identificação dos isolados. Também foram realizadas técnicas bioquímicas que permitiram verificar a capacidade destas 81 bactérias isoladas em produzir íon amônio, ácido cianídrico, ácido-indolacético, sideróforos e capacidade de fixação de nitrogênio e solubilização de fosfato. Testes para verificação do potencial de degradação de amido, pectina, proteínas e celulose também foram incorporadas nas análises. Com exceção da solubilização de fosfato e do potencial de degradação de proteínas e celulase, todos os outros parâmetros apresentaram resultados positivos para alguns dos isolados. Foram encontradas bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Enterobacter*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Ewingella*, *Citrobacter*, *Pseudomonas*, *Viridibacillus*, da ordem *Actinomycetale* e da família *Enterobacteriaceae*, além de bactérias similares a depositadas no banco de dados como “não cultivadas” e uma bactéria que não apresentou similaridade com nenhuma já depositada no banco de dados (possivelmente nova). Tais resultados auxiliam no melhor entendimento da interação entre microrganismos e plantas, que poderiam justificar em parte a sobrevivência destas espécies em ambiente com diversas peculiaridades. Finalmente, por estas análises, possíveis bactérias classificadas como potenciais promotores de crescimento parecem ser fundamentais para a manutenção das espécies vegetais. Isto abre um leque de possibilidades de seus usos, em especial como fator substituinte de agroquímicos.

Palavras-chave: *Langsdorffia hypogaea*, bioprospecção, microrganismo, potencial biotecnológico, crescimento vegetal.

ABSTRACT

Microbial populations are related directly to different niches found in the environment. Soil is an important ecosystem where plant roots and microorganisms contained therein or associated compete for the acquisition of nutrients. Based on the complementary relationship between microorganisms and plant, *Langsdorffia hypogaea* was adopted as a model plant, since it is a holoparasitic species little studied, and therefore characterized a potential model for the discovery of new biologically and biotechnology relevant microorganisms. The study aimed to central bioprospect the microbiota of this model and its possible interactions with its host plant and corresponding rhizosphere. For this, microbiological techniques were used initially growing and isolation, followed by molecular techniques for the identification of isolates. Were also performed biochemical techniques that allow to verify the ability of these 81 isolates to produce ammonium ion, hydrocyanic acid, indole acetic acid, siderophores, and the ability to fix nitrogen and phosphate solubilization. Tests to verify the potential for degradation of starch, pectin, cellulose and proteins were also incorporated in the analyzes. With the exception of phosphate solubilization and degradation potential of cellulase and proteins, all other parameters showed positive results for some of the isolates. We have found bacteria of genus *Bacillus*, *Enterobacter*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Ewingella*, *Citrobacter*, *Pseudomonas*, *Viridibacillus*, the order Actinomycetales, the family Enterobacteriaceae, similar bacteria deposited in the database as "uncultivated" and bacteria which did not show any similarity with already deposited in database (possibly new). These results help to better understand the interaction between microorganisms and plants, which could partly explain the survival of these species in an environment with several peculiarities. Finally, for these analyzes, possible bacteria classified as potential growth promoters seem to be fundamental to the maintenance of plant species. This opens a range of possibilities for its uses, especially as a substituent factor of agrochemicals.

Key words: *Langsdorffia hypogaea*, bioprospection, microorganism, biotechnological potential, plant growth.

INTRODUÇÃO

1-Diversidade de microrganismos associados a plantas

Os microrganismos são considerados componentes fundamentais de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos. Isto se deve à imensa diversidade genética e sua capacidade de desempenhar funções únicas e cruciais na manutenção de ecossistemas (MYERS, 1996). Entretanto, a diversidade de microrganismos conhecidos representa apenas uma pequena fração da diversidade microbiana encontrada na natureza (AZEVEDO, 1998). Estudos comparativos apontam para um valor entre 0,1% e 1%, dependendo do habitat, de microrganismos cultivados por meio do emprego de métodos microbiológicos convencionais (AMANN *et al.*, 1995). Essa dificuldade de cultivo está ligada principalmente ao pouco conhecimento sobre seus requisitos nutricionais e a biologia de organismos presentes em diferentes amostras ambientais.

Nesse contexto, o habitat associado à planta é um ambiente dinâmico, no qual muitos fatores, tais como mudanças sazonais, tecidos vegetais, diferentes cultivares ou espécies de plantas, tipos de solo e interação com outros microrganismos benéficos ou patogênicos, podem afetar a estrutura e composição de espécies das comunidades de microrganismos que colonizam os tecidos das plantas (FIGUEIREDO, M. V. B. *et al.*, 2010).

Ao longo da evolução as plantas vêm desenvolvendo mecanismos adaptativos, muitos dos quais estão relacionados às interações com microrganismos (PEIXOTO NETO; AZEVEDO; CAETANO, 2004). As plantas compreendem um micro-ecossistema complexo, composto por diferentes nichos que podem ser colonizados simultaneamente por uma grande diversidade de microrganismos endofíticos, epifíticos e patógenos (LODEWYCKX *et al.*, 2002). Essas populações microbianas são essenciais para o desenvolvimento das plantas, uma vez que facilitam a absorção de nutrientes, ao mesmo tempo em que protegem a planta contra a ação de fitopatógenos (FIGUEIREDO, M. V. B. *et al.*, 2010).

De modo geral, as plantas possuem uma microbiota característica, importante para a sanidade e manutenção de sua sobrevivência (AZEVEDO,1998). Essa

complementariedade entre nichos é a responsável pelo aumento da eficiência e estabilidade dos processos ecossistêmicos em condições de maior diversidade (TILMAN, D. 1996). A co-dependência entre a diversidade de plantas e microrganismos é majoritariamente decorrente da complementariedade de características das diferentes espécies de plantas e microrganismos (GONÇALVES, A. Z. E DINIZ, S, 2008). Logo, a associação entre plantas e microrganismos é complexa e provavelmente ocorre variação de hospedeiro para hospedeiro e de microrganismo para microrganismo (HASEGAWA *et al.*, 2006).

2-Interações entre plantas e microrganismos

Os microrganismos endofíticos são representados por fungos e bactérias que habitam o interior das plantas sem causar nenhum dano aparente às mesmas. Tal característica os diferencia dos microrganismos fitopatógenos, prejudiciais às plantas, e dos epifíticos que vivem na superfície dos órgãos e tecidos vegetais (Figura 1) (AZEVEDO, 1998).

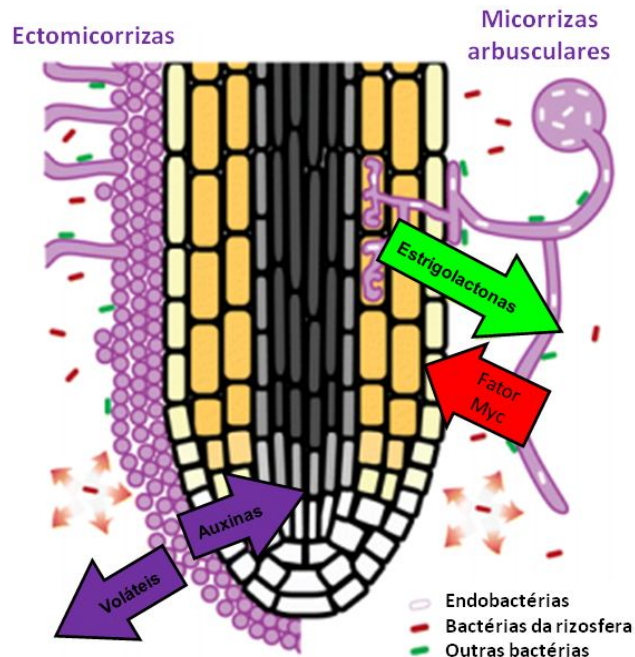


Figura 1: Representação das associações endofíticas, patógenas e epifíticas.

Adaptado de BONFANTE P, BONFANTE P, ANCA IA. Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions. *Annu Rev Microbiol.* 2009; 63:363-83

Em geral, os microrganismos endofíticos adentram as plantas por aberturas naturais como emergências de raízes laterais, estômatos, lenticelas e hidatódios, ou através de ferimentos como as aberturas causadas por insetos, e até por estruturas de fungos patogênicos. O próprio crescimento das raízes, ao penetrar no solo, gera abrasões que facilitam a entrada de microrganismos. (AZEVEDO, 1998).

Bactérias e fungos endofíticos desempenham funções importantes no processo de adaptação da planta ao meio através de interações simbiótica com o hospedeiro. Essas interações podem variar desde a produção de compostos que diminuem a herbivoria sobre os tecidos vegetais ou que lhes conferem resistência a fitopatógenos, até a produção de fitoreguladores que podem aumentar o desenvolvimento vegetal, entre outros. Nessa relação de troca, os endófitos encontram na planta, como contrapartida, um habitat com nutrientes e com menor competição com outros microrganismos (PEIXOTO NETO; AZEVEDO; CAETANO, 2004).

Os microrganismos do solo também interagem com as plantas e essa interação se dá na região da rizosfera. Essa região corresponde à camada fina de solo aderente a raiz, sendo sujeita à influência de exsudatos vegetais que, conseqüentemente, interferem na atividade microbiana no solo (CURL, 1982). Ela representa uma frente altamente dinâmica de interações entre raízes, microrganismos patogênicos e benéficos do solo, invertebrados e do sistema radicular das plantas competidoras (HIRSCH *et. al* 2003). A sinalização química entre raízes de plantas e outros organismos do solo, incluindo as raízes de plantas vizinhas podem provocar respostas diferentes Componentes químicos de exsudatos de raízes podem dissuadir um organismo, ao mesmo tempo atrair outro. Finalmente, dois ou mais organismos distintos podem ser atraídos com diferentes conseqüências (fatores de sinalização) para a planta (HARSH,P. B *et. al* 2006).

3-Microrganismos que interagem com plantas e o controle de fitopatogenias

Um conjunto diversificado de bactérias já foi identificado com atividade de controle biológico (GNANIMANICAKAM, S, 2007), sendo mais de duas dezenas de gêneros referidas como possuindo atividade de controle biológico e promoção de crescimento de plantas (RODRIGUES *et al.*, 2008). O mecanismo de ação dos agentes biocontroladores na rizosfera se dá principalmente por antibiose, que envolve a

produção de metabólitos secundários e impede que os patógenos colonizem a rizosfera e estabeleçam a doença (DOUMBOU *et al.*, 2001). Os microrganismos endofíticos de crescimento rápido também têm grande potencial de inibir por competição ou anabiose o desenvolvimento de fitopatógenos. Como exemplo, *Fusarium oxysporum* em tomate pode ser controlado por *F. oxysporum* avirulento, que coloniza endofiticamente o hospedeiro (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007).

Silva *et al.* (2008) selecionaram bactérias endofíticas de folhas e haste de tomateiro e pimentão para controlar uma doença causada por *Pseudomonas syringae*, a pinta bacteriana; as espécies bacterianas mais eficazes na redução da severidade da pinta bacteriana foram *Acinetobacter johnsonii*, *Bacillus pumilus*, *Paenibacillus macerans*, *Bacillus sphaericus*, *B. amyloliquefaciens* e *Staphylococcus aureus*. Mais de 50% dos isolados eficazes na redução da severidade foram da espécie *Bacillus pumilus* (SILVA *et al.*, 2008). No trabalho de Barretti *et al.* (2009), quarenta isolados bacterianos endofíticos de plantas sadias de tomateiro foram avaliados quanto à sua potencialidade como agentes de biocontrole de enfermidades bacterianas e fúngicas do tomate. Os dois patógenos alvos foram *Pseudomonas syringae* e *Alternaria solani*, e com base na média do número de lesões por planta, quatro isolados foram selecionados como potenciais agentes de biocontrole, identificados como *Acinetobacter johnsonii*, *Serratia marcescens*, *Sinorhizobium sp.* e *Bacillus megaterium* (BARRETTI *et al.*, 2009).

Interessantemente, isolados de uma planta específica podem exibir atividade de biocontrole não só sobre as culturas a partir dos quais foram obtidos, mas também em outras culturas (GNANIMANICAKAM, S, 2002). Logo, se introduzidos em período e número suficiente e ativo, uma única população bacteriana pode ter um impacto significativo sobre a saúde de diversas outras plantas. Tais estirpes não atuam sozinhas, existindo uma diversidade de outras bactérias que podem contribuir ou atuar antagonicamente sobre a atividade de biocontrole. Por exemplo, algumas *Pseudomonas* usadas como biocontrole foram encontradas coexistindo, e suprimindo a atividade de importantes fitopatógenos (WELLER, D. M. *et al.*, 2002)

Na verdade, muitas bactérias diferentes e diversos metabólitos bacterianos foram identificados como importantes contribuintes para o controle biológico de doenças de plantas. No entanto, ainda não se tem uma compreensão clara de como as populações e

atividades dos microrganismos que colonizam cada planta estão conectados e integrados em ambientes naturais e agrícolas (KIM *et al.*, 2011).

A utilização de agroquímicos acompanha o crescimento da agricultura. Tal prática tem causado inúmeros efeitos negativos, como impactos ambientais e resistência a patógenos (GERHARDSON, 2002). Em decorrência dos problemas relacionados ao uso de agroquímicos, métodos alternativos têm ganhado atenção, e o controle biológico tem sido considerado uma solução viável para várias doenças de difícil controle (ALVES; MOINO; ALMEIDA, 1998). Esta prática visa manter um equilíbrio no agroecossistema, de modo que o hospedeiro, na presença do patógeno ou praga, não sofra danos significativos, como resultado da ação controladora exercida pelos organismos não patogênicos (GRIGOLETTI JUNIOR; SANTOS; AUER, 2000).

Essa ação controladora pode ocorrer através de diversos mecanismos, tais como a produção de ácido cianídrico, bacteriocinas e antibióticos, competição por espaço, Fe^{3+} e outros nutrientes, parasitismo, indução de resistência na planta e proteção cruzada (MARIANO *et al.*, 2004).

Ácido cianídrico

A produção de ácido cianídrico (HCN) volátil desencadeia uma possível ação antagonista a patógenos (NEHI *et al.*, 1996). Insetos ou outros herbívoros, ao entrarem em contato com o tecido vegetal durante ação de herbivoria, fazem com que glicosídeos cianogênicos entrem em contato com enzimas hidrolíticas do citossol das células, permitindo que as mesmas produzam ácido cianídrico. Fisiologicamente, o HCN inibe a cadeia respiratória ao se ligar com o Fe^{3+} da citocromo-oxidase na mitocôndria. Uma pesquisa mostrou que um isolado com alta produção de HCN, mutante construído a partir de *Pseudomonas putida* BK8661, apresentou aumento significativo na supressão de sintomas causados por *Septoria tritici* e *Puccinia recôndita* f. sp. *tritici* em trigo em condições axênicas (NEHI *et al.*, 1996). CATTELAN (1998) detectou compostos voláteis produzidos por isolados de rizobactérias responsáveis pela inibição *in vitro* do crescimento dos fungos fitopatógenos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum* e *Clerotium rolfii*.

Antibióticos

Os antibióticos são substâncias produzidas por um microrganismo que apresentam efeito adverso e de ação tóxica em outro organismo (DAVIES, 1990). Os antibióticos apresentam perfis químicos estruturais diversificados, podendo inclusive ser de origem peptídica. O produtor de um peptídeo com ação antibiótica deve ter, além da habilidade de sintetizá-lo, a capacidade de exportá-lo para fora da célula, permitindo, ao mesmo tempo, que se proteja da ação de seu próprio antibiótico, mediante síntese de enzimas especializadas (KOLTER; MORENO, 1992). Há relatos de que o solo é rico em microrganismos capazes de sintetizar antibióticos, mas a frequência com que a síntese ocorre de forma ecologicamente significativos na natureza não é conhecida (FEDRIZZI, 2006). Sabe-se, no entanto, que esses antibióticos podem contribuir para a competitividade microbiana e a supressão dos patógenos de raízes de plantas. Assim, as bactérias produtoras são consideradas de interesse para fins práticos de controle de doenças de plantas (THOMASHOW *et al.*, 1990). *Paenibacillus* sp. isolados de nódulos de soja já foram descritos como produtores de um antibiótico que inibe o crescimento de *Rhizoctinia bataticola* (SENTHIKUMAR *et al.*, 2007).

Sideróforos

Para o crescimento bacteriano ótimo é necessária a presença de ferro. Tal elemento é requerido pelos microrganismos aeróbicos para redução do oxigênio na síntese de ATP, redução de precursores de DNA, formação do grupo heme e outras finalidades (NEILANDS, 1995). Para as plantas, o ferro faz parte da enzima nitrogenase, responsável pela conversão de nitrogênio em amônio, da leghemoglobinas, que controla a quantidade de oxigênio dentro dos nódulos contendo a bactéria e dos citocromos, que são carreadores de elétrons no processo da respiração celular do bacteróide (LUCA *et al.*, 1988).

Os microrganismos do solo geralmente competem por nutrientes, que muitas vezes estão disponíveis em baixa concentração ou apresentam-se pouco solúveis em ambientes naturais. Os sideróforos são compostos secundários produzidos por algumas espécies de microrganismos, cuja função principal é complexar metais, em especial ferro em estado insolúvel, do ambiente externo, permitindo seu transporte à célula. Vale ressaltar que é muito difícil encontrar Fe solúvel (Fe^{2+}) no ambiente, sendo mais comum

sua forma de oxidada Fe^{3+} . Uma vez que estes sideróforos são então secretados para complexar esta fonte de ferro mais abundante, receptores especializados permitem que ocorra a ligação e o transporte do complexo sideróforo-Fe (agora no estado Fe^{2+}) para o interior da célula, com o intuito de que este íon possa ser aproveitado no metabolismo celular. Dessa forma, a afinidade substanciada dos sideróforos por Fe^{3+} , produzidos por um organismo específico, pode reduzir a disponibilidade deste íon para outro microrganismo (Figura 2) (NEILANDS, 1984). Muitos microrganismos conhecidos podem sintetizar sideróforos, como bactérias entéricas, bactérias patogênicas de humanos, de animais, de fungos e de plantas, microrganismos do solo, bactérias fixadoras de nitrogênio, algumas leveduras, dentre outros (BENITE *et al.*, 2002).

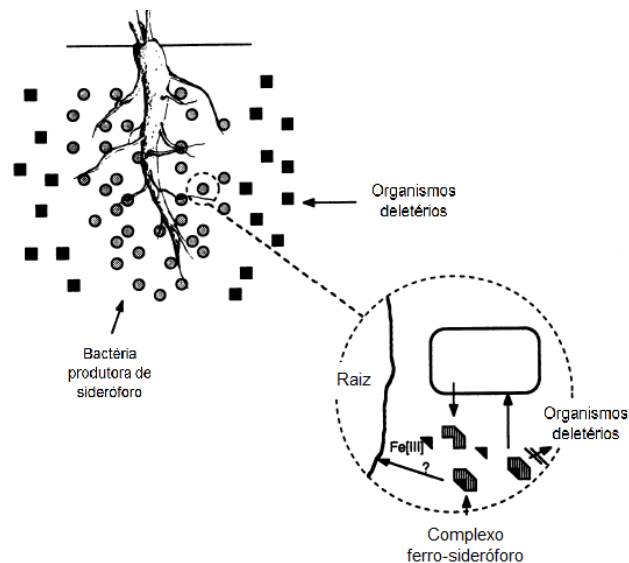


Figura 2: Produção de sideróforos por bactérias e supressão de organismos fitopatógenos por diminuição da disponibilidade de Fe do meio.

Adaptado de O'SULLIVAN, D. J.; O'GARA, F. Traits of Fluorescent *Pseudomonas* spp. Involved in Suppression of Plant Root Pathogens. *Microbiological Reviews*, Dezembro, 1992.P. 662-676.

4-Bactérias promotoras de crescimento de plantas

Existe atualmente uma emergente demanda para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável, a fim de diminuir a dependência de fertilizantes químicos e suas prejudiciais consequências ao meio ambiente (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A utilização de bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCPs), para o aumento da produção agrícola, será provavelmente uma das estratégias mais importantes para a atualidade no mundo (FIGUEIREDO, M. V. B. *et al.*, 2010).

Rizobactérias são as bactérias que crescem próximas às raízes, sendo estimuladas pelos exsudatos radiculares e algumas delas têm capacidade de promover o crescimento vegetal, daí a denominação RPCP (rizobactérias promotoras do crescimento de plantas). As RPCP estimulam o crescimento vegetal por possuírem capacidade de solubilizar fosfatos minerais e outros nutrientes do solo, produzir ou aumentar a produção de hormônios vegetais como auxinas (em especial ácido indol acético - AIA), citocinas e giberelinas ou fixar nitrogênio associativamente. Algumas delas também controlam o número e/ou desenvolvimento de organismos fitopatogênicos na planta, provenientes do solo ou de sementes previamente contaminadas, especialmente fungos (CATTELAN, A. J. 1999).

Sob esta perspectiva, a inoculação de bactérias em cultivares específicos, ou no solo onde estas plantas serão cultivadas, tem sido amplamente utilizada na tentativa de promover o aumento na produção em diversos países. Por exemplo, em Cuba, muitos biofertilizantes são produzidos e comercializados para aplicação em diferentes culturas, a maioria utilizando as isolados de *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Azospirillum* e *Burkholderia* (RODRÍGUES, H.; FRAGA, R.,1999). Na China, BPCPs vem sendo aplicadas extensivamente no campo, chegando a induzir aumentos médios de 21% em produtividade (FIGUEIREDO, M. V. B. *et al.*, 2010).

Fixação de Nitrogênio

O nitrogênio (N_2) é pouco reativo e não pode ser metabolizado diretamente pelas plantas. Como se trata de um elemento essencial ao desenvolvimento e metabolismo, as plantas dependem intimamente das bactérias denominadas diazotróficas para transformarem o N_2 em íon amônio (NH_4^+), fazendo uso do complexo enzimático nitrogenase. Este íon amônio é posteriormente assimilado e convertido em aminoácidos e proteínas, ou mesmo servindo de base para a síntese de outras moléculas orgânicas fundamentais, como é o caso dos anéis pirrolínicos da clorofila.

Ao disponibilizarem o nitrogênio para as plantas, as bactérias também fornecem exudados ricos em carbono o que torna o solo mais favorável ao desenvolvimento das mesmas. O que justifica ainda mais a importância destas bactérias na manutenção do crescimento vegetal.

A relação simbiótica mais conhecida de fixação biológica de nitrogênio se dá entre leguminosas e *Bradyrhizobium*. (NEVES; RUMJANEK, 1998).

Íon amônio

O íon amônio desempenha um papel fundamental no metabolismo de nitrogênio da maioria das células. Para muitos organismos, especialmente bactérias e micróbios eucariotos, o amônio é a fonte de nitrogênio preferencial e, embora frequentemente os organismos possam adquirir uma grande variedade de outras fontes de nitrogênio, a maioria destas é transformada em amônio, antes de serem utilizados em vias biossintéticas. Nos microrganismos, essa importância também está relacionada à quimio-atração, uma vez que muitas bactérias e fungos possuem em sua estrutura sensores de amônio que indicam a direção de atração. Para as plantas, o amônio não é apenas a principal fonte de nitrogênio para crescimento e desenvolvimento, mas é também uma importante forma de recuperação de nitrogênio pelas folhas (WIRÉN, N. V. e MERRICK, M., 2004). Existe um equilíbrio químico entre amônia (NH_3) e amônio (NH_4^+) que é deslocado dependendo do pH do meio. Em ambientes ácidos, o íon amônio prevalece.

Fosfato

O fósforo é essencial a qualquer organismo por ser o principal elemento de moléculas vitais como os nucleotídeos e adenilatos (AMP, ADP, ATP) (FORNASIERI FILHO, 1992).

Para as plantas é considerado um elemento fundamental ao crescimento, correspondendo a 0,2% do peso seco destes seres vivos. Entretanto, é um dos elementos mais difíceis de serem adquiridos do meio. Ele pode estar presente nos solos em grandes concentrações, mas a maior parte tem baixa solubilidade, como é o caso do fosfato de ferro (FePO_4), de alumínio (AlPO_4) e de cálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), logo, não é disponibilizado para a absorção direta das plantas (SMITH *et al.*, 2011).

Alguns microrganismos apresentam a capacidade de solubilizar estes compostos insolúveis, liberando como produto final fosfato solúvel às plantas. É o caso de

bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Flavobacterium* e *Erwinia* (RODRÍGUES E FRAGA, 1999). Elas participam do ciclo do fosfato, facilitando a conversão das formas insolúveis para solúveis por meio de ácidos orgânicos e fosfatases.

Ácido Indol Acético (AIA)

Alguns microrganismos podem produzir metabólitos secundários e hormônios que afetam diretamente o crescimento das plantas (BRAZELTON, J., E., 2008.). Hormônios vegetais permitem governar o crescimento da planta através do controle espacial e temporal sobre o alongamento, divisão e diferenciação celular. Também desempenham um papel chave na resposta da planta aos estresses bióticos e abióticos. Dada a capacidade de contribuir para o hormônio do seu hospedeiro, planta-microrganismos associados têm o potencial de manipular a fisiologia vegetal e conduzi-la em direção a resultados que favoreçam a sua própria sobrevivência. (KIM et al., 2011). Provavelmente, a mais conhecida atividade de hormônio relacionada entre planta associada microrganismos envolve a produção AIA (COSTACURTA, A., AND J. VANDERLEYDEN, 1995). Alguns são agentes patogênicos de plantas e outros são benéficos, no entanto, para muitos nenhum efeito sobre a saúde de plantas tem sido demonstrada. Os genes microbianos subjacentes à produção AIA estão bem caracterizados, assim como as vias biossintéticas diferentes (SPAEPEN, S., J. VANDERLEYDEN, AND R. REMANS. 2007).

Uma síntese da promoção de crescimento vegetal direta (fornecendo elementos essenciais) e indireta (promovendo o controle de fitopatógenos) por microrganismos pode ser representada pela Figura 3.

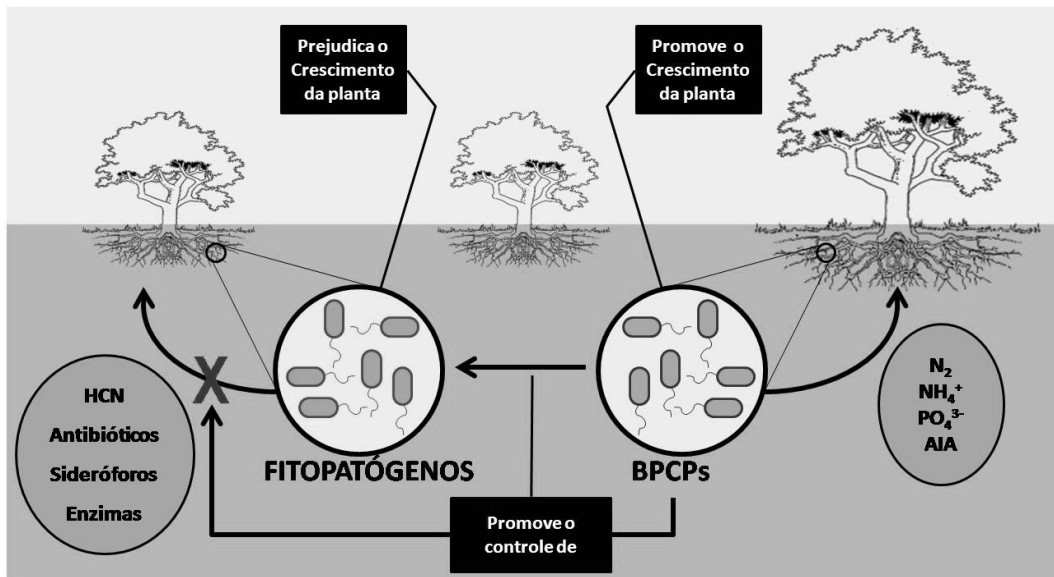


Figura 3: Relação entre a taxa de crescimento e a manutenção da saúde vegetal com base no perfil ecológico da microbiota.

Os microrganismos fitopatógenos prejudicam a planta, que em resposta, entra em estresse oxidativo. Bactérias podem inibir a ação destes fitopatógenos através da produção de ácido cianídrico (HCN), antibióticos, sideróforos e enzimas que degradam a estrutura do patógeno. As bactérias também podem promover o crescimento direto da planta fornecendo elementos essenciais para seu crescimento como nitrogênio (N_2), íon amônio (NH_4^+), fosfato e ácido indol acético (AIA).

5-Produção de compostos de interesse econômico/científico por microrganismos associados a plantas

Enzimas

Além do potencial biotecnológico de promoção de crescimento vegetal e inibição de fitopatógenos, os microrganismos ganham destaque na indústria quando capazes de produzir enzimas com diferentes aplicabilidades nesse setor. Enzimas produzidas por microrganismos são preferidas, do ponto de vista científico e comercial, por apresentarem rápido crescimento, espaço limitado de cultivo e fácil manipulação genética. Amilases, pectinases, celulasas e proteases são algumas das enzimas produzidas por microrganismos do solo e associados a plantas que têm sido muito utilizadas na indústria.

As amilases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas do amido, glicogênio e outros carboidratos. Estão entre as classes mais importantes das enzimas e são de grande interesse na biotecnologia atual, devido à sua ampla aplicação

em vários campos, incluindo a química clínica, produção de medicamentos, indústria têxtil (onde elas degradam as gomas e proporcionam maior resistência ao tear), produção de papel, indústria de alimentos, liquefação do amido, produção de açúcar, aditivos em detergentes e sacarificação do amido (PANDEY, A. *et al.*, 2000).

As pectinases são enzimas que degradam substâncias pécnicas e hidrolizam ligações glicosídicas ao longo da cadeia carbônica. São utilizadas nas indústrias de sucos, que têm o propósito de reduzir a sua viscosidade para melhorar a qualidade do suco e podem reduzir o sabor amargo de cascas de citros, preservando o aroma que é perdido durante a secagem. Possuem também a capacidade de aumentar a quantidade de agentes antioxidantes do óleo de oliva, o que provoca a diminuição de seu ranço, além de serem utilizadas nas indústrias de fermentação de chá, café e cacau (UENOJO *et al.*, 2007).

As celulasas são enzimas especializadas em degradar ligações glicosídicas β 1,4, diferentemente das amilases que quebram ligações α 1,4 ou α 1,6. Microrganismos que excretam celulasas desempenham um importante papel na natureza devido a sua capacidade de decompor resíduos celulósicos, estabelecendo um elo chave no ciclo do carbono (RUEGGER E TAUKE-TORNISIELO, 2004). Num ecossistema típico de decomposição de celulose, uma variedade de bactérias e fungos celulolíticos atuam conjuntamente para converter substratos celulósicos insolúveis em açúcares solúveis, basicamente celobiose e glicose, que são assimilados pelas células para seu metabolismo energético (BAYER *et al.*, 1998).

A celulose constitui uma importante fonte renovável de carbono, o que reforça a importância do uso de processos de fermentações celulolíticas e aumenta o interesse em aprimorar a digestibilidade de materiais ligno-celulósicos e em estudos envolvendo a hidrólise da celulose. O interesse no uso industrial de celulasas tem crescido muito. Sua aplicação na conversão de biomassa celulolíticas em açúcares para a fermentação de etanol e outros produtos pode prover grandes benefícios ambientais e econômicos. O desafio chave é transformar essa conversão num processo mais rápido e menos custoso (HIMMEL *et al.*, 1999). As celulasas possuem uma grande área de aplicação, como na indústria de alimentos, cervejas e vinhos, alimentação de animais, têxtil, polpa e papel, assim como na agricultura e em pesquisas (BHAT, 2000).

Proteases são enzimas especializadas em promover a clivagem de proteínas ou peptídeos, podendo essa clivagem ocorrer em sítios específicos da cadeia, na presença de alguns resíduos em especial, ou genericamente, uma vez em contato com as ligações peptídicas. Quanto ao sítio de localização, classificam-se em proteases intracelulares relacionadas ou extracelulares. Em geral, proteases extracelulares catalisam a hidrólise de grandes proteínas a moléculas menores para a subsequente absorção pela célula, enquanto as proteases intracelulares desempenham um importante papel na regulação do metabolismo (TREMACOLDI, C. R., 2009).

Dentre as bactérias conhecidas, as do gênero *Bacillus* são as mais estudadas quanto à produção de proteases, especialmente a subtilisina de *B. subtilis*. (RAWLINGS; BARRETT, 1993). Os fungos são, de maneira geral, capazes de produzir a maior variedade de proteases entre os microrganismos. Já os fitopatógenos produzem proteases extracelulares ativas que, em conjunto com outras enzimas como poligalacturonases, pectoliasas e xilanases, exercem um importante papel na patogênese (VALUEVA; MOSOLOV, 2004). Por outro lado, é interessante o fato de que alguns microrganismos benéficos às plantas produzem proteases que combatem os microrganismos fitopatógenos, tornando-se ecologicamente fundamentais ao desenvolvimento saudável das mesmas.

Como potencial biotecnológico, as proteases representam 60 % do total de enzimas produzidas pela indústria mundial, nas áreas de alimentação e de detergentes (GODFREY; WEST, 1996). As enzimas são proteínas biodegradáveis que tornam os processos de produções industriais mais eficientes e menos dispendiosos, podendo proporcionar obtenção de produtos de melhor qualidade. Logo, a detecção de novos microrganismos produtores de enzimas se torna uma importante fonte de desenvolvimento biotecnológico.

Compostos secundários

Nos últimos 50 anos, vários metabólitos secundários produzidos por microrganismos vêm sendo utilizados na medicina e indústria como antibióticos, antitumorais, antifúngicos e antiparasitários. Os microrganismos do solo têm sido uma fonte de pesquisa para produção de compostos bioativos (XU, 2006). Eles são

responsáveis pela degradação de diferentes elementos da matéria orgânica e, nesse processo, ocorrem transformações em uma variedade de biomoléculas e vários metabólitos secundários são liberados via degradação microbiológica realizada por várias enzimas (DUBEY *et al.*, 2006).

Os metabólitos secundários estão sendo obtidos graças a décadas de extensiva pesquisa envolvendo microrganismos. Esses compostos representam em gama enorme de estruturas complexas e com potenciais atividades biológicas. Diferentes isolados geralmente produzem diferentes compostos e, desta foram, novos metabólitos bioativos vem sendo identificados. Esta habilidade de produzir um grande número de metabólitos secundários quimicamente diferentes está geralmente associada a actinobactérias, mixobactérias, pseudomonades, cianobactérias e fungos filamentosos (DONADIO *et al.*, 2002).

6- Modelo de estudo

A espécie *Landsdorffia hypogaea* foi adotada como modelo de estudo, uma vez que se trata de uma espécie pouco conhecida e com modo de vida característico, sendo desta forma, uma fonte potencial de novas descobertas. *Landsdorffia hypogaea* pertence à família Balanophoraceae, a qual apresenta distribuição pantropical, incluindo 17 gêneros e cerca de 50 espécies. No Brasil foram registrados seis gêneros e cerca de 12 espécies. (LORENZI, 2005). Esta planta, assim como as demais da família, é uma erva carnosa, aclorofilada e holoparasita de raízes, geralmente de árvores. Sua semente germina em contato com a raiz de outras plantas, destrói a casca e forma uma túbera, confundindo o tecido de ambas (HSIAO, 1994). Sua morfologia floral não é clara e há poucos exemplares disponíveis em herbários. Os estudos envolvendo *Langsdorffia hypogaea* são escassos, uma vez que se encontram no interior de formações florestais e são perceptíveis apenas durante o período reprodutivo ou mesmo são confundidas com fungos; daí a importância de estudos mais detalhados acerca da biologia não só desta planta como também de suas interações (Figura 4).

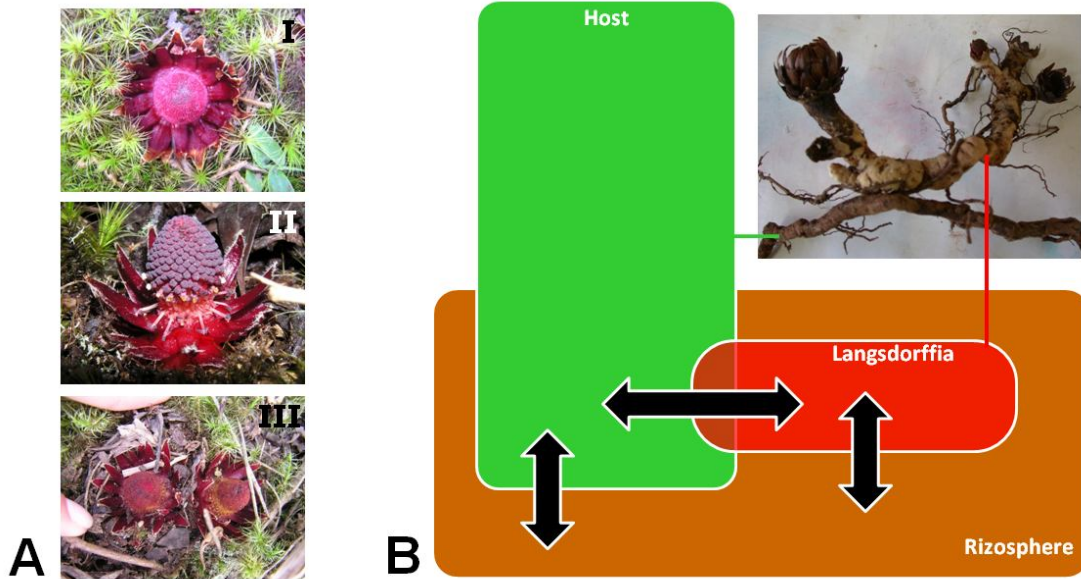


Figura 4: Características morfológicas e de interação de *Langsdorffia hypogaea*.

A.I-inflorescência feminina de *Langsdorffia hypogaea*; A.II-inflorescência masculina de *Langsdorffia hypogaea*; A.III- inflorescência feminina de *Langsdorffia hypogaea* sob serra pilheira. B-Interação entre *Langsdorffia hypogaea* (holoparasita), sua hospedeira e rizosfera correspondente. Fotos cedidas por Luana Freitas.

7- Importância do estudo

Os fertilizantes e defensivos químicos contribuíram nas últimas décadas para o aumento da produção de alimentos no mundo todo. Porém, o uso exagerado e inadequado desses produtos pode causar vários problemas à saúde e ao meio ambiente. O solo e os lençóis de água podem ser atingidos diretamente por esses produtos se usados de forma inadequada (SOTTERO, A. N. 2003). A alta exigência energética para a produção dos fertilizantes e o impacto ambiental provocado pela lixiviação desses produtos, torna-se importante buscar novas alternativas mais sustentáveis e produtivas para o aumento da produção vegetal de interesse. Portanto, os microrganismos promotores e mantenedores de espécies vegetais constituem uma alternativa para um desenvolvimento agrícola sustentável e mais produtivo.

Por exemplo, alguns microrganismos têm a capacidade de solubilizar fosfatos minerais ou outros nutrientes do solo e produzem ou aumentam a concentração de hormônios vegetais como ácido indol acético, ácido giberélico, citocininas e etileno ou fixam nitrogênio associativamente. Outros desses microrganismos controlam

organismos fitopatogênicos provenientes do solo ou das sementes através da produção de sideróforos, 1,3-glucanase, quitinases, ácido cianídrico e antimicrobianos. Desta forma, o crescimento vegetal é aumentado e a produção agrícola pode ser influenciada pelos microrganismos (RAMAMOORTHY *et al.*, 2001).

Apesar da necessidade de busca por microrganismos potenciais, a diversidade e estruturação de comunidades microbianas ainda são pouco conhecidas dentre os ecossistemas. Mais limitados são os conhecimentos a respeito de *Landsdorffia hypogaea*. Neste âmbito, as informações geradas por este trabalho possibilitarão melhor compreensão acerca de como as interações com microrganismos afetam a estrutura da comunidade de plantas e os processos ecossistêmicos, bem como relevante contribuição para o melhor conhecimento desta planta, fornecendo subsídio para pesquisas posteriores.

Além das gerações de conhecimento sobre *Landsdorffia hypogaea*, de microbiologia ecológica e filogenia de microrganismos, promoção de crescimento vegetal e produção de metabólitos ativos, novos estudos de interesse biotecnológico podem suceder com a identificação de novas espécies, tendo como base que microrganismos endofíticos podem ser utilizados como vetores para a introdução de características de interesse biotecnológico na planta. Logo é de fundamental importância um esforço concentrado na busca de microrganismos de valor biotecnológico, econômico e acadêmico.

Com isso, a ideia principal do presente estudo é caracterizar a microbiota inerente a um modelo negligenciado, *Langsdorffia hypogaea*, e buscar aplicação agrônômica e biotecnológica para os microrganismos encontrados.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Analisar a possível existência de uma microbiota específica ao modelo de interação *Langsdorffia hypogaea* - Hospedeira - Rizosfera e se esses microrganismos apresentam algum potencial biotecnológico voltado para a indução no crescimento de plantas, uso industrial e/ou de interesse médico.

Objetivos específicos:

- Isolar fungos e bactérias presentes em *Langsdorffia hypogaea*, sua hospedeira e rizosfera correspondente.
- Caracterizar morfolologicamente e molecularmente estes isolados.
- Analisar a relação filogenética dos isolados.
- Testar a capacidade das bactérias em fixar nitrogênio, solubilizar fosfato e produzir: amônia, ácido cianídrico, sideróforos, AIA, amilase, celulase, pectinase e protease;
- Testar possível atividade antimicrobiana dos isolados bacterianos.

METODOLOGIA

3.1-Área de estudo

As coletas foram realizadas na Serra da Brígida (ponto central: 20°21'35''S, 43°30'11''W). Essa área faz parte do Parque Natural Municipal das Andorinhas e fica na porção sul da APA (Área de Proteção Ambiental) Cachoeira das Andorinhas, Ouro Preto (Figura 5). TERRÔLA (2011) classificou essa região como “enclave edáfico de Floresta Estacional Semidecidual Altimontana”. A classificação da vegetação foi baseada em OLIVEIRA-FILHO & FONTES (2000), que enquadram Ouro Preto nessa formação, enquanto que enclave edáfico é uma classificação de VELOSO *et al.* (1991) e significa que a vegetação é limitada por características do solo e assim só se desenvolve onde o solo é favorável. O clima segundo classificação de Köppen é do tipo Cwb (úmido mesotérmico), temperado úmido com inverno seco e verão quente chuvoso e, segundo TERRÔLA (2011) a área em si tem a espécie arbórea *Guapiraopposita* (REITZ) como a mais frequente e dominante.

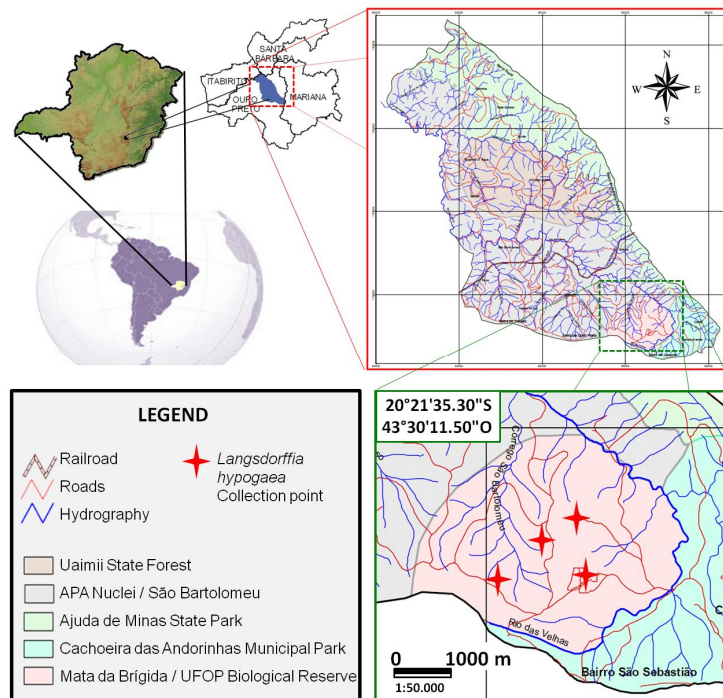


Figura 5: Determinação geográfica do local de coleta das amostras.

Serra da Brígida (ponto central: 20°21'35''S, 43°30'11''W), inserida no Parque Natural Municipal das Andorinhas, porção sul da APA (Área de Proteção Ambiental) Cachoeira das Andorinhas, Ouro Preto.

3.2-Coleta amostral, seleção e isolamento dos microrganismos

Foram coletados onze indivíduos de *Landsdorffia hypogaea*, com fragmentos da raiz parasitada e rizosfera correspondente. As amostras foram armazenadas em sacos plásticos e processadas no mesmo dia. Para cada amostra foram utilizados dez fragmentos internos da raiz de *Landsdorffia hypogaea*, sendo cinco plaqueados em meio ágar nutriente contendo o fungicida tiofenato 0,03 mg/L (propício para o crescimento de bactérias) e cinco fragmentos plaqueados em meio ágar *Sabouraud* contendo cloranfenicol 200 mg/L (propício para o crescimento de fungos). Desta forma, totalizando 55 fragmentos de *L. hypogaea*, 55 fragmentos da raiz hospedada e 22 amostras de rizosfera (Figura 6).

A raiz hospedeira foi lavada seguindo uma sequência padronizada de soluções para desinfestação superficial, a saber: NaCl 9g/L (2min), álcool 70% (2 min), hipoclorito de sódio com 2% de cloro ativo (2 min) e outra solução salina de NaCl. Esse procedimento inicial teve como objetivo retirar os resíduos de solo contidos na hospedeira e seus microrganismos epifíticos. De forma semelhante aos fragmentos de *L. hypogaea*, 10 fragmentos de cada raiz de planta hospedeira foram plaqueados, cinco para cada tipo de meio (Figura 6).

Para plaquear os microrganismos da rizosfera, foi colocado em uma solução salina um fragmento de raiz hospedeira com resquícios de solo, em seguida, uma alíquota de 100 µL foi plaqueada nos dois meios seletivos. A partir desta primeira salina 1000 µL foram transferidos para uma nova salina (pura) e após agitação, outra alíquota de 100 µL foi plaqueada também em meios seletivos. A primeira alíquota apresentou uma concentração de 10^{-1} e a segunda 10^{-2} , permitindo isolamento mais restrito de células microbianas nessa última concentração (Figura 6).

Todas as placas foram incubadas a temperatura de 25 a 28°C por um período de até 10 dias, e os microrganismos crescidos foram purificados em novas placas de Petri contendo os mesmos meios utilizados no isolamento. Essas colônias isoladas foram fotografadas (frente e verso) e agrupadas de acordo com suas origens: *Langsdorffia hypogaea*, hospedeira ou rizosfera, e dentro de cada um desses três grupos os fungos e

bactérias foram separados. Todos os isolados foram preservados em glicerol 15% à -20°C.

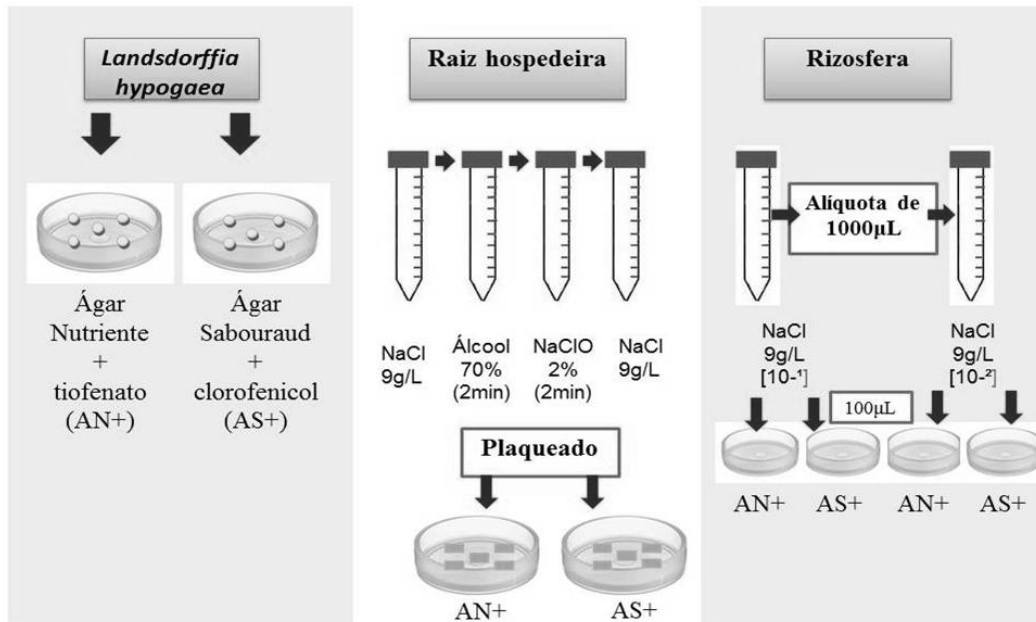


Figura 6: Síntese representativa da metodologia de seleção dos isolados de *Landsdorffia hypogaea*, sua hospedeira e rizosfera correspondente.

3.3-Identificação morfológica dos isolados

3.3.1 – Coloração de Gram

Todos os isolados de bactérias forma agrupados pela técnica de Gram. O método consistiu inicialmente no esfregão de uma pequena porção das culturas bacterianas em uma lâmina que, em seguida, foram flambadas, com o objetivo de fixar as amostras à lâmina. O procedimento foi realizado segundo a série de reagentes: cristal violeta (1min), água destilada, lugol (1 min), água destilada, lavagem rápida álcool-acetona, água destilada, fucsina (30 s) e última lavagem com água destilada e observada ao microscópio com aumento de 400 e 1000X.

3.3.2 – Micro-cultivo

Todos os isolados de fungos filamentosos foram agrupados de acordo com características macromorfológicas: cor da colônia (frente e verso), textura da superfície (frente e verso), aspecto da borda.

Foram realizados microcultivos de todos os isolados de fungos com a finalidade de visualizar sua morfologia microscópica. Para todas as amostras, foram utilizados: placa de Petri, lâmina de vidro, suporte para lâmina, lamínula, ágar Sabouraud, algodão e água destilada, sendo todo esse material estéril. Na placa de Petri, foi colocado um algodão ao fundo umedecido com água destilada para permitir hidratação do microambiente formado. Um suporte dentro da placa foi inserido para apoiar a lâmina de vidro e sobre esta última foi colocado o meio ágar Sabouraud cortado em forma de um pequeno quadrado. Com o auxílio de uma alça estéril, a amostra foi esgotada sobre o meio e em seguida coberto pela lamínula. Todas as amostras permaneceram na estufa a 28°C por uma semana.

Após este período, foram retiradas as lamínulas dos microcultivos, e as amostras foram coradas com lactofenol azul de algodão e analisada em microscópio óptico com aumento de 400 e 1000X e suas imagens registradas por meio de câmera acoplada ao microscópio.

3.4 - Identificação molecular de fungos e bactérias

3.4.1-Extração de DNA total

Fungos

A extração do DNA total foi realizada de acordo com adaptações ao modelo proposto por ROSA e colaboradores (2009). Os fungos filamentosos foram crescidos por sete dias em ágar Sabouraud. Fragmentos de micélio foram colocados em tubo de 1,5 mL acrescidos de 400 µL de tampão de lise (Tris-HCl – tris-hidroximetilaminometano 0,05 M; EDTA - ácido etilenodiaminotetraacético 0,005 M; NaCl 0,1 M e SDS – sódio dodecil sulfato 1%) e deixado a – 20°C por aproximadamente 10 minutos. Foi acrescido ao micélio 5µL de Proteinase K (50µg/mL) seguido de trituração mecânica, na qual 3 pérolas de vidro de 3,2 cm de diâmetro foram

colocados em cada amostras e levados ao extrator (Uniscience-BulletBlender) por 25 minutos. Após homogeneização, o tubo foi colocado por 30 minutos a 60°C em banho-maria. Após essa etapa, foram adicionados 162 µL de CTAB (Tris 2 M; NaCl 8,2%; EDTA 2 M e CTAB 0,2%), seguido de homogeneização e incubação por 10 minutos a 65°C. Em seguida, foram acrescentados 570 µL da mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Após homogeneização, o tubo foi incubado por 30 minutos em gelo. Em seguida, o conteúdo foi centrifugado a 13.200 r.p.m. por 10 minutos e o líquido sobrenadante transferido para um novo tubo de 1,5 mL, acrescentado 10% do volume da solução de acetato de sódio 3 M. O tubo foi vertido para homogeneização, incubado a 0°C por 30 minutos e centrifugado a 13.200 r.p.m. por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde foi adicionado 50% do volume de isopropanol e centrifugado a 13.200 r.p.m. por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado por inversão. A seguir, foram adicionados 200 µL de etanol (Merck) 70% p/v a 4°C e a suspensão foi gentilmente homogeneizada. Após este procedimento, a amostra foi centrifugada a 13.200 r.p.m. por 5 minutos e o sobrenadante desprezado por inversão, seguido por homogeneização com etanol 70% p/v. A amostra foi seca por aproximadamente 15 minutos. Finalmente, 100µL de Tris-EDTA (Tris-HCl 0,01 M e EDTA 0,001 M) foram adicionados e a mesma incubada a 65°C por 60 minutos para hidratação do DNA. As amostras foram então armazenadas em freezer a -20°C para uso posterior.

Bactérias

Para a extração do DNA bacteriano, adaptou-se o método de lise térmica descrito por HU e colaboradores (1999). Cada isolado foi crescido em meio Agar nutriente líquido por dois dias. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 12 000 r.p.m. durante 10 minutos. O meio foi descartado e a massa bacteriana precipitada foram acrescentados 100 µl de água destilada estéril e 80 µl de SDS 1% (dodecil-sulfato de sódio). Em seguida, as amostras foram mantidas por 1 hora em banho-maria a 65°C.

Uma nova centrifugação foi realizada (12 000 r.p.m. por 10 minutos) e o sobrenadante foi transferido para novos tubos estéreis, adicionando etanol 70% gelado em igual volume. Após outra centrifugação (12 000 r.p.m. por 15 minutos) o

sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado foi ressuspendido em 100 µl de de Tris-EDTA (Tris-HCl 0,01 M e EDTA 0,001 M) pH 8.

3.4.2 - Agrupamento molecular

Fungos – PCR com iniciador (GTG)5

Para confirmação do agrupamento em morfologia dos fungos filamentosos, os isolados foram submetidos à análise molecular, por meio de PCR utilizando o iniciador (GTG)5. A reação de PCR foi realizada em um volume final 25 µL contendo 3µL de DNA, 2 µL do iniciador (GTG) 5 µmol-1 (MWG Biotech), 2,5 µL de tampão de PCR 5X (Fermentas), 1,5 µL de MgCl₂ 25mM, 1 µL de dNTP 10 mM, 0,3 µL de TaqDNA polimerase 5U (Fermentas) e o volume final completado com água destilada estéril. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador PCR (Biosystems) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguido por 40 ciclos de 45 segundos de desnaturação a 93°C, 1 minuto de anelamento a 50°C e 1 minuto de extensão a 72°C. Uma extensão final foi incorporada por 6 minutos a 72°C. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, em tampão TBE 0,5X, eluídos em tampão de corrida 6X e Gel Red, durante aproximadamente 90 min a 80V. Os géis foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (VilberLourmat, France).

Bactérias – agrupamento Box

Análise por BOX-PCR foi usada para confirmar o agrupamento morfológico das bactérias. A reação de PCR foi preparada para um volume final de 25 µl contendo: 2µL de DNA, 4 µL primer BOX (BOX 1AR) 50 pmol, 4 µL de tampão de PCR 5X (Fermentas), 1 µL de MgCl₂ 25mM, 3 µL de dNTP 10 mM, 0,3 µL de TaqDNA polimerase 5U (Fermentas) e o volume final completado com água destilada estéril. Utilizou-se o termociclador PCR (Biosystems) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 95°C, 1 minuto da anelamento a 53°C e 2 minuto de extensão a 72°C. Uma extensão final foi incorporada por 10 minutos a 72°C. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8%, em tampão TBE 1X, eluídos em tampão de corrida 6X corado com brometo de etídio, durante aproximadamente 30 min a 120V. Os géis

foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (VilberLourmat, France).

3.4.3- Obtenção dos amplicons

Fungos

Para amplificação da região ITS do rDNA dos fungos isolados, foram utilizados os iniciadores ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC), conforme descrito por White e colaboradores (1990). A PCR foi realizada em um volume final de 50µL contendo 2µL de DNA, 1 µL de cada iniciador ITS1 e ITS4 10 µmol-1 (MWG Biotech), 5 µL de tampão de PCR 5X (Fermentas), 2 µL de MgCl₂ 25 mM, 2 µL de dNTP 10 mM, 0,3 µL de Taq DNA polimerase 5U (Fermentas) e o volume final completado com água destilada estéril. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador PCR Express (ThermoHybaid). O programa consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94°C, 1 minuto de anelamento a 55°C e 1 minuto de extensão a 72°C. Uma extensão final foi adicionada por 5 minutos a 72°C. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5X, eluídos em tampão de corrida 6X e Gel Red, durante aproximadamente 30 minutos a 120V. Os géis foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (VilberLourmat, France).

Bactérias

Para amplificação do gene 16S rRNA das bactérias foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores 27f (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) e 1492r (TACGGYTA CTTGTTACGACTT). A reação de PCR foi preparada para um volume final de 25 µl contendo: 2µL de DNA, 2 µL do iniciador 27f, 2µL do iniciador 1492r, 4 µL de tampão de PCR 5X (Fermentas), 1 µL de MgCl₂ 25mM, 3 µL de dNTP 10 mM, 0,3 µL de TaqDNA polimerase 5U (Fermentas) e o volume final completado com água destilada estéril, concentrações de 10pmol/µL. Utilizou-se o termociclador PCR

(Biosystems) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 95°C, 45 segundos de anelamento a 47°C e 2 minutos de extensão a 72°C; uma extensão final foi incorporada por 10 minutos a 72°C. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8%, em tampão TBE 1X, eluídos em tampão de corrida 6X corado com brometo de etídio, durante aproximadamente 30 min a 120V. Os géis foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (VilberLourmat, France).

3.4.4- Purificação dos amplicons

Os amplicons gerados pela reação de PCR foram purificados utilizando-se polietilenoglicol (PEG 8 000). Ao produto de PCR foi adicionado igual volume de uma solução de Polietilenoglicol 20% em NaCl 2,5 M, que foi mantido em banho-maria à 37°C por 15 minutos. O tubo foi centrifugado a 13.500 r.p.m. por 15 minutos e o sobrenadante retirado e descartado. A seguir, foram adicionados 125 µL de etanol 70-80% resfriado a 4°C, o tubo foi centrifugado a 13.500 r.p.m. por 2 minutos e o etanol retirado. Este passo foi repetido mais uma vez e a amostra novamente centrifugada a 13.200 r.p.m. por um segundo (*spindown*). O tubo foi deixado à temperatura ambiente para evaporação de todo o excesso de etanol. Foram adicionados 10 µL de água deionizada estéril e o conteúdo do tubo foi homogeneizado em vórtex por 15 segundos. Em seguida, o tubo foi incubado em banho maria a 37°C por 40 minutos. O produto obtido foi dosado em NanoDrop, ND 1000, (NanoDropThecnologies) para ser utilizado nas reações de sequenciamento.

3.4.5- Reações de sequenciamento

O sequenciamento foi realizado utilizando-se o Kit DYEnamic™ (Amersham Biosciences,USA) em combinação com o sistema de sequenciamento automatizado MegaBACETM 1000, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária de Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal, com o auxílio do professor Dr. Jesus Aparecido Ferro. Para as reações de sequenciamento foram utilizados 50 ng do produto de PCR purificado e os reagentes presentes no Kit DYEnamic™ (Amersham Biosciences,

USA). A reação de sequenciamento foi realizada em um volume final de 10 µL contendo 4µL do pré-mix (presente no kit de sequenciamento) e 1 µL do iniciador (5 µmol-1), completando-se o volume final com água deionizada estéril. O programa consistiu de 36 ciclos de uma desnaturação inicial a 95°C por 25 minutos, seguido por 15 segundos de anelamento a 50°C e 3 minutos de extensão a 60°C. Após término da ciclagem, os produtos da reação foram transferidos para uma placa de sequenciamento de 96 poços para serem precipitados.

3.4.6 - Precipitação da reação de sequenciamento

Para precipitação dos componentes das reações de sequenciamento, 1µL de acetato de amônio 7,5 M foi adicionado em cada poço da placa de 96 poços. Em seguida, foram adicionados 28 µL de etanol absoluto (Merck). A placa foi submetida à agitação em vórtex e incubada por 20 minutos à temperatura ambiente, protegida da luz. Após período de incubação, a placa foi centrifugada por 45 minutos a 4.000 r.p.m. O sobrenadante foi descartado. Em seguida, foram adicionados 150 µL de etanol 70% (Merck). A placa foi novamente centrifugada por 15 minutos a 4.000 r.p.m. e o sobrenadante então descartado. Para remoção do excesso de etanol, a placa foi invertida sobre um papel absorvente, e submetida a um pulso em centrífuga a 900 r.p.m. durante 1 segundo. Em seguida, a placa foi mantida em repouso durante 20-40 minutos, protegida da luz, para evaporação do etanol. O DNA das amostras precipitado em cada poço da placa foi então ressuscitado em 10 µL de *Loading buffer* (presente no kit de sequenciamento). A placa foi submetida à agitação em vórtex por 2 minutos, pulsada em centrífuga por 1 segundo a 900 r.p.m. e armazenada a 4°C, protegida da luz, até injeção das amostras no sistema automatizado MegaBACETM 1000.

3.4.7 - Análise das sequências

As sequências de DNA foram analisadas utilizando-se o programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool - versão 2.215 do BLAST 2.0) disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) desenvolvido pelo National Center For Biotechnology Information (ALTSCHUL, 1990).

O perfil filogenético, baseado na sequência do gene ribossomal 16S foi determinado inicialmente usando o programa Phylogeny-Fr disponível no domínio <http://www.phylogeny.fr/>. Em seguida, foi realizada uma análise mais robusta usando o programa MEGA-4 (<http://www.megasoftware.net/>), com exclusão dos blocos não conservados e a o alinhamento global foi exportado para o programa Beaut.

3.5- Ensaio Bioquímicos

Foram realizados testes de fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato e produção de: amônia, ácido cianídrico, sideróforo, AIA, amilase, pectinase, celulase e protease.

3.5.1-Produção de amônia

Para determinar a produção de amônio utilizou-se o método do indofenol. Essa metodologia utiliza água livre de amônia (destilada e deionizada) e outros três reagentes, R1, R2 e R3. O reagente R1 constitui-se de 2,0g de hidróxido de sódio e 1,5g de tartarato de sódio. Dissolveu-se em água para um balão volumétrico de 100 mL. O reagente R2 foi hipoclorito de sódio a 10%p/p. No reagente R3 utilizou 1,0 de timol dissolvido em 25 mL de isopropanol e 1,5g de nitroprussiato de sódio, dissolvido em 10 mL de água. As duas soluções foram transferidas para um balão volumétrico de 50 mL completando com água.

Cada amostra de bactéria foi crescida em microtubos contendo 1 mL de meio LB (Luria-Bertani). Adicionaram-se 260 μ L do reagente R1, em seguida, 11,52 μ L do reagente R2. Após misturar, deixou-se em repouso por 5 minutos. Adicionaram-se 11,52 μ L do reagente R3. Após 5 minutos as amostras foram lidas em espectrômetro, a 690nm de absorbância e comparado contra o branco.

O princípio do método consiste na reação de amônia com hipoclorito em meio alcalino (tartarato de sódio e potássio), formando monocloroamina. A monocloroamina, em presença de nitroprussiato de sódio, reage com timol formando indofenol, composto que absorve em $\lambda=690\text{nm}$ (CARVALHO, 2012-comunicação oral).

3.5.2-Produção de sideróforo

Adaptado de SCHWYN & NEILANDS(1987), o método consiste na utilização de um complexo corante-ferro. O sideróforo, quando sintetizado e secretado, sequestra o ferro, alterando seu perfil de oxidação, fazendo com que a solução presente no meio mude de cor. A solução do corante é formada por três soluções: primeira consiste em 0,06g de cromo azuroil S (CAS) solubilizado em água destilada (QSP 50 ml); segunda na solubilização de 0,0027g de $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ em HCl 10mM (QSP 10 ml); e a terceira na solubilização de 0,073g de HDTMA em água destilada (QSP 50 ml). As três soluções foram misturadas em um frasco e submetidas a autoclavação a 120°C por 15 minutos.

O meio foi preparado separadamente. 100mL de meio M9 5X foi adicionado em 150mL de água destilada. 32,24 g de PIPES foram adicionadas a essa solução e o pH ajustado a 6,8 (uma vez que esse composto não dissolve em pH abaixo de 5 e acima de 6,8 a solução fica verde). Autoclavou-se a 120°C por 15 minutos. Após atingir a temperatura inferior à 50 °C, adicionaram-se 10mL de solução de glicose 20% , 30 ml de solução de casaminoácido filtrada (3g de casaminoácido em 27mL de água destilada mais 3% de hidroxiquinolona em clorofórmio w/w) e 100ml da solução corante inicialmente preparada. Verteu-se o meio azul em placa e a produção de sideróforo foi detectada pela formação de um alo amarelo.

3.5.3- Fixação de nitrogênio

Os microrganismo capazes de fixar nitrogênio foram detectados observando crescimento em meio semi-sólido livre de N_2 (adaptado de RENNIE, 1981). O meio é composto por: 5g de manitol, 5g de sacarose, 0,4g/L de K_2HPO_4 , 0,4g/L de KH_2PO_4 , 0,2g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02g/L de CaCl_2 , 0,002g/L de $\text{NaMoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,01 FeCl_3 , 0,075 de bromotimol e 2,3g/L de ágar. O pH foi ajustado para 5,7 e depois de autoclavado a 120°C por 15 minutos, o meio foi vertido em tubos de 5mL e cada isolado estriado em um tubo.

3.5.4- Produção de fosfato

Adaptado de KATZNELSON & BOSE (1959) este método baseia-se na adição de fosfato insolúvel ao meio que, desta forma, fica turvo. Bactérias capazes de solubilizar fosfato formam um halo claro ao redor de sua colônia. O meio consiste em 100g/L de K_2HPO_4 (0,57M), 100g/L CaCl_2 (0,90M) e 40g/L de NaOH (1M) e 1/10 de LB. As

soluções e os meios foram autoclavados separadamente e o pH do meio ajustado para 7,0 com o NaOH estéril. A reação de K_2HPO_4 e $CaCl_2$ forma o precipitado fino $CaHPO_4$. As bactérias foram incubadas a 28°C por dois dias.

3.5.5- Produção de ácido cianídrico (HCN)

Este método foi adaptado de BAKKER & SCHIPPERS (1987). 1/10 de meio LB sólido foi suplementado com 4,4g/L de glicina e 0,081g/L de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, estimuladores da produção de HCN. Cada isolado foi crescido em uma placa individual a 28°C por dois dias. Na tampa da placa, foi colocado papel filtro embebido com uma solução de ácido pícrico 5% p:v e $NaCO_3$ 2% p:v. A mudança de coloração do papel filtro de amarelo para marrom indicou a produção de HCN.

3.5.6- Produção de ácido indol acético (AIA)

Método colorimétrico adaptado de BRIC *et al.* (1991). Utilizou-se 1/10 de meio LB sólido enriquecido com 5mM de L-triptofano (1,021g/L), precursor do AIA. Foram transferidos sete isolados por placa e incubados por 24 horas a 28°C. Após esse tempo, cada isolado foi coberto por um papel filtro circular, autoclavado, com aproximadamente 2 cm de diâmetro. Novamente as bactérias foram incubadas por 24 horas a 28°C. Em seguida, cada círculo de papel filtro foi transferido para uma folha de papel alumínio, devidamente identificados, saturado com solução Salkowski (GORDON E WEBER, 1951) e incubado por 30 minutos. Essa solução é formada pela diluição de 2mL $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0,5M por litro de $HClO_4$ 35%. A mudança de coloração do papel filtro de amarelo (solução Salkowski) para avermelhado indica a produção do hormônio AIA.

3.5.7- Produção de amilase

Utilizou-se um meio composto por 6,7g/L de YNB, 2,0g/L de amido solúvel e 20g/L de ágar. Solubilizou-se em água quente, pH ajustado para 6 e foi autoclavado por 15 minutos a 120°C. Os isolados foram crescidos nesse meio por 24 horas a 28°C. Para revelar o ensaio, cobriu-se o meio de cultura com uma solução de lugol por cinco minutos. Após esse tempo, descartou-se o lugol e as bactérias produtoras de amilase foram as que apresentam um halo transparente, enquanto todo o resto da placa fica corado de marrom (STRAUSS *et al.*, 2001).

3.5.8- Produção de celulase

Para determinação da produção de celulase utilizou-se um meio contendo 6,7g/L de YNB, 0,5g/L de celobiose, 1g/L de carboximetilcelulose e 20g/L de ágar. Solubilizou-se em água quente e a solução foi batida no liquidificador a fim de melhor homogeneizar. Em seguida foi autoclavado por 15 minutos a 120°C. Os isolados foram crescidos nesse meio por 24 horas a 28°C. Para revelar esse teste, utilizou-se vermelho de congo 0,03% por 10 minutos com lavagem de NaCl após esse tempo. As bactérias produtoras de celulase formam um halo transparente, enquanto o restante do meio fica vermelho (STRAUSS et al., 2001).

3.5.9- Produção de protease

Utilizou-se um meio composto por 20g/l de caseína, 5g/L de peptona, 3g/L de extrato de levedura, 10g/L de glicose e 20g/L de ágar com pH ajustado para 5. Solubilizou-se em água quente seguido de autoclavagem por 10 minutos a 110°C. As bactérias foram crescidas nesse meio e as positivas para produção de protease foram capazes de formar um halo mais claro que o meio (STRAUSS et al., 2001).

3.5.10- Produção de pectinase

Para verificar a capacidade de produção de pectina, preparou-se um meio contendo 6,7g/L de YNB, 10g/L de pectina e 20g/L de ágar. O pH foi ajustado para 5 e a solução batida no liquidificador. A solução foi autoclavada por 15 minutos a 120°C. As bactérias foram crescidas por 24 horas a 28°C e o teste revelado com solução CTAB 1% cobrindo a placa por 5 minutos. As bactérias produtoras de pectina formam uma halo mais claro que o meio (STRAUSS et al., 2001).

3.6 - Testes antimicrobianos

Com a finalidade de testar possíveis atividades microbianas dos isolados, foram realizados ensaios relacionando-os com as seguintes bactérias: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352), *Shigella flexneri* (cepa não referenciada) e *Xanthomonas citri subsp. citri*. A *S. aureus* é um coco gram positivo, considerado um patógeno humano oportunista. *B. cereus* é bastonete o , endêmica, que vive no solo; algumas cepas podem causar intoxicação alimentar em seres humanos. *K. pneumoniae* é uma espécie de bactéria gram-negativa,

encapsulada, anaeróbia facultativa em forma de bastonete; pode causar pneumonia, embora seja mais comum suas implicações em infecções hospitalares. *S. flexnerie* é uma espécie de bactérias gram-negativas e *Xanthomonas citri subsp. citri* é a bactéria causadora da doença cancro cítrico, de grande importância para os produtores de laranja.

Todos os isolados foram crescidos em LB líquido. Após 20 dias, foram centrifugados a 12 000 r.p.m. por 10 minutos a fim de separar as células das macromoléculas produzidas. O sobrenadante contendo as moléculas de interesse foi separado do precipitado de células. Uma placa de Petri contendo meio LB sólido foi dividida em cinco partes de modo que cada parte tenha sido cultivada: 1-*S. aureus*, 2-*B. cereus*, 3-*K. pneumoniae*, 4-*S. flexnerie* 5-*X. citrisubsp. citri*. Com o auxílio de um furador, foram feitos cinco orifício circulares em cada placa como esquematizado na figura7. Nos cinco orifícios da cada placa foram adicionados 50µL do sobrenadante de um dos isolados, de modo que todos os isolados sejam confrontados com as cinco bactérias alvo.

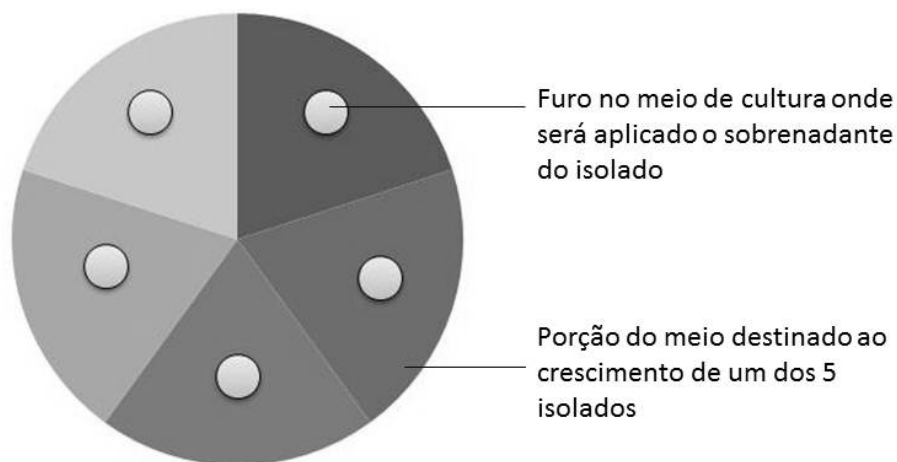


Figura 7: Modelo esquemático do teste de atividade antimicrobiana utilizando o sobrenadante das bactérias isoladas.

A placa foi dividida em 5 partes, cada uma destas partes foi furada ao centro, e cada furo recebeu uma fração do sobrenadante do isolado de interesse.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Inicialmente foram feitas caracterizações morfológicas e molecularres a fim de se conhecer a comunidade microbiana do modelo de estudo e, posteriormente, foi avaliado o potencial biotecnológico.

4.1- Caracterização morfológica e molecular dos isolados

Utilizando características macroscópicas como coloração, textura e forma das colônias, foram isoladas um total de 81 bactérias e 60 fungos (47 fungos filamentosos e 14 leveduras). A figura 8 representa alguns fungos e bactérias de *Langsdorffia hypogaea*, sua hospedeira e rizosfera.

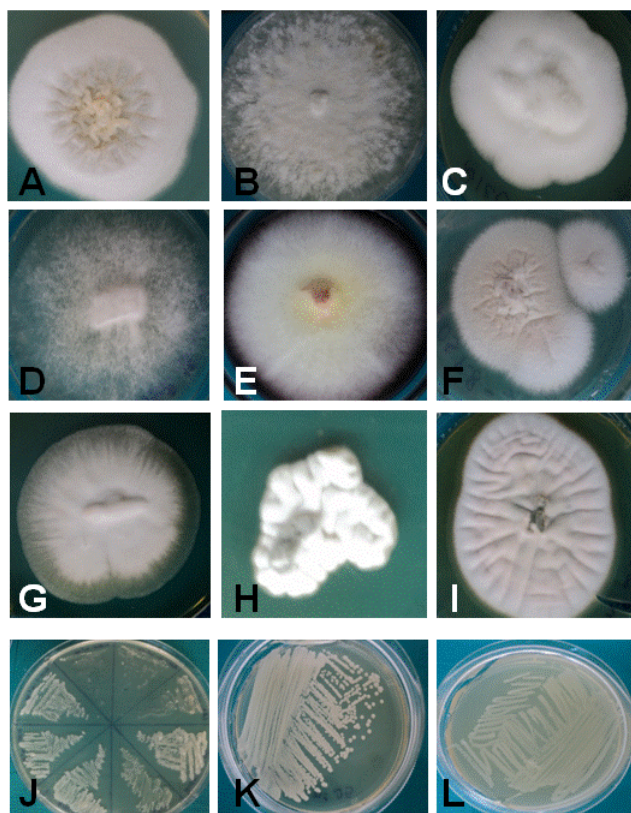


Figura 8: Caracterização macromorfológica de alguns dos isolados de fungos, leveduras e bactérias.

A a I – Representação da morfologia de crescimento de alguns fungos. J – Representação da morfologia de crescimento de algumas bactérias. K e L – Representação da morfologia de crescimento de algumas leveduras.

Fungos

Os fungos foram classificados segundo a morfologia de sua estrutura reprodutiva ou classificados como assexuados quando não se visualizou essa estrutura. Duas formas distintas da classe *Zygomycetes* foram encontradas, mas não foi possível identificar tais organismos em nível de gênero (Figura 9). Também foram encontrados isolados dos gêneros *Penicillium*, *Acremonium*, e uma estrutura bastante característica, porém não identificada, além de algumas leveduras.

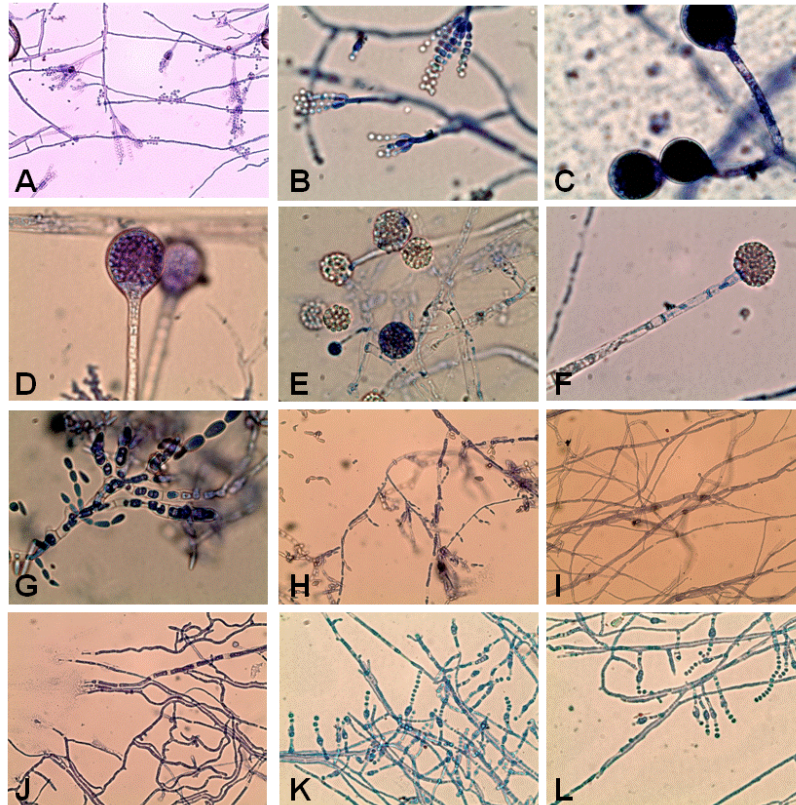


Figura 9: Estruturas reprodutivas dos morfotipos de fungos.

A e B-*Penicillium* sp, C e D- *Zygomycetes* , E e F- *Zygomycetes* , G e H- *Acremonium*, I e J- hifa assexuada e K e L- estrutura característica não identificada.

As comparações dos padrões de amplificação dos fragmentos de DNA genômico gerados pelos elementos repetitivos amplificados pelo iniciador GTG(5), tiveram como objetivo verificar a diversidade dos isolados. Apenas dois isolados apresentaram o mesmo perfil (figura 10).

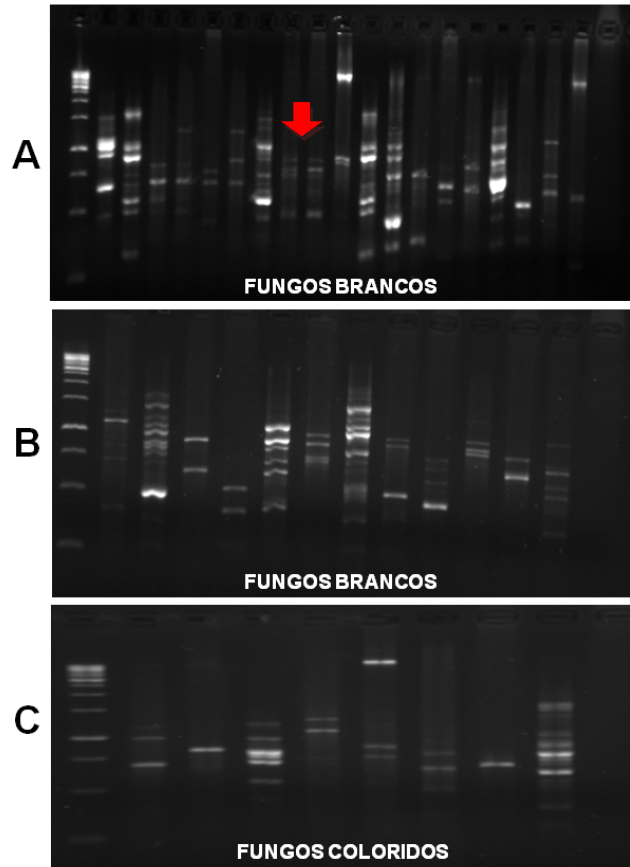


Figura 10: Produto de amplificação por oligonucleotídio GTG(5) em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, 90V.

A figura 11 representa graficamente a distribuição dos morfotipos de fungos nas três partes da amostra (*Langdorffia hypogaea*, sua hospedeira e rizosfera correspondente). Um dos resultados de destaque se trata do isolado de estrutura característico, porém, não identificada. Esse isolado foi encontrado apenas em *Langdorffia hypogaea*, reforçando a ideia de complementariedade de espécies, sendo uma possível espécie característica dessa planta.

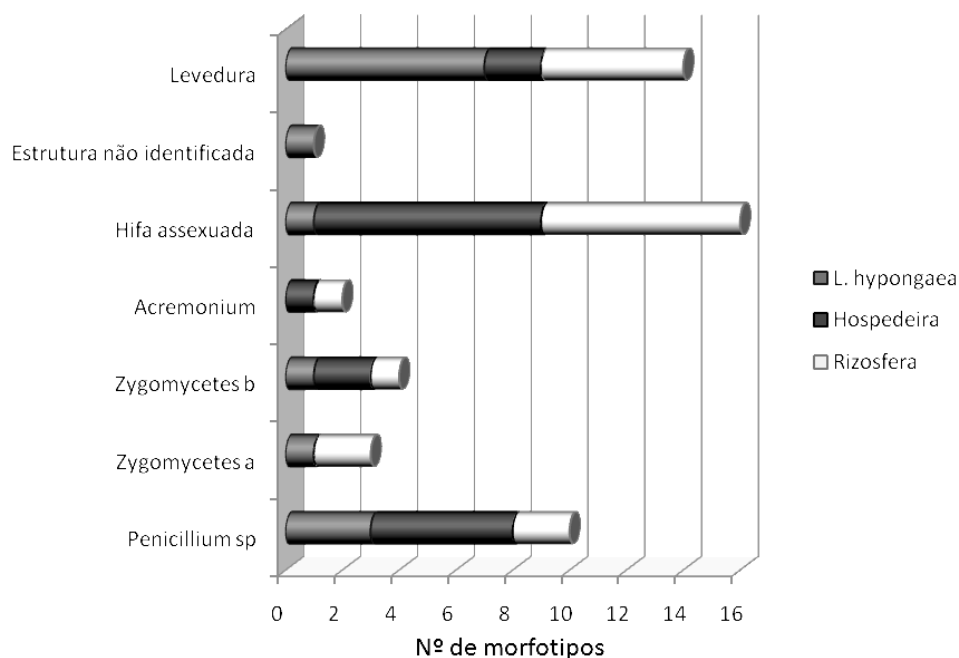


Figura 11: Classificação dos morfotipos de fungos nas 3 partes da amostra (*Langsdorffia hypongaea*, sua hospedeira e rizosfera correspondente).

Trabalhos como de SIKORA *et al.* (2005) e ALEMIDA *et.al.* (2005) em estudo de fungos endofíticos, apresentam o gênero *Penicillium* como sendo o mais diverso. Também são de importância nesses trabalhos os fungos da classe *Zygomycetes* e do gênero *Acremonium*, dados que corroboram com os morfotipos encontrados neste trabalho. No estudo de fungos filamentosos de sedimento do manguezal Barra das Jangadas, realizado por GOMES (2007), *Penicillium* também foi considerado o gênero com maior diversidade de espécies. Dentre esses, foram identificadas algumas espécies de *Penicillium* como sendo grandes produtores de lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase. O mais interessante no resultado daquele trabalho é que os fungos pertencentes ao gênero *Penicillium* demonstram potencial para serem introduzidos em processos de biorremediação, com perspectivas de resultados promissores para tratamentos de resíduos e efluentes contaminados com compostos fenólicos.

O sequenciamento e as análises do potencial biotecnológico foram feitos **somente para as bactérias** uma vez que os conhecimentos do grupo de pesquisa são limitados a este tipo de organismo. Existe uma colaboração com um grupo especializado em fungos (atualmente no ICB-UFMG).

Bactérias

As bactérias foram classificadas de acordo com sua morfologia microscópica e coloração de Gram. Na tentativa de classificar os isolados, sete morfotipos gerais foram considerados, sendo eles: bacilo pequeno (bc), bacilo grande (bg), bacilo arredondado (ba), bacilo fino (bc), estreptobacilo (e), estreptobacilo arredondado (ea) e cocos (c). Em associação, foram classificadas quanto à coloração de Gram., (Figura 12). Uma classificação não convencional, mas que auxilia no agrupamento molecular que teve seus géis seguindo a mesma sequência do agrupamento microscópico com os morfotipos para possibilitar a comparação das bandas. Algumas amostras não amplificaram com o primer Box (Figura 13).

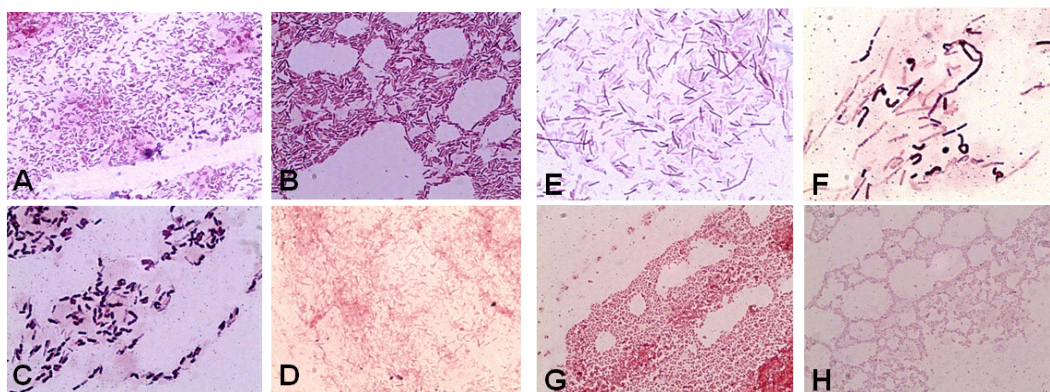


Figura 12: Morfotipos de bactérias classificadas através de microscopia.

A- bacilo pequeno, B- bacilo grande, C- bacilo arredondado, D- bacilo fino, E- estreptobacilo, F- estreptobacilo arredondado, G e H- cocos.

As comparações dos padrões de amplificação dos fragmentos de DNA genômico geradas pelos elementos repetitivos amplificados pelo iniciador BOX, tiveram como objetivo verificar a diversidade dos isolados (Figura 13). Uma vez que repetissem, só seria sequenciada uma das amostras. Entretanto, a variedade de padrões de bandas nos levou a sequenciar todas as amostras para uma análise mais específica.

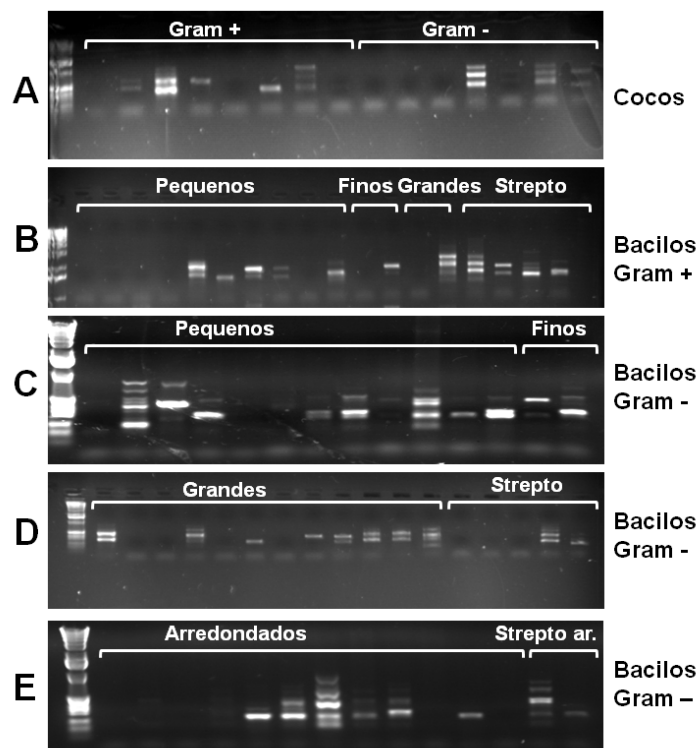


Figura 13: Produto de amplificação por oligonucleotídio BOX em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, 90V.

Foi extraído o DNA de todos os isolados (Figura 14). A amplificação da região que codifica 16S ribossomal gerou o produto cujo tamanho esperado coincidiu com o encontrado, cerca de 1400 pb (Figura 15). Estes amplicons foram purificados para posterior sequenciamento usando técnica de Sanger.

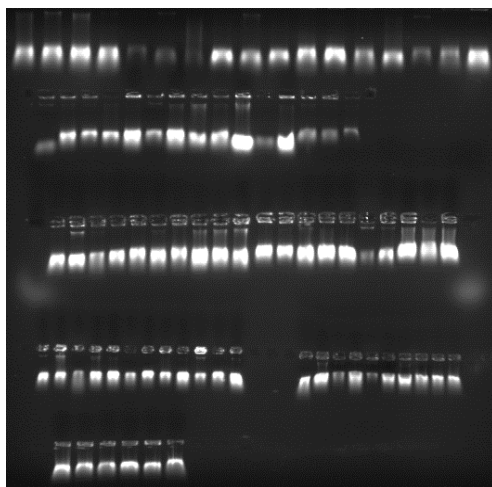


Figura 14: DNA genômico dos 81 isolados de bactérias, corados com brometo de etídio, corridos em gel de agarose 1%, 90V.

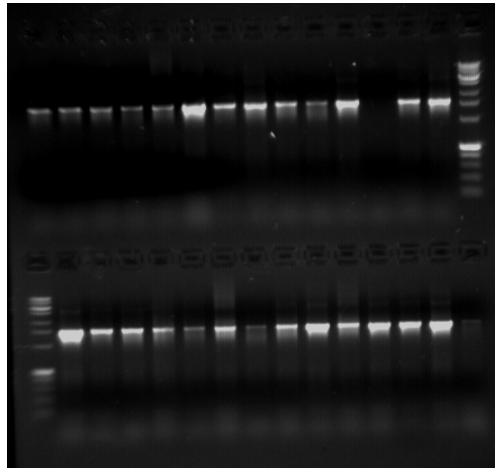


Figura 15: Produtos de amplificação do gene 16 S rDNA de algumas amostras bacterianas, com os primers 27f e 1492r.

A tabela 1 abaixo apresenta o resultado do sequenciamento. Após uso do programa Blast do NCBI, obteve-se o nome do indivíduo com maior porcentagem de identidade. Também está apresentada a origem do isolado (Langs, Rizos ou Host), o número de acesso, escore total, porcentagem de cobertura e o comprimento da sequência.

Tabela 1: Caracterização dos isolados com base no sequenciamento parcial do gene 16S ribossomal.

Seq. Name	Origen	Seq. Description (best hit)	Total Score	Query Cover	Max Identity	Accession	Seq. Length	Originally Isolated
1	Langs	<i>Uncultured bacterium clone H20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	2566	97%	99%	EU529722.1	1470	EBPR system
2	Langs	<i>Uncultured bacterium clone H20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	2492	94%	99%	EU529722.1	1479	EBPR system
3	Langs	<i>Uncultured bacterium clone H20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	2403	93%	98%	EU529722.1	1478	EBPR system
4	Langs	No significant similarity found.	-	-	-	-	1360	-
6	Langs	<i>Bacillus mycoides strain ChST4.2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	1214	66%	91%	JF935107.1	1364	Morcego
7	Langs	<i>Bacillus sp. SG19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	2625	96%	99%	JX402434.1	1496	Solo
8	Langs	<i>Lysinibacillus sphaericus strain R7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	2518	95%	98%	HQ259956.1	1502	Intestino de coelho
9	Langs	<i>Lysinibacillus sphaericus strain R7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	2259	96%	95%	HQ259956.1	1480	Intestino de coelho
10	Langs	<i>Lysinibacillus sphaericus strain R7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	2115	94%	94%	HQ259956.1	1494	Intestino de coelho
11	Langs	<i>Uncultured bacterium gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, clone: J13</i>	2518	95%	99%	AB291632.1	1474	Larva de <i>Myrmeleon</i>
12	Langs	<i>Enterobacteriaceae bacterium SAP62_1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	2405	94%	97%	JN872510.1	1484	Nectar floral
13	Langs	Without consensus	-	-	-	-	-	-
14	Langs	<i>Lysinibacillus sphaericus strain DS11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	2588	96%	99%	EU835735.1	1492	Água
15	Langs	Without consensus	-	-	-	-	-	-
16	Langs	<i>Klebsiella oxytoca strain NFL28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	2451	97%	98%	GQ496663.1	1465	Sedimentos marinhos
17	Langs	<i>Actinomycetales bacterium AA1519 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	2041	95%	93%	JQ924077.1	1477	Sedimentos marinhos
18	Langs	<i>Bacillus sp. SG19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	2575	96%	99%	JX402434.1	1474	Solo
19	Langs	<i>Bacillus sp. WYT007 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	2495	95%	98%	JQ807855.1	1496	Solo
20	Langs	<i>Lysinibacillus xylanilyticus strain TAX5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	2584	95%	99%	JX280924.1	1491	-
21	Langs	Without consensus	-	-	-	-	-	-
22	Langs	<i>Bacillus pumilus strain AIMST 4.Ti.5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	514	43%	82%	HQ683852.1	1353	Endofítica
23	Rizo	<i>Lysinibacillus sp. O-E16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	2597	95%	99%	JN613478.1	1491	Associada a raiz
24	Rizo	<i>Bacillus sp. SG19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	2579	95%	99%	JX402434.1	1494	Solo
25	Rizo	<i>Serratia sp. PT3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	2490	95%	99%	GU458285.1	1482	Intestino <i>Reticulitermes</i>
26	Rizo	<i>Serratia sp. PT3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	2510	95%	99%	GU458285.1	1481	Intestino <i>Reticulitermes</i>
27	Rizo	<i>Serratia sp. PT3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	2468	94%	98%	GU458285.1	1483	Intestino <i>Reticulitermes</i>
28	Langs	<i>Klebsiella sp. 38 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	1860	96%	90%	EU294412.1	1482	-
29	Rizo	<i>Lysinibacillus sphaericus strain 94YG16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	1074	71%	87%	FJ174634.1	1333	-
30	Rizo	<i>Serratia sp. S3.MAC.008 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	1240	70%	90%	HM063908.1	1381	Solo
31	Rizo	<i>Bacillus cereus strain M2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	2595	95%	99%	JF836882.1	1494	-
32	Rizo	<i>Bacillus cereus strain S72 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	2582	96%	99%	FJ763650.1	1493	Águas residuais da indústria da seda
33	Rizo	<i>Lysinibacillus sp. E15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	1766	95%	89%	JN082735.1	1496	Associadas a raiz

34	Rizo	<i>Lysinibacillus</i> sp. E15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1746	97%	89%	JN082735.1	1468	Associadas a raiz
35	Rizo	<i>Bacillus cereus</i> strain S72 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2617	96%	99%	FJ763650.1	1491	Águas residuais da indústria da seda
36	Rizo	Uncultured bacterium clone H20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2567	95%	99%	EU529722.1	1483	Solo
37	Rizo	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: W10	2379	97%	98%	AB506441.1	1430	Soro de queijo
38	Rizo	<i>Citrobacter freundii</i> strain F1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	569	53%	81%	FJ608234.1	1317	Intestino <i>Anopheles stephensi</i>
39	Rizo	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: W10	2241	97%	95%	AB506441.1	1435	Soro de queijo
40	Rizo	<i>Viridibacillus arenosi</i> strain Hc6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2566	95%	99%	JF899298.1	1493	Endofítica tabaco
41	Rizo	<i>Serratia marcescens</i> strain KtMC2-16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2495	97%	99%	KC122200.1	1427	Solo ácido
42	Rizo	<i>Serratia</i> sp. PT3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2543	95%	99%	GU458285.1	1480	Intestino <i>Reticulitermes</i>
43	Rizo	Uncultured bacterium clone H20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2553	94%	99%	EU529722.1	1483	EBPR system
44	Rizo	Uncultured bacterium clone H20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2266	94%	96%	EU529722.1	1480	EBPR system
45	Rizo	<i>Serratia</i> sp. PT3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2276	96%	96%	GU458285.1	1467	Cupim
46	Rizo	Uncultured bacterium clone H20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2473	96%	98%	EU529722.1	1673	EBPR system
47	Rizo	<i>Ewingella</i> sp. KTHG3-2 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	2545	95%	99%	AB766012.1	1485	Intestino <i>Hyllobius abietis</i>
48	Rizo	Uncultured <i>Erwinia</i> sp. partial 16S rRNA gene, isolate ELC0611, clone A1106D0303	2368	94%	97%	HE575590.1	1482	Pulgão do repolho
49	Rizo	<i>Bacillus</i> sp. SG19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2564	95%	99%	JX402434.1	1494	Solo
50	Rizo	Uncultured bacterium clone H20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2536	94%	99%	EU529722.1	1483	EBPR system
51	Rizo	Uncultured bacterium clone H20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2505	95%	99%	EU529722.1	1483	EBPR system
52	Rizo	Uncultured bacterium clone H20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2459	95%	98%	EU529722.1	1479	EBPR system
53	Rizo	Uncultured bacterium clone H20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2348	95%	97%	EU529722.1	1482	EBPR system
54	Rizo	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain V7c10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1600	74%	97%	KC195905.1	1301	Solo agrícola
55	Hosp	Uncultured bacterium clone H20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2211	96%	95%	EU529722.1	1471	EBPR system
56	Hosp	Uncultured bacterium clone FWG08_PB 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	429	54%	77%	JQ480816.1	1336	Água
57	Hosp	Without consensus	-	-	-	-	-	-
58	Hosp	<i>Enterobacter</i> sp. KW14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2193	97%	95%	HQ231953.1	1451	Rizosfera de planta invasiva
59	Hosp	<i>Paenibacillus taichungensis</i> strain B2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2569	95%	99%	JX010966.1	1496	Solo
60	Hosp	Uncultured bacterium clone SW-2T_A07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	67.6	10%	76%	JX286204.1	1365	Água potável
61	Hosp	<i>Bacillus cereus</i> strain M2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2591	95%	99%	JF836882.1	1498	-
62	Hosp	Uncultured bacterium clone H20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2508	95%	99%	EU529722.1	1484	EBPR system
63	Hosp	<i>Lysinibacillus</i> sp. E15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2122	95%	94%	JN082735.1	1489	Associada a raiz
64	Hosp	Uncultured bacterium clone D05JOiSO 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	272	54%	74%	JF692719.1	1318	Bacia urbana costeira
65	Hosp	<i>Bacillus</i> sp. SG19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2174	96%	94%	JX402434.1	1476	Solo
66	Hosp	<i>Paenibacillus taichungensis</i> strain B2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2449	96%	98%	JX010966.1	1481	Solo

67	Hosp	<i>Uncultured bacterium clone H20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	2540	95%	99%	EU529722.1	1484	EBPR system
68	Hosp	<i>Uncultured bacterium clone H20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	2058	94%	93%	EU529722.1	1485	EBPR system
69	Hosp	<i>Bacillus sp. SG19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	2582	97%	99%	JX402434.1	1463	Solo
70	Hosp	<i>Paenibacillus taichungensis strain A80 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	841	86%	79%	JX010963.1	1494	Solo
71	Hosp	<i>Uncultured bacterium clone H20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	2564	96%	99%	EU529722.1	1472	EBPR system
72	Hosp	<i>Bacillus sp. WYT034 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	2455	99%	99%	JQ807859.1	1374	Solo
73	Hosp	<i>Bacillus sp. BD-113 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	1472	75%	93%	AF169513.1	1344	-
74	Hosp	<i>Serratia marcescens strain S418 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	2584	96%	99%	GQ202220.1	1469	-
75	Hosp	<i>Serratia sp. EP28 16S rRNA gene</i>	2538	96%	99%	AM403719.1	1471	Sedimentos marinhos
76	Hosp	<i>Bacterium BR115 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	1823	95%	90%	EU603509.1	1476	Solo
77	Hosp	<i>Bacillus sp. CMJ1-20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	2603	97%	99%	KC119106.1	1480	Alga
78	Hosp	<i>Lysinibacillus sphaericus strain Je40-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	2542	95%	99%	KC152651.1	1493	Solo
79	Hosp	Without consensus	-	-	-	-	-	-
80	Hosp	<i>Bacillus sp. BA-1-09 partial 16S rRNA gene, isolate BA-1-09</i>	2314	95%	98%	HF678904.1	1379	Lago
81	Hosp	<i>Lysinibacillus sphaericus strain R7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	1997	96%	92%	HQ259956.1	1480	Intestino de coelho

Um isolado foi perdido na conservação (amostra 5) Para outros 4 isolados não foi possível obter a fita consenso gerada pelos dois oligonucleotídeos 27F e 1492R, logo, não foram identificados e não entraram na análise filogenética.

Um dos resultados que mais se destaca na tabela corresponde a amostra número 4 de *Langsdorffia hypogaea*. A sequência gerada não encontra similaridade com qualquer isolado já depositado no banco de dados. Tal resultado reforça a ideia da existência de uma relação de complementariedade de espécies de vegetais e microrganismos. Sendo *Langsdorffia hypogaea* uma espécie negligenciada e de relações ecológica característica, esperava-se encontrar algum microrganismo novo e específico. A amostra 4 apresenta-se como um potencial microrganismo novo. Entretanto, estudos mais robustos são necessários para comprovar esse resultado prévio.

Outro dado de destaque foi que ao verificar a similaridade dos nossos isolados com microrganismos já depositados no banco de dados, a maioria dos microrganismos já depositada também apresentou relação com plantas e solos, sendo alguns endofíticos, incluindo associados a raízes, e muito isolados do solo.

A figura 16 representa graficamente a distribuição dos gêneros (exceto *Enterobacteriaceae* que é família) entre *Langsdorffia hypongaea*, sua hospedeira e rizosfera correspondente.

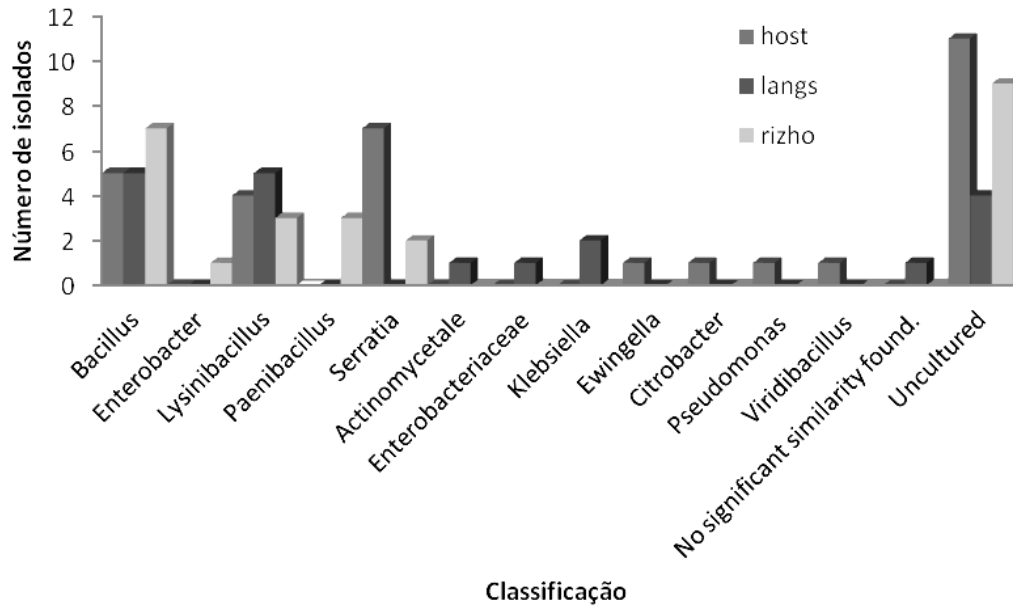


Figura 16: Representatividade e distribuição dos gêneros entre *Langsdorffia hypongaea*, sua hospedeira e rizosfera correspondente.

É possível observar que existem gêneros que são exclusivos de *Langsdorffia hypongaea*, exclusivos de sua hospedeira ou da rizosfera. Esse resultado reforça a idéia de que em um ecossistema, a interação de comunidades de espécies de vegetais e microorganismos esteja diretamente relacionada a seu habitat e a um grau de equilíbrio estável. Um habitat específico fornece condições características que propicia o crescimento de determinados microrganismos. Tal dado pode ser claramente observado na figura 17 que representa os microrganismos que deram similaridade com os isolados e suas respectivas origens.

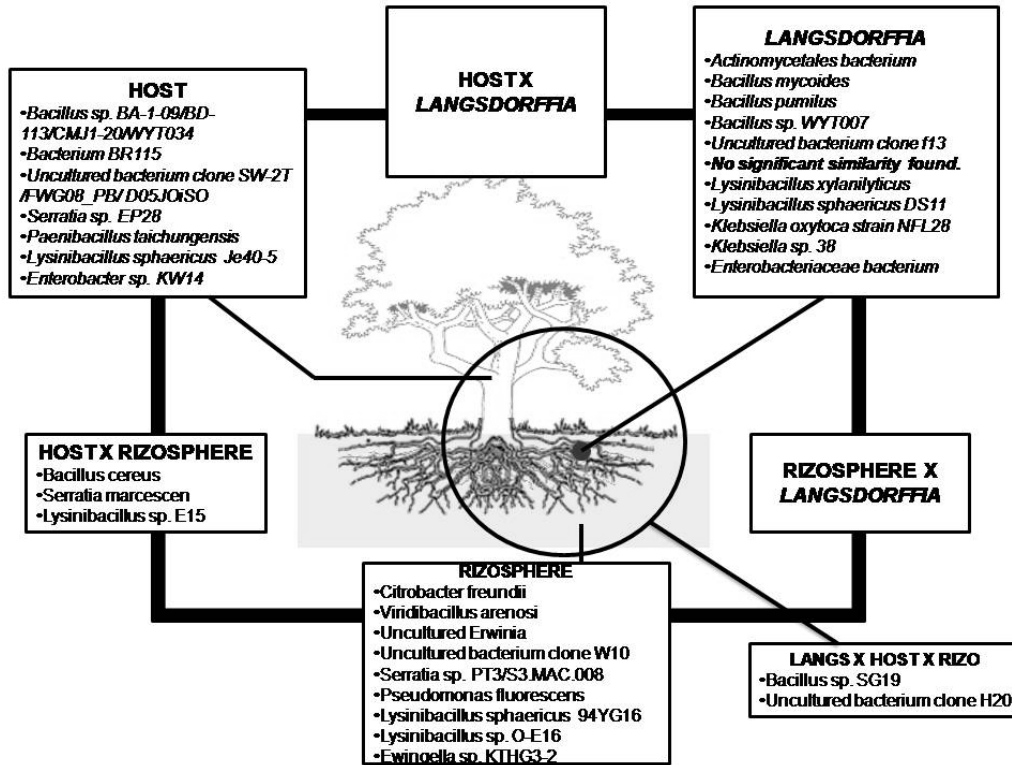


Figura 17: Relação entre os microrganismos identificados e seus respectivos nichos.

A figura 18 apresenta a relação filogenética dos isolados baseados nos indivíduos de maior porcentagem de identidade. Formaram-se agrupamentos bem definidos, sendo que alguns isolados, inicialmente separados como indivíduos distintos, possivelmente representam o mesmo indivíduo. Por exemplo, um agrupamento formado por “Uncultured bacterium clone H20 16S ribosomal RNA gene” com isolados de *Langsdorffia hypongaea*, sua hospedeira e rizosfera correspondente, possivelmente, ao mesmo organismo se trata do gene do mesmo indivíduo. O que nos leva a outra especulação, relacionada com a importância deste intercâmbio de microrganismos entre os três nichos analisados.

A amostra 4, possivelmente uma nova espécie, pertence a um clado monofilético, junto a *Citrobacter freundii* strain F1 e próximo a *Lysinibacillus* sp. E15, sendo a primeira uma Proteobacteria e a segunda uma Firmicutes. Logo, tal amostra

apresenta características de filos bem distintos, não sendo possível determinar a qual grupo pertence por essas análises primárias executadas.

Figura 18: Análise do perfil de distribuição filogenético dos isolados bacterianos.

4.2- Caracterização do potencial biotecnológico (Ensaio Bioquímicos)

Fixação de nitrogênio

Mais de 80% dos isolados tiveram crescimento em meio sem nitrogênio, um número alto se comparado com a mesma proposta de análise em outros nichos (Figura 19). TRIVEDI (2001) em seu trabalho encontrou aproximadamente 50% dos seus isolados como fixadores de nitrogênio, o que reforça, quando comparado, o alto número de isolados capazes de fixar nitrogênio encontradas neste trabalho.

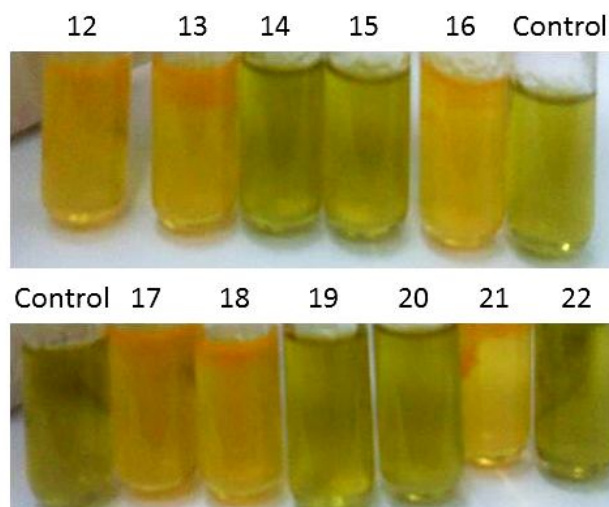


Figura 19: Perfil de crescimento bacteriano em meio sem fonte de Nitrogênio.

Em meio livre de nitrogênio, as bactérias que cresceram foram consideradas como capazes de fixar nitrogênio associativamente. Meio turvo (amarelo) com crescimento bacteriano e meio translúcido (verde) sem crescimento de bactérias.

Segundo DÖBEREINER(1992), os microrganismos que fixam nitrogênio podem fazê-lo em três circunstâncias: independentemente de outros organismos (diazotróficos de vida livre), em associação a plantas (isto é, na rizosfera ou dentro das plantas) ou em estreita simbiose, por exemplo entre rizóbios e plantas leguminosas, o que não é o caso, visto que nosso modelo de estudo não se trata de uma leguminosa.

Sendo o nitrogênio um elemento essencial, justifica a importância de tantos microorganismos com essa capacidade. A fixação biológica de nitrogênio tem por característica ser um sistema auto-regulado, isto é, a fixação cessa uma vez que há suficiente nitrogênio disponível no solo ou para a planta (DÖBEREINER, 1992).

Para confirmar a capacidade de fixação de nitrogênio desses isolados, é interessante a amplificação do gene *nif*, obtendo-se assim um resultado mais preciso e confiável. Esse gene é responsável pela codificação de proteínas relacionadas e associadas com a fixação de nitrogênio atmosférico. Estes oligonucleotídeos já foram encomendados e a análise da presença de genes representa atividades futuras a serem desenvolvidas.

Produção de íon amônio

O teste de produção do íon amônio gerou valores de absorvância que, comparados ao enteropatógeno *Proteus* sp., sabidamente produtor de amônia, possibilitou detectar essa capacidade nos demais isolados (tabela anexo 1). Esse enteropatógeno apresentou um valor de absorvância de 0,727 e os isolados valores médios entre 0,340 e 0,841. Desta forma, pode-se sugerir que todos os microrganismos apresentam alguma capacidade de produzir íon amônio. O benefício do efeito do íon amônio pode estar relacionado com a aquisição do nitrogênio, o transporte celular e a recuperação do nitrogênio (WIRÉN, N. V. e MERRICK, M., 2004). Como 70 dos 80 isolados são potenciais fixadores de nitrogênio, pode-se inferir uma relação entre fixação de nitrogênio e a produção de íon amônio.

A existência de algum microrganismo comum a *Langsdorffia hypongaea*, a hospedeira e a rizosfera também pode estar relacionada à quimio-atração e conceito de sensores de amônio em bactérias (WIRÉN, N. V. e MERRICK, M., 2004). Não foi encontrado nenhum valor muito alto de produção do íon amônio e isso pode ser justificado pela toxicidade desse íon em altas concentrações. A sensibilidade ao amônio é um fenômeno universal e ocorre entre animais e microrganismos (WIRÉN, N. V. e

MERRICK, M., 2004). Curva de calibração para determinação da concentração deste íon produzido por estes isolados é fundamental e também será uma proposta futura.

Produção de sideróforos

Dentre os 80 morfotipos de bactérias isoladas, 43 são produtores de sideróforos. De 65 a 75% dos isolados da *Langsdorffia hypogaea* e da hospedeira produzem tal molécula, comparados a aproximadamente 50% dos isolados da rizosfera (Figura 20).



Figura 20: Meio seletivo para determinação de produção de sideróforos pelos isolados bacterianos.

Meio contendo um complexo corante-ferro. O sideróforo, quando existente, sequestra o ferro, liberando o corante que causa mudança da cor azul para amarelo.

Segundo NAVARRO (2013), o relevo da região de floresta da Serra da Brígida, área de coleta, é sustentado pelos itabiritos da Formação Cauê e por quartzitos da Formação Moeda. Itabiritos são formações ferríferas metamórficas e fortemente oxidadas, apresentando descontinuamente corpos de minério de alto teor (>64% Fe) (ROSIÈRE, C.A.; CHEMALE JR, F., 2000). Ou seja, o solo da região de coleta apresenta alto teor de ferro, entretanto esse ferro pode não estar altamente disponível. O ferro pode estar no solo nas formas Fe^{2+} ou Fe^{3+} , sendo esse último menos solúvel. Os sideróforos quelam e internalizam Fe^{3+} , tornando-o disponível para o microrganismo produtor dessa molécula e conseqüentemente diminuindo a disponibilidade de ferro para possíveis microrganismos patogênicos, sendo um promotor de crescimento indireto pelo controle de fitopatogênias. Mais da metade dos isolados são produtores de

sideróforos e podem estar contribuindo para a proteção de *Langsdorffia hypongaea* e de sua hospedeira.

É importante evidenciar que estes sideróforos quelados a ferro também poderiam ser adquiridos pela planta, e isto influenciaria diretamente no seu desenvolvimento. Neste sentido, a presença destes organismos em simbiose com a planta poderia justificar a adaptação destes vegetais em um ambiente considerado hostil à boa parte das plantas conhecidas. O que pode estar relacionado a endemia de algumas espécies vegetais nesta região do Quadrilátero Ferrífero.

Solubilização de fosfato

Nenhum dos isolados bacterianos foi capaz de solubilizar fosfato, levando em conta a metodologia utilizada (Figura 21). Como esse componente é essencial tanto para os microrganismos como para as planta, outras adaptações são necessárias e poderiam justificar esta aquisição.

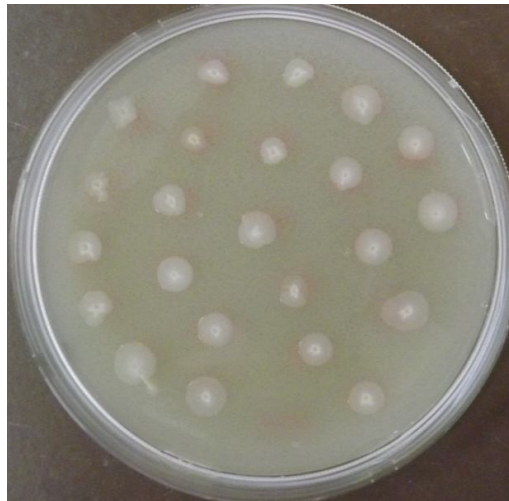


Figura 21: Meio seletivo para determinação da capacidade de solubilização de fosfato inorgânico pelos isolados bacterianos.

Meio contendo fosfato insolúvel (turvo). Bactérias capazes de solubilizar fosfato formam um halo claro ao redor de sua colônia. Embora as bactérias tenham crescido, nenhuma foi capaz de solubilizar fosfato.

O fósforo é um dos nutrientes mais importantes para as plantas, sendo um componente integral de um grande número de compostos importantes presentes nas células, incluindo nucleotídeos do metabolismo energético, ácidos nucleicos, fosfolipídios de membrana, entre outros. Portanto, a deficiência deste elemento na planta compromete de forma geral todo seu metabolismo, causando uma severa redução na produção (BARROSO, C. B., 2006).

Este elemento está pouco disponível para as plantas devido a sua interação química com cátions no solo, principalmente alumínio e ferro. Bactérias capazes de solubilizar fosfato auxiliam nessa disponibilização desse elemento. Como não foi encontrada nenhuma bactéria capaz de solubilizar fosfato, a própria planta poderia utilizar de outros artifícios para obter esse íon.

O íon fosfato presente na solução do solo é absorvido pelas raízes por difusão, o que cria uma região de depleção deste elemento na interface solução do solo/superfície radicular. Para restaurar novamente o equilíbrio da solução do solo, ocorre uma desorção do fósforo lábil associado a micelas de argila do solo. As plantas podem tornar este processo mais eficiente aumentando a sua superfície radicular e/ou melhorando, a nível celular, a eficiência de absorção deste elemento. Esta informação corrobora a produção de AIA pelos isolados. A absorção do íon fosfato para o interior das células da raiz se dá exclusivamente por intermédio de proteínas transportadoras associadas à membrana plasmática (BARROSO, C. B., 2006).

Produção de ácido cianídrico (HCN)

Poucas bactérias apresentaram capacidade de produzir ácido cianídrico (Figura 22). Trata-se de um método qualitativo, entretanto foi criada uma escala com base nos resultados obtidos, na qual se pode ver a variação de intensidade ligada a variação da produção de HCN (Figura 23)

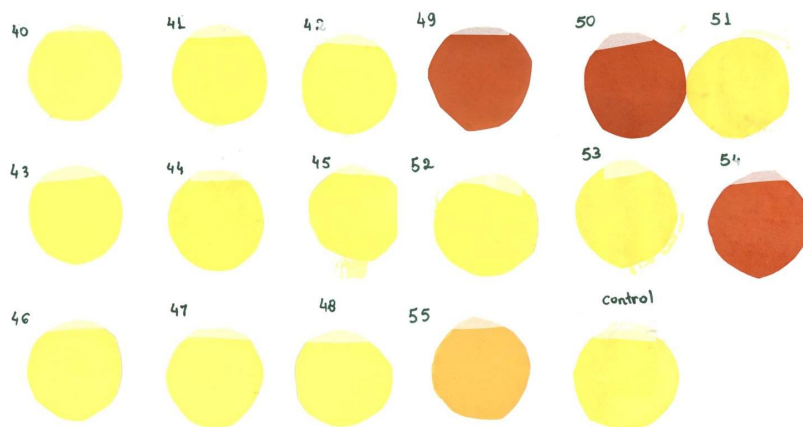


Figura 22: Resultado qualitativo do potencial de produção de HCN pelos isolados bacterianos.

Papel filtro embebido com uma solução de ácido pícrico 5% e NaCO_3 2%, retirado da tampa da placa de Petri após 4 dias de crescimento da bactéria. A mudança de coloração do papel filtro de amarelo para marrom indica a produção de HCN.

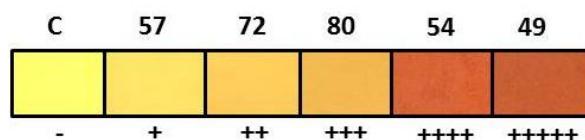


Figura 23: Escala colorimétrica baseada nos resultados encontrados

O sinal + indica o grau crescente na qualificação de produção de HCN pelos isolados bacterianos.

O HCN, metabólito derivado do metabolismo de glicina, além de apresentar propriedades inibidoras de patógenos, também pode promover o crescimento das plantas diretamente, aumentando o desenvolvimento dos pelos radiculares (LUZ, 1996). Tal fato pode justificar, junto ao AIA, o grande número de pelos radiculares da hospedeira de *Langsdorffia hypongaea*.

A glicina pode ser encontrada nos exsudatos radiculares de muitas plantas e poderia provavelmente estar disponível na rizosfera como um precursor para a síntese de HCN por rizobactérias (COELHO, 2006). Isto também é corroborado pelo presente trabalho, uma vez que o maior número de bactérias produtoras de HCN foi obtido da rizosfera.

Produção de ácido indol acético (AIA)

Mais de 80% dos isolados foram capazes de produzir o hormônio AIA em diferentes concentrações (Figura 24). Da mesma forma que para o HCN, fez-se uma escala baseada nos resultados obtidos, na qual se pode ver a variação de intensidade ligada à variação da produção de AIA (Figura 25).



Figura 24: Resultado qualitativo do potencial de produção de AIA pelos isolados bacterianos.

Papel filtro saturado com solução Salkowski após 30 minutos. Os três últimos círculos são controles. A mudança de coloração indica a produção do hormônio AIA.

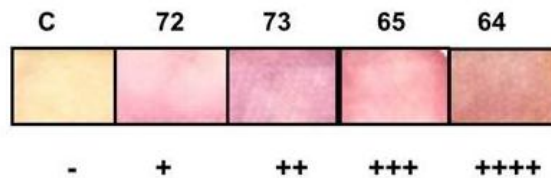


Figura 25: Escala colorimétrica baseada nos resultados encontrados

O sinal + indica o grau crescente na qualificação de produção de AIA pelos isolados bacterianos.

O ácido indol acético é produzido pelas plantas. Entretanto algumas bactérias apresentam a capacidade de produzi-lo. Este hormônio é conhecido por produzir tanto respostas rápidas (aumento da elongação celular) como lentas (divisão e diferenciação celular) (Dobbelaere et al., 2003).

Essas bactérias podem apresentar grande importância no modelo de estudo proposto, uma vez que se trata de uma holoparasita, incapaz de produzir este hormônio. Outro fator que vale ressaltar é que os solos da região de canga são muito duros, o que faz com que crescimento das raízes seja superficial. O hormônio AIA aumenta as ramificações dessas raízes e ajuda a melhorar a captação de nutrientes do solo.

Produção das enzimas amilase, celulase, protease e pectinase

Dentre todos os isolados, 9 foram capazes de produzir amilase e 30 foram capazes de produzir celulase. Nenhum deles produziu protease ou pectinase. Os isolados produtores de amilase estão predominantemente na rizosfera, ao passo que os produtores de celulase estão dispersos entre *Langsdorffia hypogaea*, hospedeira e rizosfera (Figura 26).

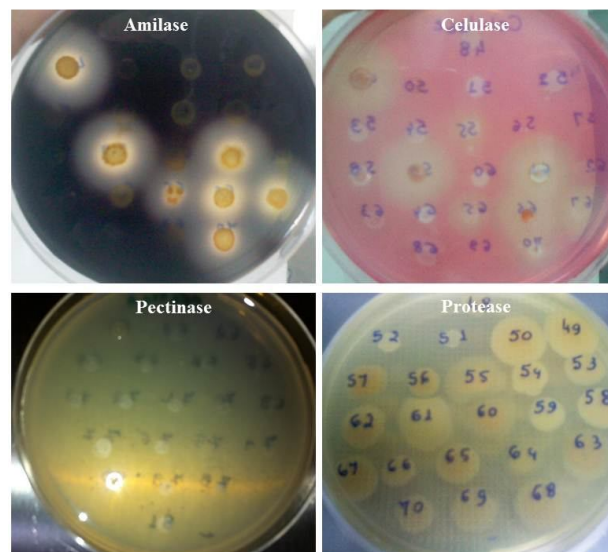


Figura 26: Testes enzimáticos de produção de amilase, celulase, pectinase e protease.

A formação de alo indica a capacidade do isolado bacteriano de produção de determinada enzima. Os testes de amilase e celulase mostram claramente a formação de alo, enquanto os testes de pectinase e protease deram todos negativos.

O objetivo da busca por microrganismos produtores dessas enzimas foi pautado na sua importância biotecnológica. Entretanto, especula-se também, num contexto ecossistêmico, a importância da produção dessas enzimas na interação entre a *Langsdorffia hypongaea*, sua hospedeira e a rizosfera.

Como importância biotecnológica as enzimas são utilizadas em larga escala nas indústrias têxtil (amilase, celulase, pectinase), detergente (celulase, protease), couro (protease) e de alimento (pectinase, amilase, protease) (KIRK, O, 2002 e VAN BEILEN, J.B.,2002), entre outras.

Do ponto de vista ecológico, a produção de amilase por microrganismos auxilia na quebra do principal polissacarídeo de reserva dos vegetais, o amido (LIN, L. L et al., 1997). As pectinases formam um grupo de enzimas que degradam substâncias pécicas, hidrolisando ligações glicosídicas ao longo da cadeia carbônica (UENOJO M.E.; PASTORE, G. M. 2007) e aumentando a disponibilidade energética da planta.

As enzimas proteolíticas produzidas por microrganismos podem atuar na hidrólise de proteínas da membrana e da parede celular de plantas hospedeiras, facilitando a penetração e a infecção (TREMACOLDI, C. R, 2009). Entretanto, em nossas análises nenhum isolado apresentou atividade de protease, e poderiam ser refeitos com devidas modificações de protocolo para confirmar o resultado obtido.

Os resultados de todos os testes bioquímicos estão apresentados de forma completa na forma de planilha (ANEXO I). A figura 27 representa os mesmos resultados, porém de forma gráfica. Foram excluídos os testes de solubilização de fosfato, protease e pectinase da representação uma vez que nenhum dos isolados apresentou resultado positivo para essas características.

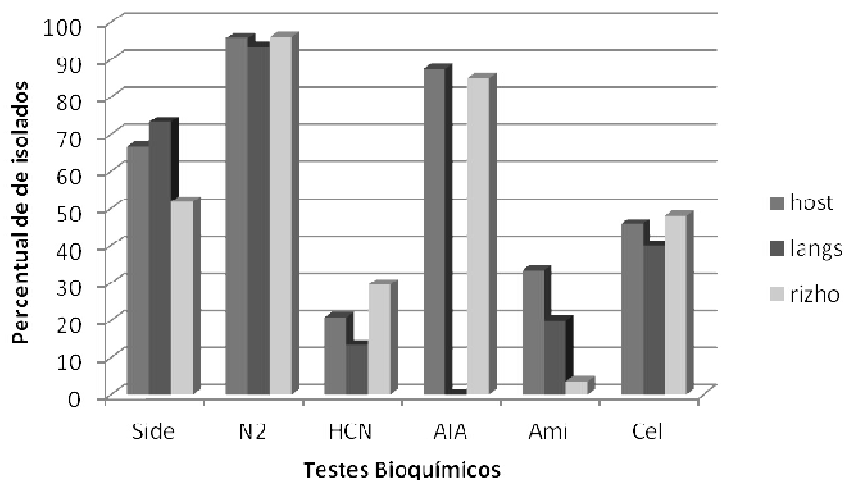


Figura 27: Representatividade percentual dos isolados quanto aos resultados dos testes bioquímicos.

Testes bioquímicos de produção de sideróforos, fixação de N₂, produção de HCN, AIA, amilase e celulase dos isolados nas três partes do modelo de estudo.

Ensaio de atividade antimicrobiana

Na busca por moléculas com ação antibiótica testou-se o sobrenadante, resultante da centrifugação dos isolados em meio de cultura, contra *S. aureus*, *B. cereus*, *K. pneumoniae*, *S. flexnerie* e *X. citri subsp. citri*. Entretanto, nenhum isolado apresentou atividade inibitória contra esses organismos alvos (Figura 28). Acredita-se que houve falhas na experimentação, logo os resultados negativos não refletem a não capacidade de produção destas enzimas.

A primeira possível falha experimental está associada ao tempo de crescimento das bactérias. Após 20 dias as amostras contendo bactérias isoladas foram centrifugadas e esta análise desencadeada. Esse número foi baseado na metodologia para fungos, entretanto a taxa de crescimento de fungos e bactérias é muito diferente. Corrido os 20 dias, as bactérias provavelmente morreram e entraram em processo de lise, sendo destruídas ou inativadas quaisquer enzimas com potencial inibitório para as cinco bactérias alvos. Outro fator que pode ter desencadeado este efeito negativo sistêmico é a não utilização de um método prévio de extração de macromoléculas com este potencial inibitório de crescimento microbiano. A metodologia utilizada é menos criteriosa e

possivelmente influenciou no resultado. Os testes de atividade antimicrobiana serão refeitos modificando as propostas para que estas possibilidades de erro sejam anuladas.

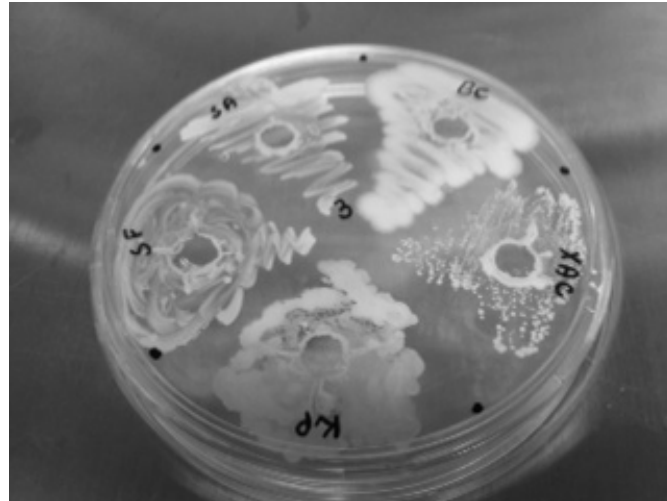


Figura 28: Análise do perfil de ação antibiótica dos isolados contra cinco tipos de bactérias alvo.

Um dos isolados (13) testados contra as cinco bactérias alvos *S. aureus* (SA), *B. cereus* (BC), *K. pneumoniae* (KP), *S. flexnerie* (SF) e *X. citri subsp. Citri* (XAC). Não houve qualquer tipo de inibição no crescimento dos organismos alvos.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho representam o primeiro estudo de microbiota associados ao modelo de interação parasitária entre *Langsdorffia hypogaea* (holoparasita), sua hospedeira, bem como a rizosfera no entorno desse complexo.

- Foram encontrados fungos da classe *Zygomycetes* e dos gêneros *Penicillium*, *Acremonum*, além das leveduras;
- Foram encontradas bactérias da família *Enterobacteriaceae* e dos gêneros *Bacillus*, *Enterobacter*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus*, *Serratia*, *Actinomycetale*, *Klebsiella*, *Ewingella*, *Citrobacter*, *Pseudomonas*, *Viridibacillus*, além de bactérias não cultivadas e uma bactéria que não apresentou similaridade com outros isolados, cujas sequencias estão depositadas em bancos de dados. Análises mais robustas precisam ser feitas, mas pode ser considerado um novo organismos em potencial;
- Mais de 80% dos isolados tiveram crescimento em meio sem nitrogênio, demonstrando o potencial diazotrófico destes isolados, justificando a importância ecológica destes e seus respectivos nichos;
- Todos os isolados foram capazes de produzir íon amônio (em diferentes concentrações). Isto poderia justificar em parte o pH ácido do solo como também a importância destes isolados em seus respectivos nichos;
- Mais de 50% dos isolados são capazes de produzir sideróforo. Isto também condiz com o ambiente de vida destes organismos, já que os solos da região são ricos em ferro no estado insolúvel.
- Nenhum isolado foi capaz de solubilizar fosfato;
- Poucas bactérias apresentaram capacidade de produzir ácido cianídrico. Mais de 80% dos isolados foram capazes de produzir o hormônio AIA. Como este hormônio auxilia no processo de aumento radicular, isso poderia justificar a adaptação das plantas destes nichos e solo extremamente duro que propicia uma ramificação superficial das raízes dos vegetais.

- 9 isolados foram capazes de produzir amilase e 30 capazes de produzir celulase. Nenhum deles produziu protease e pectinase;
- Nenhum isolado apresentou atividade inibitória contra *S. aureus*, *B. cereus*, *K. pneumoniae*, *S. flexnerie* e *X. citri subsp. citri*

A figura 29 sumariza a importância da microbiota associada ao modelo de estudo com base em nossos estudos, demonstrando as possíveis trocas existentes para que as espécies possam se adaptar neste ecossistema. Representa a relação de permuta entre planta e solo, a ecologia microbiana envolvida (benéfica, maléfica ou comensal) e a troca entre as duas plantas, holoparasita e hospedeira.

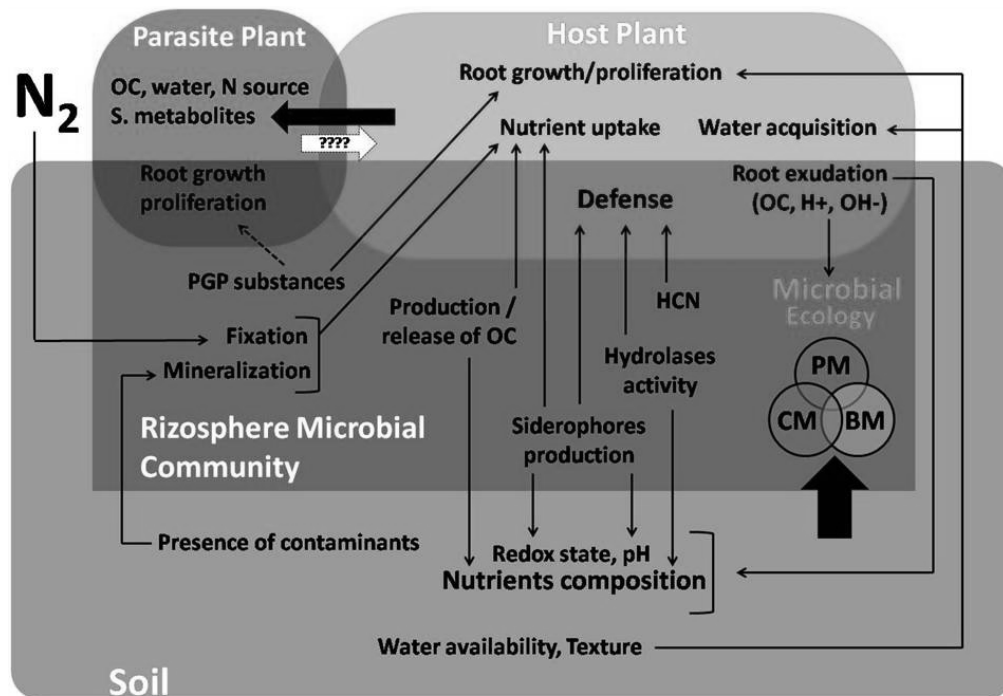


Figura 29: Representação esquemática das relações entre *Langsdorffia hypongaea* (holoparasita), sua hospedeira, rizosfera e microrganismos.

Classicamente, plantas holoparasitas retiram todos os nutrientes necessários da sua planta hospedeira (NICKRENT, 2002). Os resultados deste trabalho mostram que a microbiota existente na planta holoparasita também lhe beneficia fornecendo nutrientes essenciais para sua sobrevivência. Tal fato embora contrarie esta perspectiva, esclarece que o estudo mais aprofundado de microbiota associada a estas plantas, estudo este ainda negligenciado, poderia melhorar a compreensão biológica acerca destas plantas.

Outro questionamento sobre a relação entre hospedeira e parasita é que, em teoria, a holoparasita não fornece nenhum benefício a planta que hospeda. O presente trabalho mostra a possibilidade de existirem microrganismos comuns entre *Langsdorffia hypongaea* (holoparasita), sua hospedeira e a rizosfera e questionamos se essa troca de microrganismos pode ser da parasita em direção a hospedeira e de forma indireta estar beneficiando a sua hospedeira fornecendo microrganismos produtores de elementos importantes para o crescimento e desenvolvimento da planta (Figura 24).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O conhecimento da diversidade endofítica e do solo são importantes não só para a compreensão da ecologia da comunidade de microrganismos como também para a inovação de aplicabilidade biotecnológica e de produtividade e manejo de culturas de interesse agrônômico.

Uma das aplicações ligadas a produtividade e manejo de culturas agrônômicas está na substituição dos agroquímicos por microrganismos capazes de promover o controle de pragas e o crescimento vegetal. Os pesticidas químicos têm sido usados na agricultura há tempos, (GRIGOLETTI JUNIOR *et al.*, 2000). Além de seus riscos para a saúde humana, causam fortes desequilíbrios no ambiente, destruindo os inimigos naturais das diferentes pragas de culturas nas áreas em que são utilizados (MEDEIROS *et al.*, 2006). O controle químico pode causar danos na microbiota benéfica das plantas, além de frequentemente deixar resíduos no ambiente (ETHUR *et al.*, 2007) e nos alimentos. O ideal seria empregar produtos de baixa toxicidade no controle dessas doenças, visando à minimização dos danos ao ambiente. A utilização de microrganismos com ação de biocontrole e/ou promoção de crescimento vem sendo apontada como alternativa viável para sistemas de produção agrícola ecológica e economicamente sustentável (SOUSA *et al.*, 2009).

Outras aplicabilidades biotecnológicas estão na produção de novas enzimas com utilidade em diferentes indústrias e a descoberta de novos antibióticos de interesse à saúde. A busca de novos microrganismos de interesse aplicado partindo modelos de estudo negligenciados se torna uma potencial fonte, uma vez que a complexidade ecossistêmica é geneticamente refletida.

PERSPECTIVAS

Pretende-se refazer os testes antimicrobianos uma vez que não foram feitos em condições apropriadas. A ideia é criar uma plataforma de testes antimicrobianos, bem como uma biblioteca de isolados nas dependências da UFOP, já que o grupo de pesquisa busca ir à fundo nos estudos de bioprospecção de microrganismos.

A nova proposta é expandir as metodologias apresentadas neste trabalho, assim como implementar novas plataformas de análise, para outras plantas endêmicas da região do Quadrilátero Ferrífero (QF). As vegetações associadas a afloramentos rochosos no Brasil apresentam-se como formações únicas, com diversas peculiaridades e altas taxas de endemismos e de raridade e é destacada maior vulnerabilidade a biota associada aos afloramentos de canga do QF, área de intensa mineração (JACOOBI e O CARMO, 2012). Está se perdendo não só espécies vegetais únicas como também possivelmente microrganismos não conhecidos e com potencial biotecnológico.

Diante dos resultados obtidos e da proposta de dar continuidade aos estudos, acreditamos contribuir na área de desenvolvimento biotecnológico.

Referências Bibliográficas

- ALMEIDA, C.V.D.; YARA, R. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada *in vivo* e *in vitro*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 2005, (1):467-470.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990, 215:403-410.
- ALVES, S. B.; MOINO JR, A; ALMEIDA, J. E. M. Desenvolvimento, potencial de uso e comercialização de produtos microbianos. *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba. cap.40, p.1143-1163,1998.
- AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology Review*. Washington, DC, v. 59, n. 1, p. 143-169, 1995.
- AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.) *Ecologia microbiana*. Jaguariúna: EMBRAPA, p. 117-137,1998.
- AZEVEDO, J.L.; ARAUJO, W.L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B.N.; DESHMUKH, S.K. (Ed.) *Fungi: multifaceted microbes*. Boca Raton: CRC Press, chap.6, p.189-207, 2007.
- BAILLY A.; WEISSKOPF, L. The modulating effect of bacterial volatiles on plant growth: Current knowledge and future challenges. *Plant Signaling & Behavior*. v.7:1, p.1-7, 2012.
- BAKKER, A.W.; SCHIPPERS, B. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp-mediated plant growth-stimulation. *Soil Biology and Biochemistry*. Oxford, v.19, p.451-457, 1987.
- BARRETTI, P. B.; SOUZA, R. M.; POZZA, E. A. Bactérias endofíticas como agentes promotores do crescimento de plantas de tomateiro e de inibição *in vitro* de *Ralstonia solanacearum*. *Ciência agrotécnica*. Lavras, v. 32, n. 3, p. 731-739, 2008.

- BARROSO, C. B. Produção de pellets livres e imobilizados e mecanismo de solubilização de fosfatos inorgânicos por *Aspergillus Níger*. Jaboticabal, 2006.
- BAYER, E. A.; CHANZYT, H.; LAMED, R. E SHOHAM, Y. Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Current Opinion in Structural Biology*. v. 8, p. 548-557, 1998.
- BENITE, A.M.; MACHADO, S.P.; MACHADO, B.C. Sideróforos: Uma resposta dos microrganismos. *Quimica Nova*. São Paulo, v.25, n.6B. p.1155-1164, 2002.
- BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*. v. 18, p. 355-383, 2000.
- BONFANTE, P.; ANCA, I.A.; Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions. *Annu Rev Microbiol*. 2009, 63:363-83.
- BRAUD, A.; JEZEQUEL, K.; LEGER, M.A.; LEBEAU, T. Siderophore production by using free and immobilized cells of two pseudomonads cultivated in medium enriched with Fe and/or toxic metals (Cr, Hg, Pb). *Biotechnology and Bioengineering*. New York, v.94, p.1080-1088, 2006.
- BRAZELTON, J.; PFEUFER, E.; SWEAT, T. T.; MCSPADDEN GARDENER, B.; COENEN, C. 2,4-Diacetylphloroglucinol alters plant root development. *Mol. Plant Microbe Interact*. 2008, 21:1349–1358.
- BRIC, J.M.; BOSTOCK, R.M.; SILVERSTONE, S.E. Rapid *in situ* assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology*. Washington, v.57, p.535-538, 1991.
- CARVALHO, 2012- Comunicação oral.
- CATTELAN, A. J. Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal. Londrina: Embrapa Soja, 1999.
- COELHO L. F. Interação de *Pseudomonas* spp. e de *Bacillus* spp. com diferentes rizosferas. Campinas, 2006.
- COSTACURTA, A.; VANDERLEYDEN, J.; Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Crit. Rev. Microbiol*. 1995. 21:1–18.
- CURL, E.A. The rhizosphere: relation to pathogen behavior and root disease. *Plant Disease*. v.66.p.624-630, 1982.

- DAVIES, J. What are antibiotics? Archaic functions for modern activities. *Molecular microbiology*. Oxford, v.4, p.1227-1232, 1990.
- DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*. v.22, p.107-149, 2003.
- DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: endophytic N₂ fixing bacteria. *Ciência e Cultura*. 1992, 44(5): 310-313
- DONADIO, S.; MONCIARDINI, P.; ALDUINA, R.; MAZZA, P.; CHIOCCHINI, C.; CAVALETTI, L.; SOSIO, M.; PUGLIA, A.M. Microbial Technologies for the Discovery of novel bioactive metabolites. *Journal of Biotechnology*. Amsterdam, v.99, p.187-198, 2002.
- DOS SANTOS, T. T.; VARAVALLO, M. A. Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. Araguaína, TO, Brasil. 2011.
- DOUMBOU, C. L.; SALOVE, M. K. H.; CRAWFORD, D. L.; BEAULIEU, C. Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and promote plant growth. *Phytoprotection*. Quebec, v. 82, p. 85-102, 2001.
- DUBEY, S.K.; TRIPATHI, A.K.; UPADHYAY, S.N. Exploration of soil bacterial communities for their potencial as bioresource. *Bioresource Technology*. New York, v.97, p.2217-2224, 2006.
- ETHUR, L. Z.; BLUME, E.; MUNIZ, M. F. B.; FLORES, M. G. V. Seleção de antagonistas fúngicos a *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* em substrato comercial para mudas. *Ciência Rural*. Santa Maria, v. 37, n. 6, p. 1794-1797, 2007.
- FEDRIZZI, S. M. G. Produção de metabólitos antimicrobianos e sideróforos isolados provenientes de Terra Preta Antropogênica da Amazônia Ocidental. Piracicaba, 2006.
- FIGUEIREDO, M. V. B.; SOBRAL, J. K.; STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M. Microrganismos promotores do crescimento de plantas. *Biotechnologia aplicada à agricultura: textos de apoio e protocolos experimentais, cap.1, p.385-414*, Embrapa Informação Tecnológica Brasília, DF. Instituto Agrônômico de Pernambuco Recife, 2010.

- FORNASIERI FILHOR, D. A cultura do milho. Funed: Jaboticabal, 1992.
- FREITAS, L. S. Inflorescências da holoparasita de raízes *Langsdorffia hypogaea* (Balanophoraceae) como recurso chave para uma fauna generalista na estação seca. Ouro Preto, MG. 2012.
- FUENTE, J. M.; RODRÍGUEZ, V. R.; PONCE, J. L. C.; ESTRELLA, L. H. Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *Science*. 1997, 276:1566-1568.
- GERHARDSON, B. Biological substitutes for pesticides. *Trends in Biotechnology*. Cambridge, V.20, p.338-343, 2002.
- GNANIMANICAKAM, S. Biological control of crop diseases. *Springer*. New York, NY. 2002.
- GODFREY, T.; S.WEST. Industrial enzymology, (2.ed.). *Macmillan Publishers Inc*. New York, p.609, 1996.
- GOMES, D. N. F. Diversidade e potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados do manguezal barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco. 2007.
- GONÇALVES, A. Z. E DINIZ, S. Diversidade de Interações Micróbio-Planta e Processos Ecosistêmicos. *Revista de Pós-Graduação da Unicamp*. Campinas, 2008.
- GRIGOLETTI JUNIOR, A.; SANTOS, A. F.; AUER, C. G. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. *Floresta*, v. 30, n. 0, p. 155-165, 2000.
- HARSH, P. B.; WEIR, T. L.; PERRY, L. G.; GILROY, S.; VIVANCO, J. M. The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms. *The Annual Review of Plant Biology*. 2006, 57:233–66.
- HASEGAWA, S.; MEGURO, A.; SHIMIZU, M.; NISHIMURA, T.; KUNOH, H. Endophytic actinomycetes and their interactions with host plants. *Actinomycetologica*, Tokyo, JP, v. 20, p. 72-81, 2006.
- HIMMEL, M. E.; RUTH, M. F. E WYMANS, S. E. Cellulase for commodity products from cellulosic biomass. 1999.

- HIRSCH A.M.; BAUER, W.D.; BIRD, D.M.; CULLIMORE, J.; TYLER, B.; YODER, J.I. Molecular signal sand receptors: controlling rhizosphere interactions between plants and other organisms. *Ecology*. 2003, 84:858–68.
- HSIAO, S. C.; MAUSETH, J. D.; GOMES, L. D. Growth and Anatomy of the vegetative body oh the parasitic angiosperm *Langsdorffia hypogaea* (Balanophoraceae). *Bulletin of the Torrey Botinical Club* 121 (1): 24-39. 1994
- JACOOBI, M.C.;DO CARMO, F.F. Diversidade florística nas cangas do Quadrilátero Ferrífero. *Código Editora*. Belo Horizonte, 2012
- KATZNELSON, H.; BOSE, B. Metabolic activity and phosphate-dissolving capability of bacterial isolates from wheat roots, rhizosphere, and non-rhiposphere soil. *Canadian Jornal of Microbiology*. Ottawa, v.5, p.79-85, 1981.
- KIM, K. Y.; JORDAM, D.; MCDONALD, G.A. Effect of phosphate-solubilizing bacterial and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Byology and Fertility of Soils*. Berlin, v.26, p.79-87,1998.
- KIM, Y.C.; LEVEAU, J.; MCSPADDEN GARDENER, B. B.; PIERSON, E. A.; PIERSON, L. S. RYU, C.M. The multifactorial basis for plant health promotion by plant-associated bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. p. 1548–1555 v. 77, No. 5, 2011.
- KIRK, O.; BORCHERT, t.V.; FUGLSANG, C.C. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in biotechnology*. v. 13, n. 4, p. 345-351, 2002.
- KOLTER, R.; MORENO,F. Genetics of ribosomally synthesized peptide antibiotics. *Annual Review of Microbiology*. Palo Alto, v.46, p.141-163, 2004
- LIN, L. L.; HSU, W. H.; CHU, W. S. A gene encoding for an a-amylase from thermophilic *Bacillus* sp. Strain TS-23 and its expression in *Escherichia coli*. *J. Appl. Microbiol.*, v. 82, n. 3, p. 325-334, 1997.
- LODEWYCKX, C.; VANGRONSVELD, J.; PORTEOUS, F.; MOORE, E. R. B.; TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M.; LELIE, D. V. Endophytic bacteria and their potential applications. *CriticalReviews in PlantSciences*, Colchester. v. 21, p. 583-606, 2002.
- LORENZI H. Botânica Sistemática - Guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. *Plantarum*. Nova Odessa, 2005.

- LUCA, DE N. G.; WEXLER, M., PEREIRA, M.J., YEOMAN, K.H.; JOHNSTON, A.W.B. Is the *fur* gene of *Rhizobium leguminosarum* essential? *FEMS Microbiology Letters*. Amsterdam, v.168, p.289-295, 1988
- LUZ, W. C. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*. v.4, p.1-50, 1996.
- MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P.; DONATO, V. M. T. S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*. Recife, v. 1, p.89-111, 2004.
- MEDEIROS, M. A.; VILELA, N. J.; FRANÇA, F. H. Eficiência técnica e econômica do controle biológico da traça-do-tomateiro em ambiente protegido. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 24, n. 2, p. 180-184, 2006.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e bioquímica do solo. (2.ed.) Lavras: UFLA, p.729, 2006.
- MYERS, N. Environmental services of biodiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Washington, DC, v. 93, p. 2764-2769, 1996.
- NAVARRO, P. Solo e topografia como condicionantes da distribuição da vegetação em fitofisionomias campestre e florestal em contato direta Serra da Brígida, Ouro Preto, MG. 2013.
- NEILANDS, J.B. Siderophores – structure and function of microbial iron transport compounds. *Journal of Biological Chemistry*. Baltimore, v.270, p.26723-26726, 1995
- NEILANDS, J.B. Siderophores of bacteria and fungi. *Microbiological Sciences*. Oxford, v.1, p9-14, 1984
- NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Ecologia das bactérias diazotróficas nos solos tropicais. In: MELO, I. S; AZEVEDO, J. L. (Ed.). *Ecologia microbiana*. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, cap. 1, p. 15-60,1998.
- NICKRENT, D. L. Parasitic Plants of the World. p. 7-27 In: LÓPEZ-SÁEZ, J. A.; CATALÁN, P.; SÁEZ, L. (eds), Parasitic Plants of the Iberian Peninsula and Balearic Islands. 2002.

- OLIVEIRA-FILHO, A.T.; FONTES, M.A.L. Patterns of Floristic Differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the Influence of Climate. *Biotropica*, 2000. 32:793–810.
- O'SULLIVAN, D. J.; O'GARA, F. Traits of Fluorescent *Pseudomonas* spp. Involved in Suppression of Plant Root Pathogens. *Microbiological Reviews*, p. 662-676 1992.. ID:0146-0749/92/040662
- PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C.R.; SOCCOL, V.T.; SINGH, D.; MOHAN, R. Advances in Microbial Amylases. *Biotechnology Applied and Biochemical*. 2000. 31:135–152.
- PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; CAETANO, L. C. Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, Santiago, v. 3, n. 4, p.69-72, 2004.
- RAMAMOORTHY, V.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRAKASAM, V.; SMAIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protection*, Surrey, v. 20, n. 1, p. 1-11, 2001.
- RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of peptidases. *Biochemistry Journal*, v. 290, p. 205-218, 1993.
- RENNIE, R.J. A single médium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.27,p.8-14, 1981
- RODRÍGUES, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, v.17,p.319-330, 1999.
- RODRIGUEZ-DIAZ, M.; RODELES-GONZALES, B.; POZO-CLEMENTE, C.; MARTINEZ- TOLEDO, M. V.; GONZALEZ-LOPEZ, J.. A review on the taxonomy and possible screening of traits of plant growth promoting rhizobacteria, p. 55– 80. In I. Ahmad, J. Pichtel, and S. Hayat (ed.), *Plant bacteria interactions, strategies and techniques to promote plant growth*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany. 2008.

- ROSA, L.H.; VAZ, A.B.M.; CALIGIORNE, R. B.; CAMPOLINA, S.; ROSA, C.A. Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv. (*Poaceae*). *Polar Biol*, v. 32, p. 161–167, 2009.
- ROSIÈRE, C.A.; CHEMALE JR, F. Itabiritos e minérios de ferro de alto teor do quadrilátero ferrífero uma visão geral e discussão geonomos. 2000. 8 (2): 27-43
- RUEGGER, M. J. S.;TAUK-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, n. 2, p. 205-211. 2004.
- SCHWYN, B.; NEILANDS, B. Universal Chemical Assay for the Detection and Determination of Siderophores. California,1986.
- SENTHILKUMAR, M.; GOVINDASAMY, K. Annapurna role of antibiotics in suppression of charcoal rot disease by soybean endophyte *Paenibacillus* sp. HKA-15. *Current Microbiology*. New York, v.55, p.25-29, 2007.
- SIKORA, R.A. Nuevas tecnologías para mejorar la salud de las raíces y aumentar la producción de los cultivos. *Tropical Agriculture*. 2000.13(2):25-29.
- SILVA, J. R. C.; SOUZA, R. M.; ZACARONE, A. B.; SILVA, L. H. C. P.; CASTRO, A. M. S. Bactérias endofíticas no controle e inibição *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv *tomato*, agente da pinta bacteriana do tomateiro. *Ciência e agrotecnologia*, Lavras, v. 32, n. 4, p. 1062-1072, 2008.
- SMITH, S. E.; JAKOBSEN, I.; GRONLUND, M.; SMITH, F. A. Roles of Arbuscular Mycorrhizas in Plant Phosphorus Nutrition: Interactions between Pathways of Phosphorus Uptake in Arbuscular Mycorrhizal Roots Have Important Implications for Understanding and Manipulating Plant Phosphorus Acquisition Plant Physiology. *American Society of Plant Biologists*.Australia,v. 156, p. 1050–1057. 2011.
- SOTTERO, A. N. Colonização radicular e promoção de crescimento vegetal por rizobactérias. Campinas, 2003.
- SOUSA, C. S.; SOARES, A. C. F.; GARRIDO, M. S. Produção de mudas de tomateiro em substrato orgânico inoculado e incubado com estreptomicetos. *Bragantia*, Campinas, v. 68, n. 1, p. 195-203, 2009.
- SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* 2007. 31:425–448.

- STRAUSS, M.L.A.; JOLLY, N.P.; LAMBRECHTS, M.G.;VAN RESEMBURG,P.
Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-Saccharomyces wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*. 2001. 91, 182–190.
- TERRÔLA, M. Composição florística e distribuição vertical de epífitas vasculares sobre indivíduos de *Guapira opposita* (vell.) Reitz (*Nyctaginaceae*) em um fragmento florestal na Serra da Brígida, Ouro Preto, MG, 2011
- THOMASHOW, L.S.; WELLER, D.M.; BONSALL, R.F. Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent pseudomonas species in the rhizosphere of wheat. *Applied and Environmental Microbiology*. Baltimore, v.56, p.908-912, 1990
- TILMAN, D. Biodiversity: population versus ecosystem stability. *Ecology*,1996. 77:350-365
- TREMACOLDI, C. R. Proteases e inibidores de proteases na defesa de plantas contra pragas Belém, Embrapa Amazônia Oriental, 2009.
- TRIPATHI, M.; MUNOT, H. P; SHOUCHE, Y.; MEYER, J.M.; GOEL, R. Isolation and functional characterization of siderophore-producing lead and cadmium-resistant *Pseudomonas putida* KNP9. *Current Microbiology*. New York, v.50, p.233-237, 2005.
- UENOJO M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. *Quim. Nova*. Campinas v. 30, No. 2, 388-394, 2007.
- VALUEVA, T. A.; MOSOLOV, V. V. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. *Biochemistry*. Moscow, v. 69, n. 11, p. 1305-1309, 2004.
- VAN BEILEN, J.B. Enzyme technology: an overview. *Current Opinion in biotechnology*, v. 14, n. 4, p. 338-344, 2002.
- VELOSO, H. P.; RANGEL FILHO, A. L.; LIMA, J. C. A. Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal. IBGE, Rio de Janeiro, 1991.
- WELLER, D. M.; RAAIJMAKERS, J. A.; MCSPADDEN GARDENER B. B.; THOMASHOW.L. S. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40:309–348. 2002.

- WIRÉN, V.N.; MERRICK M. Regulation and function of ammonium carriers in bacteria, fungi, and plants. *Topics in Current Genetics*. E. BOLES, R. KRÄMER (Eds.): Molecular Mechanisms Controlling Transmembrane Transport. 2004
- XU, J. Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances. *Molecular Ecology*. New York, v.15, p.1713-1731, 2006.

ANEXOS

Anexo I

Síntese dos resultados encontrados para os testes bioquímicos relacionados para cada um dos isolados identificados

Isolado	Origem	Amônia	Sideróforc	Fix. N ₂	HCN	AIA	Amilase	Celulase
1	Langs	0,69	● 1	● 1	○ 0	◐ 2	● 0	● 1
2	Langs	0,742	● 1	● 1	○ 0	◐ 1	● 0	● 1
3	Langs	0,664	● 1	● 1	○ 0	◐ 1	● 0	● 1
4	Langs	0,754	● 1	● 1	○ 0	◐ 3	● 0	● 0
7	Langs	0,565	● 1	● 0	○ 0	◐ 3	● 0	● 0
8	Langs	0,593	● 1	● 1	○ 0	◐ 2	● 0	● 0
9	Langs	0,492	● 1	● 1	○ 0	○ 0	● 0	● 0
10	Langs	0,508	● 1	● 1	○ 0	◐ 2	● 0	● 0
11	Langs	0,657	● 1	● 1	◐ 2	◐ 3	● 0	● 0
12	Langs	0,449	● 1	● 1	○ 0	◐ 3	● 0	● 1
13	Langs	0,687	● 0	● 1	○ 0	◐ 3	● 0	● 1
16	Langs	0,56	● 0	● 1	○ 0	◐ 3	● 0	● 0
17	Langs	0,642	● 1	● 1	◐ 3	○ 0	● 0	● 1
18	Langs	0,53	● 0	● 1	○ 0	◐ 3	● 0	● 0
28	Langs	0,664	● 0	● 1	○ 0	◐ 1	● 0	● 0
23	Rizo	0,472	● 0	● 1	○ 0	● 4	● 0	● 0
25	Rizo	0,769	● 0	● 1	◐ 2	◐ 1	● 0	● 1
26	Rizo	0,666	● 0	● 1	○ 0	◐ 1	● 0	● 1
27	Rizo	0,841	● 0	● 1	◐ 1	◐ 1	● 0	● 0
30	Rizo	0,612	● 1	● 1	○ 0	◐ 1	● 0	● 1
31	Rizo	0,588	● 1	● 1	○ 0	◐ 2	● 0	● 0
33	Rizo	0,536	● 0	● 1	○ 0	◐ 2	● 0	● 0
34	Rizo	0,524	● 1	● 0	○ 0	○ 0	● 0	● 0
35	Rizo	0,34	● 1	● 1	○ 0	◐ 2	● 0	● 0

36	Rizo		0,641	● 0	● 1	○ 0	◐ 2	● 0	● 1
37	Rizo		0,615	● 1	● 1	○ 0	◐ 2	● 0	● 1
38	Rizo		0,474	● 1	● 1	○ 0	◐ 2	● 0	● 1
39	Rizo		0,674	● 0	● 1	○ 0	◐ 2	● 0	● 0
40	Rizo		0,446	● 0	● 1	○ 0	● 4	● 0	● 0
41	Rizo		0,638	● 0	● 1	◐ 2	◐ 2	● 0	● 1
42	Rizo		0,631	● 0	● 1	● 5	◐ 2	● 0	● 1
43	Rizo		0,573	● 1	● 1	○ 0	◐ 2	● 0	● 1
44	Rizo		0,565	● 1	● 1	○ 0	◐ 2	● 0	● 0
45	Rizo		0,496	● 1	● 1	○ 0	◐ 2	● 0	● 1
46	Rizo		0,562	● 1	● 1	○ 0	◐ 3	● 0	● 0
47	Rizo		0,493	● 1	● 1	○ 0	○ 0	● 0	● 1
48	Rizo		0,48	● 1	● 1	◐ 2	○ 0	● 0	● 0
49	Rizo		0,435	● 0	● 1	● 5	○ 0	● 1	● 1
50	Rizo		0,36	● 0	● 1	● 5	◐ 1	● 0	● 0
51	Rizo		0,6	● 1	● 1	○ 0	◐ 2	● 0	● 1
52	Rizo		0,624	● 1	● 1	○ 0	◐ 2	● 0	● 0
54	Rizo		0,488	● 0	● 1	● 4	◐ 2	● 0	● 0
<i>Proteus</i>			0,727						

Isolado	Origem	Amônia	Sideróforc	Fix. N2	HCN	AIA	Amilase	Celulase
55	Hosp		● 1	● 1	◐ 2	◐ 1	● 0	● 1
56	Hosp		● 1	● 1	◐ 2	○ 0	● 0	● 0
57	Hosp		● 0	● 1	● 5	◐ 1	● 0	● 0
58	Hosp		● 1	● 1	○ 0	○ 0	● 0	● 1
59	Hosp		● 1	● 1	○ 0	◐ 1	● 1	● 1
60	Hosp		● 1	● 1	○ 0	○ 0	● 1	● 0
61	Hosp		● 1	● 1	○ 0	◐ 1	● 1	● 1
62	Hosp		● 1	● 1	○ 0	◐ 3	● 0	● 0
64	Hosp		● 0	● 1	○ 0	● 4	● 0	● 1
65	Hosp		● 1	● 1	○ 0	◐ 3	● 1	● 1
66	Hosp		● 1	● 1	○ 0	◐ 2	● 1	● 1
67	Hosp		● 1	● 1	○ 0	◐ 3	● 1	● 1
68	Hosp		● 1	● 1	○ 0	◐ 2	● 0	● 0
70	Hosp		● 0	● 0	○ 0	◐ 2	● 1	● 1
71	Hosp		● 1	● 1	◐ 2	◐ 3	● 0	● 0
72	Hosp		● 1	● 1	○ 0	◐ 2	● 0	● 0
73	Hosp		● 0	● 1	○ 0	◐ 2	● 0	● 0
74	Hosp		● 0	● 1	○ 0	◐ 2	● 1	● 0
75	Hosp		● 0	● 1	○ 0	◐ 2	● 0	● 1
77	Hosp		● 0	● 1	○ 0	◐ 2	● 0	● 1
78	Hosp		● 0	● 1	○ 0	◐ 1	● 0	● 0
79	Hosp		● 1	● 1	○ 0	◐ 3	● 0	● 0
80	Hosp		● 1	● 1	● 5	◐ 3	● 0	● 0
81	Hosp		● 1	● 1	○ 0	◐ 3	● 0	● 0