

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**

**Natalia Carvalhaes de Oliveira**

**SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS COM  
POTENCIALIDADES PARA A BIORREMEDIAÇÃO DE  
AMBIENTES CONTAMINADOS COM HIDROCARBONETOS  
DE PETRÓLEO E/OU DERIVADOS**

**Orientador:  
Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira**

**Dissertação de Mestrado**

**Goiânia – GO  
2009**

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA  
TROPICAL**

**Natalia Carvalhaes de Oliveira**

**SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS COM  
POTENCIALIDADES PARA A BIORREMEDIAÇÃO DE  
AMBIENTES CONTAMINADOS COM HIDROCARBONETOS  
DE PETRÓLEO E/OU DERIVADOS**

**Orientador:  
Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira**

Dissertação submetida ao PPGMT/UFG  
como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre,  
área de concentração Microbiologia.

**Goiânia – GO  
2009**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
GPT/BC/UFG**

O482s Oliveira, Natalia Carvalhaes de.  
Seleção de microrganismos endofíticos com potencialidades para a biorremediação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos de petróleo e/ou derivados [manuscrito] / Natalia Carvalhaes de Oliveira. - 2010.  
80 f.

Orientador: Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2010.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras e tabelas.

1. Microrganismos endofíticos. 2. Atividade antimicrobiana. 3. Biorremediação. 4. Enzimas microbianas.  
I. Título.

CDU: 579.6

# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	iii
LISTA DE TABELAS .....	iv
RESUMO .....	v
ABSTRACT .....	vi
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Microrganismos Endofíticos .....	2
1.2. Potencialidades Biotecnológicas .....	5
1.3. Contaminação com Petróleo e/ou Derivados .....	12
1.4. Identificação de Microrganismos .....	15
2. OBJETIVOS .....	17
2.1. Objetivo Geral .....	18
2.2. Objetivos Específicos .....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	19
3.1. Isolamento de Microrganismos Endofíticos .....	20
3.2. Determinação em placa da capacidade de degradação de Petróleo e derivados .....	21
3.3. Teste para produção de ácido indol-acético (AIA) .....	22
3.4. Teste para solubilização de fosfatos .....	23
3.5. Teste para fixação de nitrogênio .....	23
3.6. Determinação de atividade enzimática .....	24
3.6.1. Produção de amilases .....	24
3.6.2. Produção de celulases .....	24
3.6.3. Produção de endoglucanases .....	24
3.6.4. Produção de esterases e lipases .....	25
3.6.5. Produção de pectinases .....	25
3.6.6. Produção de proteases .....	25
3.6.7. Produção de $\beta$ - glucosidases .....	26
3.7. Teste de produção de extratos bacterianos com atividade antimicrobiana.....	26
3.8. Análise de biodegradação de gasolina por cromatografia .....	27
3.9. Extração de DNA .....	28
3.10. Amplificação para a região codificante de 16S rRNA .....	29
3.11. Purificação do produto de PCR e Sequenciamento .....	29
3.12. Análise do Sequenciamento e Identificação .....	30
4. RESULTADOS .....	31
4.1. Teste em placa da capacidade de degradação de hidrocarbonetos de Petróleo e derivados .....	32
4.2. Teste para produção de ácido indol-acético (AIA) e solubilização de fosfatos .....	34

4.3. Teste para fixação de nitrogênio .....	35
4.4. Determinação de atividade enzimática .....	35
4.5. Teste de produção de extratos com atividade antimicrobiana .....	35
4.6. Análise de biodegradação de gasolina por cromatografia .....	36
4.7. Análise de Sequenciamento .....	39
5. DISCUSSÃO .....	40
6. CONCLUSÕES .....	49
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	52
8. APÊNDICES.....	68
8.1. Meios de Cultura e Soluções .....	69
8.2. Fotos .....	78
8.3. Resultados do Sequenciamento .....	80

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Colonização endofítica por <i>Bacillus mojavencis</i> em milho nos espaços intercelulares. Fonte: Bacon & Hinton (2002) .....	4
Figura 2. Rotas metabólicas dependentes de triptofano para síntese de AIA por vegetais e bactérias (marcadas com asterisco). Fonte: Taiz & Zeiger (1998) .....	9
Figura 3. Localização das reservas de petróleo no Brasil. Fonte: ANP(2007)..	13
Figura 4. Cromatograma referente ao perfil de degradação de gasolina pelo isolado K2 após 48 horas de incubação .....	37
Figura 5. Cromatograma referente ao perfil de degradação de gasolina pelo isolado K2 após 72 horas de incubação .....	37
Figura 6. Cromatograma referente ao perfil de degradação de gasolina pelo isolado AB5 após 48 horas de incubação .....	38
Figura 7. Cromatograma referente ao perfil de degradação de gasolina pelo isolado KB2 após 48 horas de incubação .....	38
Figura 8. A) Placa teste do perfil de degradação dos microrganismos com incubação em shaker por 24horas e leitura com 24horas e B) 48horas de crescimento na placa .....	78
Figura 9. Teste para produção de ácido indol-acético (AIA).....	79
Figura 10. Crescimento do isolado AB7.1 em meio LGI. C(-): controle negativo .....	79
Figura 11. Atuação dos extratos obtidos a partir dos isolados testados sobre <i>Staphylococcus aureus</i> metilicina resistentes MRSA (comunidade) .....	79

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados da coloração de Gram em bactérias endofíticas isoladas de Cerrado .....	32
Tabela 2. Perfil de degradação dos microrganismos com incubação em shaker por 24horas e leitura com 24horas de crescimento na placa .....	33
Tabela 3. Perfil de degradação dos microrganismos com incubação em shaker por 24horas e leitura com 48horas de crescimento na placa.....	33
Tabela 4. Perfil de degradação dos microrganismos com incubação em shaker por 24horas e leitura com 72horas de crescimento na placa .....	34
Tabela 5. Índice enzimático produzido pelos isolados endofíticos testados .....	35
Tabela 6. Perfil de atividade antagônica dos extratos das bactérias endofíticas frente às cepas indicadoras .....	36
Tabela 7. Identificação dos isolados por comparação das sequências no banco de dados GenBank .....	39

# SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS COM POTENCIALIDADES PARA A BIORREMEDIAÇÃO DE AMBIENTES CONTAMINADOS COM HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO E/OU DERIVADOS

Autora: Natalia Carvalhaes de Oliveira  
Orientador: Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira

## RESUMO

Microrganismos endofíticos vivem no interior de plantas sem causar danos aparentes no hospedeiro, muitas vezes auxiliando na sobrevivência do vegetal, auxiliando seu crescimento com produção de fitormônios, solubilização de fosfatos, fixação de nitrogênio e produção de enzimas, ou metabolizando alguns compostos contaminantes orgânicos, como petróleo e/ou derivados. O objetivo deste trabalho foi isolar e identificar microrganismos endofíticos de vegetais presentes em áreas impactadas, assim como testar sua capacidade de degradação de petróleo e alguns derivados, identificar seu perfil para a produção de bacteriocinas, capacidade de fixação de nitrogênio, solubilização de fosfatos, produção de ácido indol-acético (AIA) e enzimas. Amostras vegetais foram coletadas em uma área impactada com lama asfáltica e desinfetadas superficialmente utilizando etanol 70%, hipoclorito de sódio e água destilada esterilizada. Depois de fragmentadas e maceradas, as amostras foram incubadas à 30° C por cerca de 72 horas, quando se observou crescimento de microrganismos nos meios de cultura: Agar nutriente, meio TSA (Tryptone Soya Agar) e meio de King. A verificação da capacidade de degradação de petróleo e derivados foi realizada em placas de ELISA, expondo a bactéria a uma solução contendo meio de cultura Mínimo, solução do corante DCPIP (sal de sódio de 2,6-dicloroindofenol) e petróleo ou derivado testado (óleo queimado, óleo lubrificante, óleo diesel e gasolina). A leitura positiva para degradação foi observada pela descoloração do DCPIP. Entre nove bactérias testadas, três apresentaram atividade degradativa em diferentes frações de petróleo, óleo diesel e gasolina, e as demais apresentaram variados perfis. Este resultado mostra a potencialidade desses microrganismos para aplicação em processos de biorremediação. A produção de AIA foi testada em meio TSA acrescido com triptofano e somente uma amostra apresentou resultado positivo, enquanto nenhuma foi considerada solubilizadora de fosfatos. Para teste de fixação de nitrogênio os isolados foram inoculados em meios livres de nitrogênio, apresentando crescimento após 24 horas de incubação, no entanto não apresentaram resultados positivos no teste de redução do acetileno, que confirma atividade da enzima nitrogenase. As amostras apresentaram variados perfis para a produção e atuação das bacteriocinas frente aos isolados clínicos testados. Não foi detectada atividade das enzimas endoglucanase, celulolítica e pectinolítica, mas sim de esterases,  $\beta$ -glucosidases, proteases e amilases. Alguns isolados foram identificados a partir do sequenciamento da região 16S DNA, cuja sequência foi comparada a um banco de dados (GenBank) e então diagnosticados como *Bacillus cereus*, *Staphylococcus pasteurii* e *Pseudomonas* sp. Foi confirmada a caracterização de bactérias endofíticas isoladas de plantas de Cerrado com potencial para utilização em biorremediação, promoção de crescimento vegetal e diversa produção enzimática, com potencialidades para utilização em indústria farmacêutica, alimentícia, têxtil, entre outras.

**Palavras-chave:** microrganismos endofíticos; biorremediação; enzimas; atividade antimicrobiana.

# SELECTION OF ENDOPHYTIC MICROORGANISMS FOR BIORREMIATION IN IMPACTED SOILS WITH PETROLEUM HYDROCARBONS AND DERIVATES

Autora: Natalia Carvalhaes de Oliveira  
Orientador: Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira

Endophytic microorganisms live inside plants showing no apparently damage for the host, often assisting in survival of plants, helping its growth with production of phytohormones, phosphates solubilization, nitrogen fixation and enzymes production, or they can metabolize organic contaminants, like petroleum and derivatives. This work aimed to isolated and identified endophytic microorganisms of plants present in impacted areas, as well as test their ability in petroleum and its derivatives degradation, identify bacteriocin production, to test their nitrogen fixation capability, phosphate solubilization, indol-acetic acid (IAA) and enzymes production. Plant samples were collected, in an area impacted with asphaltic and mud, were superficially disinfected using 70% ethanol, sodium hypochlorite and sterile distilled water. After macerated and fragmented, the samples were incubated at 30°C for about 72 hours, when growth of microorganisms was observed in culture media: Nutrient Agar, TSA (Tryptone Soya Agar) and King medium. The verification of petroleum and derivatives degradation capacity was performed in ELISA plates, exposing the bacteria to a solution of Minimal Medium, the dye DCPIP solution (2,6-dicloroindofenol sodium salt) and petroleum or derivative tested (burning oil, lubricating oil, diesel oil and gasoline). A positive reading for degradation was observed by discoloration of DCPIP. Among nine bacteria tested, three showed degradative activity in different fractions of petroleum, diesel oil and gasoline, and others showed different profiles. This result shows the potential of these microorganisms for application in bioremediation processes. The production of IAA was tested on TSA medium supplemented with tryptophan and only one sample was positive, while none was considered phosphate solubilizing. Testing the nitrogen fixing, samples were inoculated for a free nitrogen culture media, showing growth after 24 hours of incubation (positive results), however it's isolated did not show positive results in the acetylene reduction test, which confirms activity of the enzyme nitrogenase. The samples showed different profiles for the production and activity of bacteriocins against the clinical isolates tested. There were no detected activity of endoglucanase, cellulolytic and pectinolytic enzymes, but esterases,  $\beta$ -glucosidases, proteases and amylases were positive. Some isolates were identified from the sequencing of 16S DNA, whose sequence was compared to database (GenBank), and then diagnosed as *Bacillus cereus*, *Staphylococcus pasteurii* and *Pseudomonas* sp. The endophytic bacteria isolated from Cerrado plants confirmed their potential for use in bioremediation, plant growth promotion and diverse enzyme production, with potential for use in pharmaceutical, food, textiles, among others.

Key-words: endophytic microorganisms; bioremediation; enzymes; antimicrobial activity.

**“Não desistas da paciência.  
Não creias em realização sem esforço.”  
(Emmanuel)**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela existência e perseverança para lutar por todos os objetivos para os quais me proponho.

À minha família, Bernadete, João e Cecília, por todo o carinho e incentivo para a realização desta etapa.

Ao meu orientador Dr. José Daniel Gonçalves Vieira, pela oportunidade de estudo e aprendizado nesses anos de convivência.

À CAPES, pela bolsa de estudos a mim concedida.

Aos colegas do IPTSP, Ariana, Fernando, Petain, Camila, Alessandra e Ana Cláudia, pela companhia e amizade que fizeram da minha rotina muito mais agradável.

À professora Dra. Heloiza Ramos Barbosa, da Universidade de São Paulo (USP), por ceder seu laboratório para a realização dos experimentos sobre fixação de nitrogênio.

Aos professores Dr. André Kipnis, Dra. Keili Maria Cardoso de Souza e MSc. Lorena Cristina Santos, pelo auxílio e paciência na realização dos experimentos em Biologia Molecular.

Ao professor Dr. Nelson Antoniosi Filho e MSc. Maria Isabel Ribeiro Alves, pelo apoio aos testes de cromatografia.

Ao professor Dr. Fernando Araripe G. Torres, da Universidade de Brasília (UnB), pelos esclarecimentos durante a análise do sequenciamento.

Aos professores Dr. Geraldo Sadoyama, Dra. Maria Cláudia D. P. B. André e Dra. Keili Maria Cardoso de Souza, pelas correções valiosas na banca de qualificação e de grande contribuição para a melhoria deste trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada !!!!

# 1. Introdução

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Microrganismos Endofíticos

Os microrganismos estão presentes nos mais variados ambientes, interagindo com diversas formas de vida. Suas características peculiares conferem adaptação e sobrevivência em ambientes considerados hostis, desempenhando papel fundamental na manutenção de ecossistemas, como exemplo temos sua atuação nos ciclos biogeoquímicos. Um fator limitante no estudo de diversidade microbiana é a reprodução das condições ambientais em laboratório, ainda um objetivo a ser alcançado. Estudos comparativos indicam que menos de 1% dos microrganismos presentes na natureza são cultivados através de métodos convencionais (Rozsak & Colwell 1987, Pace 1997). Assim como ainda não é possível determinar grande parte da diversidade microbiana, tão pouco é possível delimitar quais são todos os tipos de interações possíveis entre microrganismos e outros integrantes do ecossistema (Rozsak & Colwell 1987, Pace 1997).

Uma das interações realizadas por microrganismos há muito conhecida ocorre com vegetais, em que bactérias e fungos são responsáveis pelo processo de fixação do nitrogênio, sendo denominadas genericamente diazotróficas e micorrizas, respectivamente. Essas bactérias diazotróficas estão associadas a raízes de plantas e atuam reduzindo o  $N_2$  atmosférico a  $NH_4^+$ , tornando-o disponível para utilização. Essa é uma relação simbiótica, onde a bactéria fornece nitrogênio para a síntese protéica e a planta fornece fontes de energia para o metabolismo bacteriano. Os gêneros mais comuns são *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, associados às leguminosas. Algumas bactérias não-simbióticas encontradas no solo também realizam essa fixação, como exemplares dos gêneros *Azotobacter*, *Azotococcus*, *Beijerinckia* e *Clostridium* (Raven et al. 2001).

Existem microrganismos que vivem na superfície de plantas, denominados epifíticos, e outros que vivem em seu interior, os endofíticos. Os fitopatógenos estão entre os endofíticos, embora haja diferenças significativas demonstradas desde o século XIX por Bary em 1866 (Azevedo 1999, Carrim 2005). A limitação em cada categoria é questionável, pois existem populações

bacterianas que podem flutuar entre a colonização epifítica e endofítica, fitopatogênicas ou não, de acordo com as condições ambientais em que se encontram ou da interação com outros microrganismos presentes no mesmo ambiente (Hallmann et al. 1997).

Microrganismos endofíticos são aqueles que vivem uma parte ou todo o seu ciclo de vida no interior de plantas sem causar danos aparentes ao hospedeiro ao contrário dos fitopatógenos (Azevedo 1999). A princípio eram definidos como assintomáticos, mas sua importância vem crescendo depois de verificadas suas propriedades que auxiliam a sobrevivência do vegetal, como melhoria na resistência a estresses biológicos e abióticos (Hallmann et al. 1997), possibilitando o aumento na habilidade dos vegetais em resistir a patógenos, herbívoros e outros vegetais (Wei et al. 1996, Sturz et al. 1998, Elliot et al. 2000). Estes organismos recebem nutrientes e proteção da planta hospedeira e produzem alcalóides, enzimas, antibióticos e outras substâncias que protegem e auxiliam a planta em condições de estresse (Azevedo et al. 2000).

Os microrganismos endofíticos ainda são pouco estudados e, embora tenham sido descritos desde o século XIX, só receberam importância no final do século XX a partir do final dos anos 70. A primeira espécie identificada foi *Herbaspirillum seropedicae*, por Baldani et al. em 1986 (Radwan et al. 2004).

Por estarem em íntima associação com os vegetais, esses microrganismos são considerados fonte de grande potencial biotecnológico ainda não totalmente conhecido. Entre as possíveis aplicações biotecnológicas dos produtos naturais provenientes desses microrganismos estão a utilização em medicina, indústria farmacêutica e agricultura (Strobel & Daisy 2003).

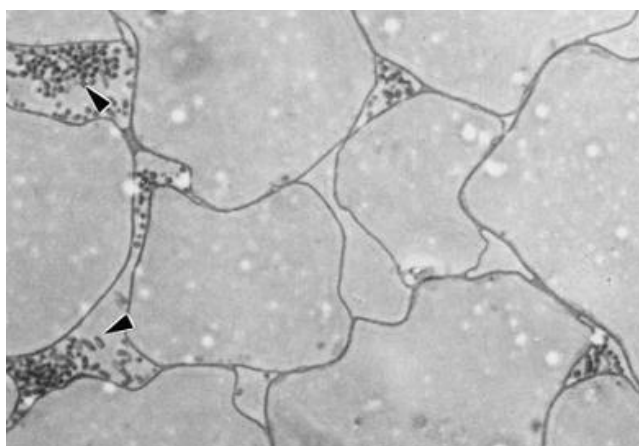
A capacidade de sobreviver dentro do vegetal é uma vantagem para os microrganismos endofíticos, já que não estão expostos as adversidades ambientais e encontram pouca ou nenhuma competição, tornando-os candidatos a testes para controle biológico (Misaghi & Donndelinger 1990).

Em cada vegetal podem ser encontrados vários microrganismos associados, portanto essa diversidade é difícil de ser estimada. A colonização está relacionada com a interação entre o genótipo do vegetal e o do microrganismo, embora esse processo ainda não tenha sido totalmente elucidado. Segundo Misaghi & Donndelinger (1990) as relações entre esses

microrganismos e os vegetais envolvem processos coevolutivos, influenciando mecanismos fisiológicos dos mesmos por processos ainda não totalmente elucidados.

Oliveira et al. (2003) afirmam que o encontro entre a planta e os microrganismos pode ocorrer de forma passiva, quando os microrganismos são levados por soluções do solo, ou de forma ativa, através de movimentação dos microrganismos em direção as raízes direcionados por quimiotaxia em direção a exudatos radiculares (fontes de carbono) existentes na região da rizosfera. Após esse primeiro contato, existem fatores que influenciam a colonização como teor de matéria orgânica e nitrogênio, temperatura, densidade do solo, existência de predação por protozoários, qualidade dos exudatos radiculares, densidade populacional e antibiose (Benizri et al. 2001).

Em geral, esses microrganismos podem estar localizados em espaços intracelulares, intercelulares ou em tecido vascular, tanto de partes aéreas como das raízes. As raízes são consideradas sua principal porta de entrada, por apresentarem arranhões que servem de entrada para os microrganismos presentes no solo. Outras portas de entrada são os estômatos, hidatódios, lenticelas e feridas causadas por insetos. Além disso, a produção de enzimas facilita a penetração ativa destes organismos, podendo também, serem transmitidos via semente (Azevedo et al. 2000). Podem ser detectados por isolamento em meios de cultura, ou observação direta por microscopia óptica ou eletrônica. Em estudo realizado por Fischer et al. (1992) com amostras de milho (*Zea mays* L.), a maior concentração de bactérias endofíticas foi encontrada na parte basal do vegetal, com número decrescente até o topo.



**Figura 1.** Colonização endofítica por *Bacillus mojavencis* em milho nos espaços intercelulares. Fonte: Bacon & Hinton (2002).

Os vegetais rotineiramente são expostos a contaminantes orgânicos ou compostos semelhantes, respondendo a esta exposição estimulando os microrganismos endofíticos presentes a defenderem os mesmos destes agentes tóxicos (Walton et al. 1994). Por utilizarem tais substâncias como fontes de carbono, os microrganismos vêm se apresentando como possível alternativa aos métodos convencionais de tratamento, sendo cada vez mais empregados na resolução de problemas ambientais (Ururahy et al. 1998). Os vegetais podem recrutar bactérias que possuem genótipos específicos para essa degradação de agentes tóxicos nas raízes ou no interior das mesmas. Esta seleção pode ser específica para determinados contaminantes, o que faz com que estas bactérias sejam presumidamente protetoras contra os efeitos fitotóxicos destes contaminantes (Siciliano et al. 2001).

## **1.2. Potencialidades Biotecnológicas**

Por estarem presentes no interior dos vegetais, algumas propriedades conferidas a estes podem ser na verdade provenientes da atividade microbiana. Muitos endófitos têm sido isolados de plantas medicinais para testes de produção de substâncias com potencial antibiótico, antiparasitários e tratamento para câncer em imunocomprometidos (Strobel & Daisy 2003).

A colonização endofítica pelo fungo *Neotyphodium lolii* em gramíneas promove vantagem na sobrevivência do vegetal quando este fica exposto ao estresse ambiental biótico e abiótico, como mudança de temperatura e seca. Nestes casos de estresse foi comprovado o aumento da população endofítica. A colonização, neste caso, foi influenciada pela ação antrópica, onde foi demonstrada a prevalência do fungo em plantas que sofreram pouca ou nenhuma manipulação, consideradas plantas selvagens (Jensen & Roulund 2004).

Existem bactérias que vivem em associação com vegetais e podem afetar seu crescimento, sendo denominadas bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV). Como exemplos dessa capacidade estão os processos de fixação biológica de nitrogênio, disponibilização de nutrientes para o vegetal, produção de sideróforos, produção de fitormônios, solubilização de fósforos, antibiose e antagonismo a patógenos (Oliveira et al. 2003). Muitos

microrganismos endofíticos estão diretamente envolvidos nesses processos, e sua íntima associação com os vegetais é um fator fundamental para o seu sucesso.

A ausência de nitrogênio é um fator limitante ao crescimento vegetal, considerando que não há crescimento vegetal na ausência desse elemento, já que este está presente na constituição de importantes moléculas, como proteínas e ácidos nucleicos. Embora seja abundante no ambiente como  $N_2$  gasoso (ar atmosférico), essa forma é muito estável e não assimilada por vegetais e animais, sendo necessário um processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) para torná-lo disponível. Esse processo é realizado por um pequeno grupo de procariotos conhecidos como diazotróficos, que são bactérias com a capacidade de reduzir o  $N_2$  a uma molécula capaz de ser incorporada no metabolismo celular, como a amônia (Raven et al. 2001).

As bactérias diazotróficas, podem ser classificadas em três grupos de acordo com o modo de associação com a planta: diazotróficas de vida livre, associativas e simbióticas (Evans & Burris 1992). O primeiro grupo é representado por bactérias de vida livre, heterotróficas encontradas em regiões de rizosfera, como *Beijerinckia fluminensis*, *Beijerinckia indica*, *Klebsiella* sp., *Azotobacter chroococcum*, *Azotobacter paspali* e *Azotobacter vinelandii* (Evans & Burris 1992). O segundo grupo, de bactérias diazotróficas associativas, é representado por exemplares que contribuem para o crescimento do vegetal sem formar estruturas diferenciadas (Evans & Burris 1992). Esse grupo pode ser dividido em bactérias endofíticas facultativas e obrigatórias. As endofíticas facultativas podem colonizar tanto a rizosfera quanto o interior das raízes, enquanto as obrigatórias colonizam exclusivamente o interior das raízes (Baldani et al. 1997). O terceiro grupo corresponde a bactérias simbióticas que estão envolvidas na fixação de nitrogênio através da formação de estruturas diferenciadas, como os nódulos quando ocorre essa associação com plantas leguminosas (Evans & Burris 1992).

O processo de FBN é fundamental para a manutenção do ciclo biogeoquímico do nitrogênio. Graças a essas bactérias fixadoras e outros organismos decompositores de matéria orgânica há uma reciclagem desse nutriente no ecossistema, tornando-o sempre disponível e proporcionando equilíbrio no ambiente.

A FBN é um processo realizado por diversos grupos de bactérias, como microaeróbias dos gêneros *Azospirillum spp.*, *Herbaspirillum spp.*, *Acetobacter diazotrophicus*, *Azorhizobium caulinodans*, *Azoarcus spp.* e *Burkholderia spp.*; bactérias aeróbias como *Azotobacter spp.* e *Derxia spp.*; actinomicetos do gênero *Frankia* e bactérias fotossintéticas (Sprent & Sprent 1990). Minamisawa et al. (2004) encontrou clostrídios, que são bactérias gram-positivas anaeróbias, em associações com plantas não-leguminosas envolvidas em processo de fixação de nitrogênio.

Plantas de interesse agrícola são os principais alvos de estudos das interações endófito-planta, como cana-de-açúcar, milho e arroz. Com o aumento de regiões de cultivo agrícola, a quantidade de nitrogênio disponível tornou-se um ponto preocupante para a manutenção de culturas. A utilização de bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> em associação endofítica com vegetais é uma alternativa a utilização excessiva de compostos nitrogenados, como o nitrato, possibilitando melhoria no rendimento agrícola (Marin et al. 1999). Existem outros fatores, além da melhoria no rendimento de FBN, que são importantes para aumentar o rendimento agrícola. A busca por maiores rendimentos aumenta a procura por microrganismos que tenham a capacidade de realizar alguns desses processos com eficácia e, por se tratarem de processos biológicos naturais, não causam danos ambientais. Entre eles estão o aumento na produção de hormônios vegetais e maior disponibilidade de compostos fosfatados.

Algumas bactérias de vida associada a vegetais são produtoras de fitormônios, que auxiliam o crescimento vegetal causando diversas modificações, como aumento na absorção de nutrientes e água pelas raízes e aumento na produção de metabólitos (Oliveira et al. 2003).

Segundo Radwan et al. (2004), existem algumas bactérias fixadoras de nitrogênio envolvidas diretamente na produção de fitormônios e estimulação do crescimento de plantas, como exemplares dos gêneros *Azospirillum* e *Herbaspirillum*. Aparentemente esses hormônios não têm efeitos sobre as bactérias, provavelmente essa produção ocorra devido a interação endófito-vegetal. Os principais hormônios vegetais são auxinas, citocinas, etileno, ácido abscísico e giberelinas (Oliveira et al. 2003).

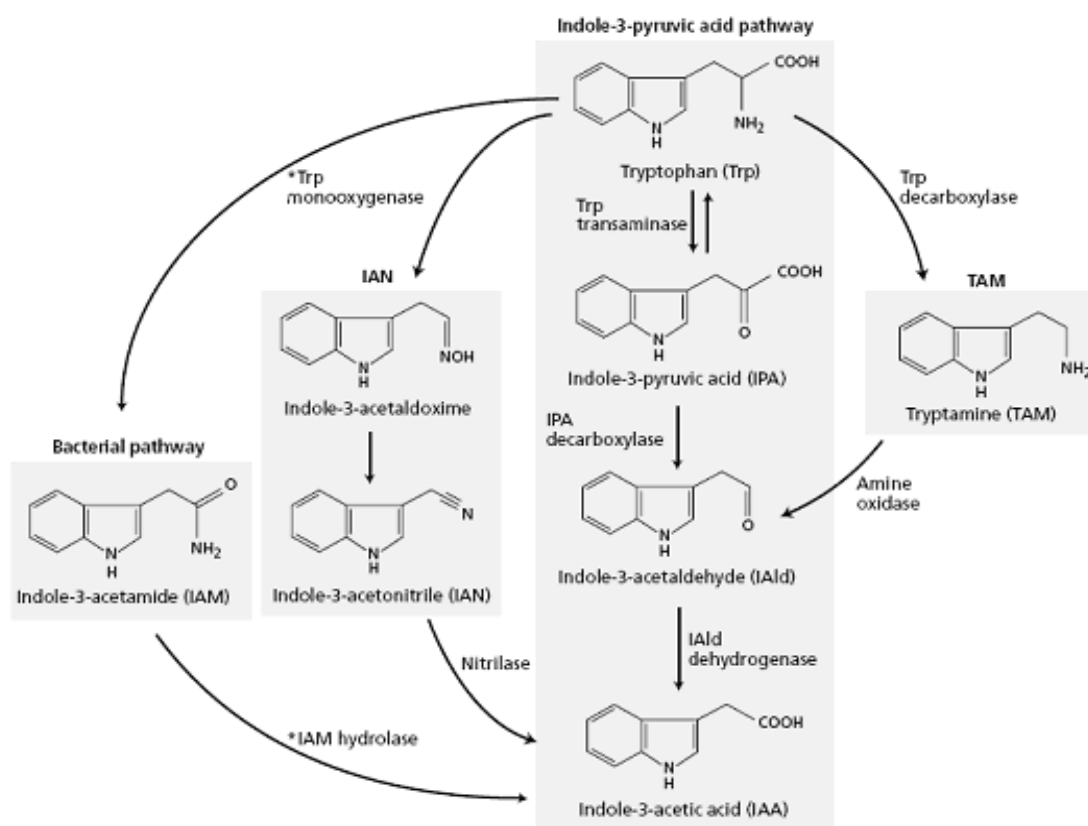
Entre as auxinas, a principal é o ácido indol-3-acético (AIA), responsável por diferenciação de tecidos vasculares, estimulação do desenvolvimento do fruto, promoção de atividade cambial, inibição da abscisão de folhas e frutos, estimulação da síntese de etileno, dominância apical, respostas trópicas e inibição ou promoção da floração (Raven et al. 2001). As vias de biossíntese de AIA ocorrem principalmente a partir do aminoácido triptofano, e são classificadas de acordo com seus compostos intermediários, como os ácidos 3-indolacetamida, 3-indolpirúvico e 3-indolacetonitrilo, sendo que os microrganismos podem selecionar uma determinada via em função do ambiente (Patten & Glick 1996).

A biossíntese de AIA a partir do triptofano utilizando o ácido 3-indolacetamida como intermediário é a via encontrada nas bactérias. Essa via requer duas enzimas específicas, triptofano monooxigenase e 3-indolacetamida hidrolase (Figura 2), característica de bactérias como *Pseudomonas savastanoi* e *Agrobacterium tumefaciens* (Taiz & Zeiger 1998). Existe a hipótese de que bactérias fitopatogênicas utilizem o ácido 3-indolacetamida como intermediário, provocando tumores na planta, enquanto bactérias não-fitopatogênicas utilizem a rota pelo ácido 3-indolpirúvico (Prinsen et al. 1993, Patten & Glick 1996, Manulis et al. 1998).

Os solos brasileiros em geral apresentam altas concentrações de fósforo, no entanto, este se encontra de forma pouco solúvel e indisponível para absorção pelos vegetais (Narloch et al. 2002). Alguns microrganismos são capazes de disponibilizar fósforo para absorção pelo vegetal através da mineralização de fosfato orgânico ou solubilização de fosfato inorgânico, portanto a utilização desses microrganismos como inoculantes podem promover melhoria no crescimento vegetal. Entre os principais exemplos descritos de bactérias como solubilizadoras de fosfato estão os gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Rhizobium* (Rodriguez & Fraga 1999), e os fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (Silva Filho et al. 2002).

O aumento na taxa de solubilização de fosfatos pelos vegetais provocados por microrganismos ocorre por diversos mecanismos, como incremento na área superficial das raízes com associações micorrízicas, promoção do crescimento de raízes laterais e pêlos radiculares, deslocamento

do equilíbrio de adsorção e estímulo de processos metabólicos (Mendes & Reis Júnior 2003).



**Figura 2.** Rotas metabólicas dependentes de triptofano para síntese de AIA por vegetais e bactérias (marcadas com asterisco). Fonte: Taiz & Zeiger (1998).

Enzimas são amplamente conhecidas por catalizarem reações nos sistemas biológicos, atuando em substratos e condições específicas, como temperatura e pH. Existem bactérias que produzem enzimas de interesse para desenvolvimento de processos biotecnológicos, como produção de aromas de frutas e flores, clarificação e redução da viscosidade em suco de frutas e tratamento de resíduos vegetais por pectinases (Unejo & Pastore 2006), determinação diagnóstica de triacilgliceróis por lipases produzidas por *Burkholderia* sp e *Arthrobacter* sp.(Lima 2004), redução de lipídios em águas residuárias (Mendes et al. 2005), redução de corantes por monooxigenases (Santos 2005), aplicações de amilases e celulasas na indústria têxtil (Oliveira et al. 2006), proteases na indústria alimentícia e algumas estáveis em solventes orgânicos (Ogino et al. 1995), entre outras.

Algumas bactérias endofíticas têm a capacidade de produzir enzimas que degradam alguns compostos vegetais, como celulases, proteases e pectinases, que podem estar diretamente envolvidas com o sucesso em seu processo de colonização da planta. Essa atividade enzimática, no entanto, não é benéfica para a associação endófito-planta após a colonização, pois prejudicaria o vegetal, e então a bactéria passaria a ter uma característica de bactérias fitopatogênicas (Cho et al. 2007).

Para a quantificação da atividade enzimática extracelular em meio sólido é utilizado um valor denominado índice enzimático (IE), obtido através da divisão da medida do diâmetro do halo de degradação pela medida do diâmetro da colônia (Hankin et al. 1971, Hankin & Anagnostakis 1975, Oliveira et al. 2006). Quanto maior esse IE, melhor produtor da enzima em questão é considerado o microrganismo.

A utilização de enzimas produzidas por microrganismos é uma opção vantajosa, pois são relativamente de fácil produção, podem ser obtidas de uma variedade de microrganismos e são grandes alvos de manipulação genética. Embora os dados da literatura descrevam em maior quantidade a produção realizada por fungos, as bactérias também são responsáveis por uma boa e rápida produção de enzimas.

Algumas bactérias são capazes de produzir substâncias de natureza protéica que impedem o crescimento de outras, genericamente denominadas bacteriocinas (Romeiro 1989). Esse fato confere uma vantagem competitiva a essas bactérias, diminuindo a competição por habitat.

Na indústria de alimentos existe grande interesse em bactérias produtoras de bacteriocinas para processos de bioconservação, onde a idéia é explorar microrganismos naturalmente ou artificialmente presentes nos alimentos para eliminar outros que são indesejáveis e prejudiciais a saúde (De Martins et al. 2002). Bromberg et al. (2006) afirmam que *Lactococcus lactis* ssp. *horniae* encontrada em frango produz bacteriocinas com efeitos contra algumas linhagens de *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*. Essas bactérias também são fonte potencial em indústria farmacêutica, para testes de atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas.

A biorremediação é um processo que explora as propriedades metabólicas dos organismos para degradar agentes contaminantes, podendo essa habilidade ser natural ou adquirida através da inoculação de genes codificantes para funções específicas (Ilyina et al. 2003). Associada a idéia de biorremediação geralmente está a utilização de microrganismos para degradação de contaminantes, embora o uso de plantas também seja comum (Newman & Reynolds 2005).

Entre as principais estratégias de biorremediação estão: a utilização de organismos do próprio local, sem qualquer interferência de tecnologias ativas (biorremediação intrínseca ou natural); a adição de agentes estimulantes como nutrientes, oxigênio e biossurfactantes (bioestimulação); e a inoculação de consórcios microbianos enriquecidos (bioaumento) (Bento et al. 2003). Nesses processos ocorre a transformação do poluente em gás carbônico, água e biomassa (Bento et al. 2003).

A fitorremediação é uma das estratégias de biorremediação há muito utilizada, que consiste na utilização de plantas para tratamento de ambientes (água, solo e ar) contaminados (Doty 2008). Alguns dos contaminantes testados são: petróleo, solventes, metais pesados, explosivos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH) e alguns contaminantes orgânicos. Antes de escolher o vegetal adequado para a remediação, é necessário verificar a capacidade do mesmo para assimilar determinados contaminantes em suas vias metabólicas e como disponibilizar o contaminante em uma forma possível de ser assimilado (Doty 2008).

A microbiota presente no vegetal, tanto em seu interior como comunidade endofítica como na região da rizosfera, também influencia no resultado dos processos de descontaminação. A capacidade do vegetal em degradar hidrocarbonetos presentes em solo, embora ainda não totalmente elucidada, está diretamente associada a sua capacidade de recrutar microrganismos e fornecer condições para que esses expressem sua atividade degradativa (Muratova et al. 2003).

Diversos processos realizados por vegetais resultam em fitorremediação. Alguns vegetais têm a capacidade natural de acumular metais, como *Pteris vittata* acumula arsênio e *Thlaspi caerulescens*, cádmio (Ellis et al. 2006, Song et al. 2003), mas também são utilizadas transformações genéticas para

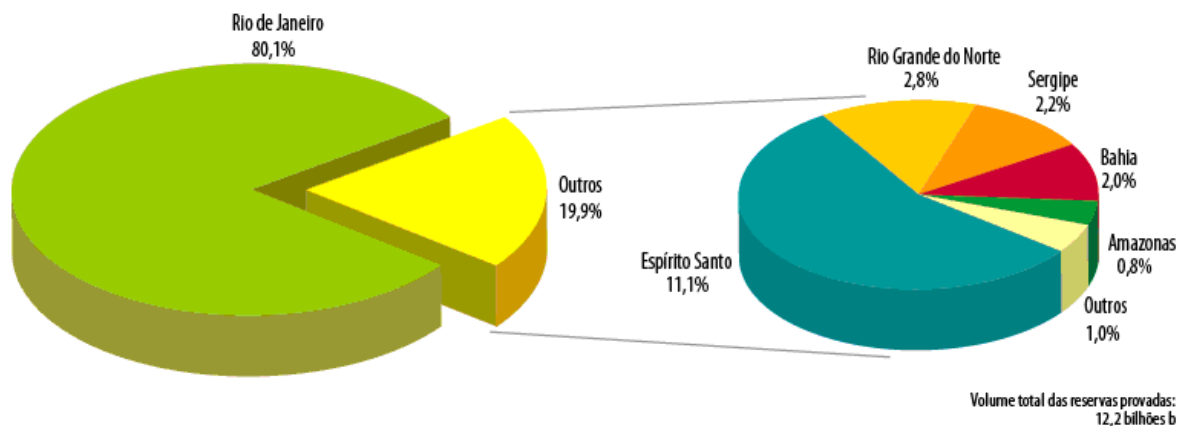
aquisição dessa capacidade. A transformação pode ocorrer no próprio genoma vegetal, através ou não de algum microrganismo vetor, como *Escherichia coli*, ou em microrganismos endofíticos que passam a conferir a característica escolhida ao vegetal. A manipulação de microrganismos endofíticos é vantajosa por ser um processo mais fácil e com resultados detectados rapidamente.

### **1.3. Contaminação com Petróleo e/ou Derivados**

O petróleo é um combustível originado a partir de grandes deposições fósseis, com composição variável de compostos orgânicos, predominando os hidrocarbonetos (GESAMP 1993). As cadeias de hidrocarbonetos têm frações leves, que formam gases, e frações pesadas, que formam o óleo, sendo a distribuição dessas cadeias o diferencial proveniente de seus diversos locais de origem.

Os derivados de petróleo são usados principalmente como combustíveis, liberando energia a partir de sua queima. A Agência Nacional de Petróleo, (ANP), classifica esses derivados como energéticos e não-energéticos. Energéticos são os derivados utilizados predominantemente como combustíveis, como gasolina, gasolina de aviação, querosene iluminante, óleo diesel e óleo combustível. Os derivados não energéticos, embora tenham conteúdo energético são utilizados para outros fins, são exemplificados por graxa, lubrificante, parafina, asfalto, solvente, nafta, minerais betuminosos, n-parafinas, entre outros. Os derivados de petróleo mais produzidos no Brasil foram: óleo diesel (36,4%), gasolina (20,1%) e nafta (8,1%) (ANP 2007).

Segundo o relatório da ANP (2007), em 2006 o Brasil ocupou o 17º lugar no ranking mundial por possuir reservas de 12,2 bilhões barris de petróleo (sendo 92,7% localizadas no mar), equivalente a 3,6% das reservas mundiais, enquanto ocupou o 16º lugar de acordo com sua produção. Em termos de capacidade para refinamento, em 2006 o Brasil ocupou o 12º lugar, com 13 refinarias nacionais e 247 blocos exploratórios em funcionamento. A maior parte das reservas encontra-se no Rio de Janeiro, seguido pelo Espírito Santo.



**Figura 3.** Localização das reservas de petróleo no Brasil. Fonte: ANP (2007).

Os impactos ambientais causados pela indústria do petróleo são decorrentes principalmente dos processos de descoberta de novas jazidas, refinamento e transporte, sendo que cerca de 10% do uso do produto é perdido em derramamentos que causam catástrofes em costas litorâneas (Van Hamme et al. 2003). Grande parte do produto bruto também é perdida na armazenagem, gerando borras altamente contaminantes ao ambiente. A contaminação do solo por hidrocarbonetos, assim como de águas subterrâneas e superficiais, causa muitos prejuízos ao ecossistema, principalmente pela acumulação em animais e plantas, causando mortes e mutações (Ilyina et al. 2003).

A importância mundial do petróleo é um fato indiscutível. Isso inclui seus variados produtos, que possuem diversas classificações quanto à estrutura química e predominância de hidrocarbonetos, que podem ser degradados por diversos microrganismos através de inúmeras rotas metabólicas. Segundo Ramos (2006), entre as principais classificações estão os parafínicos (cadeias retilíneas), naftênicos (cadeias em forma de anel), mistos (mistura de parafínicos e naftênicos com propriedades intermediárias) e aromáticos.

O petróleo, após algum tempo de exposição no ambiente, sofre diversas alterações devido a fatores biológicos, como a biodegradação, e físicos, como evaporação, dissolução, dispersão, oxidação, entre outros (Sloan 1999). Os impactos ambientais provenientes da permanência desse contaminante no ambiente são influenciados por fatores como clima, organismos atingidos, frequência da exposição e práticas para descontaminação.

A biodegradação do petróleo e seus derivados por populações naturais de microrganismos representa um dos mecanismos primários pelos quais os compostos poluentes são eliminados do meio ambiente (Rosato 1997). Por ser um processo natural e não agressivo ao ambiente, o crescimento do interesse em descobrir microrganismos com essa capacidade de degradação é constante. Experimentos confirmam que a ausência de nitrogênio e fósforo, que são compostos essenciais ao metabolismo microbiano, prejudica a ação dos microrganismos que atuam na remediação em ambientes contaminados, o que pode ser evitado adicionando esses compostos em experimentos para melhorar sua atuação (Van Hamme et al. 2003).

Para a detecção da capacidade de biodegradação de compostos, especificamente de hidrocarbonetos de petróleo, existem testes rápidos, com a utilização de indicadores para reações de óxido-redução (Peixoto & Vieira 2005) e testes mais específicos como a cromatografia. A cromatografia gasosa é uma técnica de alta eficiência, amplamente utilizada para a caracterização de hidrocarbonetos (Mariano et al. 2007).

Em bactérias os genes que determinam a degradação de hidrocarbonetos variam de acordo com cada espécie, com grande variedade de enzimas e rotas metabólicas envolvidas, que ainda não se encontram totalmente elucidadas. Para que a célula assimile o hidrocarboneto, é necessário o contato direto com este contaminante, no entanto existem alguns mecanismos que permitem sua entrada na célula, como aumento na permeabilidade da membrana, ou bloqueiam a entrada, através da produção de biofilmes (Van Hamme et al. 2003).

Diversas bactérias foram descritas como responsáveis por processos de biorremediação de petróleo e derivados, como *Pseudomonas*, *Mycobacterium* (Solano-Serena et al. 2000), *Acinetobacter* sp. (Gallego et al. 2001), *Serratia marcescens* (Wongsa et al. 2004). A maioria das bactérias envolvidas nesses processos de biorremediação tem metabolismo aeróbio, e algumas são capazes de degradar tanto petróleo cru como frações mais refinadas.

Ainda não existem relatos das potencialidades biotecnológicas de bactérias endofíticas isoladas de Cerrado, como perfis de degradação de hidrocarbonetos de petróleo, fixação de nitrogênio, solubilização de fosfatos e produção de enzimas. No entanto os microrganismos endofíticos são fontes

promissoras para desenvolvimento de tecnologias com estes fins, sem causarem danos ao ambiente. Este trabalho visa dar um passo inicial na elucidação dessas potencialidades, já que o bioma Cerrado possui grande biodiversidade ainda pouco estudada.

#### **1.4. Identificação de Microrganismos**

O estudo de diversidade microbiana é um grande desafio, devido a ampla localização dos microrganismos, sua diversidade metabólica e por muitas dessas formas não serem ainda cultiváveis (Rozsak & Colwell 1987, Pace 1997). Para melhorar esse estudo, diversos métodos são constantemente desenvolvidos e aprimorados com o objetivo de conseguir dados mais próximos quanto possíveis da realidade ambiental.

Os principais métodos para análise de diversidade microbiana, além dos métodos de cultivo clássicos com a utilização de meios de cultura, consistem em observação por imunofluorescência (FISH) e análise de proteínas e ácidos nucléicos (Garcia 2006), que podem fornecer uma quantidade maior de dados independente de cultivo e com diferentes níveis de resolução. A classificação de organismos baseados em dados moleculares através da comparação de sequências em unidades ribossômicas propôs uma nova forma de classificação de acordo com um novo nível taxonômico, denominado domínio, que reflete melhor a filogenia dos microrganismos (Maluche-Baretta 2007).

O 16S rRNA (ácido ribonucléico ribossômico) está localizado na menor subunidade do ribossomo dos procariotos. O sequenciamento da região do gene que codifica para a região 16S rRNA, denominado 16S rDNA, tem sido amplamente utilizado para a identificação de microrganismos, devido ao fato de estar presente em todos os microrganismos e ser uma região com alto grau de conservação (Garcia 2006). Além disso, apresenta tamanho suficiente para detecção de regiões divergentes, ausência de transferência lateral e sua grande disposição em bancos de dados o torna favorável a utilização como marcador molecular filogenético para identificação (Macrae 2000, Faoro 2006, Maluche-Baretta 2007).

A utilização da região do 16S rDNA como parâmetro de comparação entre os microrganismos trouxe um inestimável avanço nos dados de

diversidade microbiana, corroborando com dados já obtidos através das técnicas de cultivo e análises morfológicas, assim como elucidando a presença de novos microrganismos ainda desconhecidos (Macrae 2000).

Pouco é conhecido sobre a diversidade microbiana em ambientes de Cerrado e principalmente de microrganismos endofíticos desta fitofisionomia. Este trabalho é pioneiro nesta investigação no Centro-Oeste, e visa o conhecimento de microrganismos endofíticos presentes em vegetais que se desenvolvem em áreas impactadas com rejeitos asfálticos.

## **2. Objetivos**

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

O trabalho teve como objetivo isolar microrganismos endofíticos de plantas expostas à poluição por lama asfáltica, a fim de conhecer seu potencial biorremediador, agrônômico e farmacêutico.

### 2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Isolar bactérias endofíticas presentes em vegetais presentes em áreas impactadas com lama asfáltica;
- ✓ Identificar e testar a capacidade degradativa de petróleo e derivados dessas bactérias;
- ✓ Comparar os resultados obtidos entre os testes de avaliação da capacidade degradativa de petróleo e derivados por reações de óxido-redução e por cromatografia;
- ✓ Verificar a capacidade de produção de ácido indol acético, solubilização de fosfato e fixação de nitrogênio;
- ✓ Detectar atividades enzimáticas com potencial biotecnológico;
- ✓ Verificar a produção de extratos pelos microrganismos endofíticos isolados com atividade antimicrobiana e testar sua atividade frente a isolados clínicos;
- ✓ Identificar as bactérias isoladas por seqüenciamento da região 16S DNA.

### **3. Material e Métodos**

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Isolamento de Microrganismos Endofíticos

Seis amostras vegetais foram coletadas em áreas contaminadas com rejeitos de lama asfáltica no Departamento de Estradas e Rodagem e Companhia Municipal de Pavimentação DERMU COMPAV-GO e transportadas ao Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia (LAMAB) do IPTSP/UFG. Entre os vegetais presentes na área, foram coletadas gramíneas por serem as mais abundantes e estas foram depositadas em frascos previamente esterilizados para serem transportadas. As raízes vegetais foram escolhidas para fazer o isolamento, por serem os locais com maior frequência desses microrganismos segundo a literatura, justificado por seu contato direto com o solo e ser sua principal porta de entrada (Azevedo et al. 2002, Oliveira et al. 2003).

As amostras vegetais foram lavadas com água de torneira e sabão e deixadas secar ao ar, sobre papel absorvente. Após secagem as amostras foram pesadas (1,0g), desinfetadas superficialmente de acordo com a metodologia descrita por Araújo et al. (2002). A seqüência de desinfecção foi realizada expondo as amostras vegetais a: etanol 70% por 1 minuto; hipoclorito de sódio a 2%, por 4 minutos; lavagem em água destilada esterilizada, por três vezes; banho de ultra-som 40 kHz, por 10 minutos; lavagem com água destilada esterilizada, por três vezes; etanol 70% por 30 segundos, seguidos de uma lavagem final com água destilada esterilizada, por duas vezes.

O controle do processo de desinfecção da superfície vegetal foi realizado inoculando três alíquotas de 1,0 mL da última água de lavagem das amostras em tubos contendo caldo nutriente ou caldo BHI e incubando a 30°C, por 72 horas. A ausência de turvação nesses meios foi considerada uma resposta positiva quanto a eficiência do processo de desinfecção. Para confirmação, após este período de incubação, amostras dos tubos foram inoculadas em placas de Petri contendo Agar Nutriente e incubadas a 30°C, por 48 horas. O não desenvolvimento de colônias foi indicativo da eficiência da desinfecção.

Para o isolamento dos microrganismos endofíticos foi utilizada a técnica de fragmentação, onde as amostras previamente desinfetadas foram cortadas em

fragmentos de 1 cm com o auxílio de um bisturi esterilizado. Foram utilizados para o isolamento os meios de cultura: Agar nutriente (NA), meio TSA (Agar Triptona de Soja) e Meio de King. As amostras foram individualmente inoculadas em placas de Petri contendo os meios citados. Nesta etapa inicial de isolamento foram utilizadas duas placas de cada meio de cultura.

As placas com os fragmentos vegetais previamente desinfetados foram incubadas a 30°C durante 15 dias. Após o crescimento os microrganismos foram isolados e purificados por esgotamento nos respectivos meios sólidos onde o microrganismo teve seu crescimento observado pela primeira vez. Este procedimento foi repetido cerca de cinco vezes, visando à obtenção de colônias puras. Após a purificação, as bactérias foram mantidas em NA e armazenadas em geladeira a 4°C. Os isolados também foram preservados em glicerol 50% e armazenados em freezer a - 20°C. Para uma classificação inicial dos microrganismos isolados foi realizada a identificação morfo-tintorial pela coloração de Gram.

De acordo com os meios inicialmente usados, as bactérias foram denominadas AB2.3, AB4, AB5, AB7.1, KB2, K2, K3, K5.1 e TSA2.2. Os microrganismos isolados receberam essas denominações devido aos meios de cultura pelos quais foram isolados. Os nomes com letra inicial “A” são provenientes de isolamento em NA, os isolados com letra inicial “K” do Meio de King e “TSA” da própria sigla do meio TSA.

### **3.2. Determinação em placa da capacidade de degradação de Petróleo e derivados**

A determinação da capacidade de degradação de petróleo e derivados foi realizada a partir da metodologia descrita por Peixoto & Vieira (2005) com modificações, inoculando as bactérias isoladas em tubos contendo 5 mL de Meio Mínimo acrescido de 1% de Glucose e 0,1% de Extrato de Levedura por 24 a 72 horas em shaker a 30°C. Para preparo do inóculo, uma alíquota foi retirada a cada tempo de incubação (24, 48 e 72 horas).

Os microrganismos tiveram sua concentração padronizada para o tubo nº 3 da escala de Mac Farland. Após a padronização, 1 mL da suspensão de microrganismos foi centrifugada a 10.000 rpm por 5 minutos a 10°C, retirado o

excesso do sobrenadante, acrescentado 1 mL de solução salina a 0,5% e novamente centrifugado nas mesmas condições. Foi retirado o excesso do sobrenadante e acrescentado 1 mL de Meio Mínimo.

Foi montada uma mistura teste contendo 20 µl da suspensão com os microrganismos, adicionados a 168 µl de Meio de cultura Mínimo, 12 µl de solução de sal de sódio de 2,6-dicloroindofenol, DCPIP (Meloan & Pomeranz 1973), e 2 µl de petróleo ou dos derivados testados: óleo queimado, óleos lubrificantes de diferentes viscosidades (20W40, 20W50, 5W50 e 15W40, Lubrax), óleo Diesel e gasolina. As amostras de petróleo foram cedidas ao LAMAB pela PETROBRAS.

A mistura foi inoculada em placas de acrílico (tipo ELISA) com 96 poços, previamente tratadas com luz Ultra Violeta (UV) por 30 minutos. Além da mistura teste, o experimento conteve um controle positivo (148 µl de Meio Mínimo + 12 µl de solução de DCPIP + 20 µl de solução de Glucose 10% + 20 µl de suspensão de microrganismo em teste) e um controle negativo (168 µl de Meio Mínimo + 20 µl de suspensão de microrganismo + 12 µl de solução de DCPIP). As placas de teste foram incubadas a 30°C, com leituras realizadas em 24, 48 e 72 horas após início da incubação.

A solução de DCPIP tem coloração azul escuro e, após uma reação de óxido-redução, torna-se incolor. No teste em placa foi observada também uma coloração azul claro, que após maior período de incubação, se tornou incolor. A partir desses dados, a leitura do teste foi dada como positiva pela descoloração total do DCPIP e a existência de uma degradação parcial quando houve presença de coloração azul claro. A permanência da coloração azul escuro no controle negativo durante todo o período de incubação confirma que não houve qualquer outra reação que provocasse a descoloração do DCPIP além das reações de redução provenientes da degradação do petróleo e dos outros derivados em teste.

### **3.3. Teste para produção de ácido indol-acético (AIA)**

O teste de produção de ácido indol-acético foi realizado seguindo o método descrito por Bric et al. (1991) adaptado. As amostras foram inoculadas em meio TSA enriquecido com triptofano, coberto com membrana de nitrocelulose, por 48 horas a 30°C. Para leitura, a membrana de nitrocelulose foi corada com solução

de Salkowski (Gordon & Weber 1951), sendo que a presença de halo avermelhado foi indicativo de resultado positivo.

### **3.4. Teste para solubilização de fosfatos**

O teste de solubilização de fosfatos foi realizado com meio TSA, acrescido com soluções a base de fosfato de potássio dibásico ( $K_2HPO_4$ ), cloreto de cálcio ( $CaCl_2$ ) e hidróxido de sódio (NaOH) (Katznelson & Bose 1959) modificado. As amostras foram inoculadas e então incubadas a 30°C por 48 horas. As colônias que formam halo claro ao seu redor são consideradas solubilizadoras de fosfatos.

### **3.5. Teste para fixação de nitrogênio**

A capacidade de fixar nitrogênio foi testada segundo a metodologia descrita por Döbereiner et al. (1995), a partir do inóculo das amostras em meios livres de nitrogênio e teste de redução de acetileno. Os meios utilizados foram NFb, LGI, LGD e JNFb líquidos e semi-sólidos. As amostras foram inicialmente inoculadas em meios líquidos, incubadas a 30°C por 24 horas, quando foi observado crescimento. Uma alíquota desse meio líquido com crescimento bacteriano foi transferida para o respectivo meio semi-sólido em frascos de vidro, sendo estes lacrados e incubados por 24 horas a 30°C.

Para confirmação da atividade da enzima nitrogenase, responsável pelo processo de fixação de  $N_2$ , foi realizado teste de redução de acetileno. Após o crescimento, com uma seringa foi retirado 1 mL da fase aérea do frasco e injetado 0,6 mL de gás acetileno e estes foram novamente incubados, por 72 horas a 30°C. Foram feitos dois frascos como controle positivo para acetileno (meio semi-sólido + gás acetileno) e dois frascos para controle positivo para etileno (meio semi-sólido + gás etileno).

Uma amostra de 1 mL foi retirada da fase aérea após esse período de incubação e injetada em cromatógrafo a gás Shimadzu GC -14A, com coluna Porapak - N80/100-INOX a 70°C, injetor a 180°C e detector de ionização de chama a 230°C (Turner & Gibson 1980). A leitura positiva é confirmada se houver a presença de gás etileno na fase aérea após a incubação por 72 horas, proveniente da redução do acetileno, que é detectada por cromatografia.

### **3.6. Determinação de atividade enzimática**

Foram realizados testes para determinação de oito tipos de atividade enzimática, com oito amostras: amilolítica, celulolítica, endoglucanase, esterásica, lipolítica, pectinolítica, proteolítica e  $\beta$ -glucosidase. Para a inoculação foi utilizado o inoculador de Stryer, sendo 30  $\mu$ l da amostra crescida em caldo BHI colocados nos poços no inoculador. Após o inóculo nas placas com meios de teste (Anexo 9.1) estas foram deixadas em temperatura ambiente por 15 minutos antes da incubação em estufa. Para todos os testes as amostras foram incubadas por 48 horas a 30°C, sendo testados 4 isolados por placa de Petri com o meio de teste. A leitura de todos os testes de atividade enzimática foi baseada no cálculo de índice enzimático (IE), obtido através da divisão da medida do diâmetro do halo de degradação pela medida do diâmetro da colônia (Hankin et al. 1971, Hankin & Anagnostakis 1975, Oliveira et al. 2006).

#### **3.6.1. Produção de amilases**

Para determinação de atividade amilolítica foi utilizado o meio Agar nutriente (NA) acrescido de 0,2% de amido solúvel (Hankin & Anagnostakis 1975). A leitura foi realizada após a exposição da placa a vapor de iodo metálico, sendo a presença de halo claro ao redor da colônia indicativo positivo para produção da enzima.

#### **3.6.2. Produção de celulasas**

Para verificação de atividade celulolítica as amostras foram incubadas em meio a base de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , extrato de levedura, Avicel e ágar, sendo a formação de halo claro ao redor da colônia indicador positivo (Stamford et al. 1998).

#### **3.6.3. Produção de endoglucanases**

Para teste de atividade de endoglucanase as amostras foram incubadas em meio mínimo acrescido de 0,1% de extrato de levedura e 0,1% de carboximetilcelulose (Melo 2000). A leitura é feita com a observação de halos claros ao redor da colônia após tratamento da placa com solução 1% de brometo de cetiltrimetil amônio e incubação com esta solução por 4 horas a 4°C.

#### **3.6.4. Produção de esterases e lipases**

O teste de atividade esterásica foi feito a partir da metodologia descrita por Sierra (1957), incubando as amostras em meio com bacto peptona, NaCl,  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  e agar, suplementado com 1mL de Tween 20 a concentração de 1% (v/v).

O teste de atividade lipolítica segue o mesmo protocolo do teste de atividade esterásica (Sierra 1957), mas a suplementação é feita com Tween 80. Para ambas as enzimas a leitura positiva é indicada pela presença de halos claros ao redor das colônias.

#### **3.6.5. Produção de pectinases**

A atividade pectinolítica foi medida após incubação em meio à base de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pectina,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2$ , extrato de levedura e água. Para a leitura as placas foram recobertas por uma solução de brometo de hexadeciltrimetil amônio (CTAB) a 1% (v/v), incubadas por uma hora a temperatura ambiente e depois foram lavadas com água destilada esterelizada (Hankin et al. 1971). A presença de halo claro ao redor da colônia indica resultado positivo.

#### **3.6.6. Produção de proteases**

A atividade proteolítica foi feita a partir de incubação em meio Caldo Nutriente, glucose, leite desnatado e ágar (Vieira 1999), sendo a leitura

realizada após exposição a solução de ácido acético 5%, verificando-se a presença de halos claros ao redor das colônias como resultado positivo.

### **3.6.7. Produção de $\beta$ -glucosidases**

Para teste de atividade de  $\beta$ -glucosidase as amostras foram incubadas em placas contendo meio mínimo acrescido de 0,1% de extrato de levedura, 0,2% de esculina e 0,05% de citrato férrico de amônia (Melo 2000). A leitura positiva foi realizada observando a formação de halos escuros ao redor das colônias.

### **3.7. Teste de produção de extratos bacterianos com atividade antimicrobiana**

A produção de substâncias com possível atividade antimicrobiana seguiu a metodologia descrita por Romeiro (1989), com modificações. Os isolados foram inoculados em meio sólido de Kado, utilizando zaragatoa, em toda a superfície do meio. Após incubação por 48 horas a 30°C, as placas que apresentaram crescimento foram expostas a luz ultravioleta por 30 minutos para inativação de células vivas, e então o meio foi cortado e transferido para tubos. Em cada tubo foi colocado 30 mL de água destilada esterilizada e incubado por uma hora a temperatura ambiente. Para a extração das substâncias produzidas pelas bactérias, a fase líquida foi separada da fase sólida por centrifugação. O sobrenadante resultante, onde estão os extratos, foram filtrados com membranas Millipore (0.25  $\mu$ m) e mantidos a -20°C até a utilização.

A atividade antimicrobiana dos extratos foi determinada pela metodologia descrita por Santos (1993), com modificações. Cepas indicadoras provenientes de estoque do LAMAB foram previamente cultivadas em caldo BHI por 24 horas a 30°C, e então 100  $\mu$ L foram diluídos em solução salina 0,85% para atingir a turbidez do tubo número 0,5 da escala de MacFarland. As bactérias indicadoras utilizadas foram *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. aureus* meticilina resistente (MRSA) isolado de ambiente hospitalar, *Staphylococcus aureus* MRSA isolado da comunidade, *Pseudomonas*

*aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e *Serratia marcescens* ATCC 14756.

Em placas contendo Agar Mueller Hinton estas cepas indicadoras foram inoculadas em toda a superfície do meio, utilizando zaragatoa esterilizada. Após a inoculação das cepas indicadoras, poços de 5 mm de diâmetro foram feitos e nestes foram inoculados 30 µL dos extratos previamente obtidos das amostras, então essas placas foram incubadas por 24 horas a 30°C. A presença de halos ao redor dos orifícios contendo extratos foi considerada um indicativo positivo de inibição do crescimento das bactérias indicadoras testadas.

### **3.8. Análise de biodegradação de gasolina por cromatografia**

A análise da degradação de gasolina pelos microrganismos isolados seguiu o método proposto por Cunha & Leite (2000), com modificações (Peixoto & Vieira 2005). Os microrganismos a serem testados foram crescidos em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio mínimo acrescido de 1% de glucose e 0,1% de extrato de levedura. Uma alíquota desse crescimento foi inoculada em tubos com 5 mL de meio mínimo acrescido com 5% de gasolina (v/v). Para cada amostra foram feitos três tubos teste, cada um retirado com o tempo de incubação de 0, 48 e 72 horas. Para a manutenção do crescimento aeróbio foi acrescentado aos meios em teste 200 µL de peróxido de hidrogênio.

Para cada tempo de incubação foi feito um tubo controle, com meio mínimo acrescido de gasolina sem o inóculo do microrganismo, mantido sob as mesmas condições de incubação dos tubos em teste. Após os diferentes períodos de incubação, o material foi centrifugado e o sobrenadante estocado em tubos lacrados pra análise de seus produtos.

Um teste amplamente utilizado para a detecção e quantificação dos hidrocarbonetos, devido a sua alta precisão e sensibilidade, é a cromatografia gasosa. Este método proporciona uma análise de alta eficiência na caracterização de hidrocarbonetos presentes no meio (Prantera et al. 2002, Bonfim 2006, Mariano et al. 2007).

A análise dos produtos de biodegradação da gasolina foi realizada por cromatografia, seguindo o protocolo proposto por Bonfim (2006), utilizando cromatógrafo a gás Agilent HP6890 equipado com detector FID (Detector de Ionização por Chama) e injetor split/splitless. As condições cromatográficas foram de injetor a temperatura de 270°C, modo de injeção split, razão de split 1: 20, volume de injeção 1 µL para a fase líquida e 100 µL para fase vapor. O forno teve temperatura inicial de 30°C, sendo aquecido à 40°C por minuto até 110°C, em seguida 15°C/minuto até 200°C, com tempo total de análise de 8 minutos. O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio, e o detector teve uma temperatura de 270°C, com vazão de ar sintético de 400 mL/minuto e vazão de hidrogênio de 40 mL/minuto. A coluna cromatográfica utilizada foi DB-1 Fast-HRGC, com 20 m de comprimento, 0,10 mm de diâmetro interno e 0,4 µm de espessura de filme.

### **3.9. Extração de DNA**

A extração de DNA foi realizada a partir dos isolados com crescimento em meio Agar nutriente (NA) por 24 horas, seguindo o protocolo proposto por Van Soolingen et al. (1994) com modificações.

Duas a três colônias foram retiradas da placa e ressuspensas em tubos contendo 400 µL de tampão TE com 8 µL de solução de lisozima (20 µg/mL) e então incubadas em banho-maria por 1 hora e 30 minutos a 37°C. Após este período, foi adicionado ao tubo 70 µL de SDS a 10% e 12 µL de solução de proteinase K (20 µL/mL), com nova incubação a 56°C por 10 minutos. Após esta incubação, foram adicionados 100 µL de NaCl a 5M seguidos de 80 µL de solução CTAB/NaCl. O tubo foi agitado lentamente até a solução aparentar aspecto leitoso e então novamente incubada por 10 minutos a 65°C.

Em seguida foi adicionado 650 µL de clorofil, o tubo foi agitado por 30 segundos, e então submetido a centrifugação por 5 minutos a 12.000 g. O sobrenadante contendo o DNA em suspensão foi transferido para outro tubo, precipitado com 400 µL de isopropanol e homogeneizado. Houve então uma incubação a -20°C por 24 horas. Posteriormente a esta incubação, o tubo foi centrifugado a 16.000g por 20 minutos, então o sobrenadante foi descartado e

houve lavagem com etanol 70% gelado. Após a secagem o DNA extraído foi ressuspendido em 50 µL de água MiliQ.

A confirmação do processo de extração foi realizada em gel de agarose 1%, utilizando uma alíquota de 5 µL do material extraído e 1 µL de tampão de amostra. O restante do material extraído foi estocado em freezer a -20°C.

### **3.10. Amplificação para a região codificante de 16S rRNA**

A região do DNA que codifica para o gene 16S rRNA foi amplificada pela reação de polimerase em cadeia (PCR), com os oligonucleotídeos iniciadores 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1541r (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (Weisburg et al. 1991) modificado. As amplificações por PCR tiveram um volume final de 50 µL, contendo: 35,5 µL de água, 5 µL de tampão 10X para a enzima Taq polimerase (CenBiot), 1,5 µL de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) (50mM) (CenBiot), 1 µL de solução de cada oligonucleotídeo iniciador (10µM) (Biosource), 4 µL de solução dNTP (2,5mM) (Ludwig Biotec), 1 µL de Taq polimerase (5U) (CenBiot) e 1 µL de DNA extraído.

A PCR foi iniciada com 3 minutos de desnaturação a 94°C, seguido de 30 ciclos com desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos, e extensão final a 72°C por 10 minutos (Garcia 2006). Uma alíquota de 5 µL do produto da PCR foi analisada em gel de agarose 1%, junto a 1 µL de tampão de amostra (RBC), utilizando como padrão de tamanho de DNA o marcador molecular 1kb Sharp DNA Marker (RBC).

### **3.11. Purificação do produto de PCR e Seqüenciamento**

Para a purificação do produto de PCR foi utilizado o E.Z.N.A. Cycle – Pure Kit da Omega Bio-Tek.

O seqüenciamento foi realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano - Universidade de São Paulo (USP), com o sequenciador MegaBACE 1000, DYEnamic ET Dye Terminator Kit (com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase) código US81090. As seqüências foram analisadas pelo software Sequence Analyser utilizando o Base Caller Cimarron 3.12.

### **3.12. Análise do Seqüenciamento e Identificação**

Para a análise dos produtos obtidos através do seqüenciamento, as sequencias recebidas foram comparadas com as sequencias presentes no banco de dados GenBank NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). O programa Chromas 2.33 foi utilizado para editar as sequencias, que então foram comparadas no banco de dados.

## **4. Resultados**

## 4. RESULTADOS

Foram isoladas inicialmente 23 bactérias endofíticas presentes em gramíneas coletadas em ambiente impactado com lama asfáltica. No entanto, não foi possível manter a maioria das amostras, restando 9 delas para a realização dos testes. Isto pode ser devido a dificuldade de reproduzir em laboratório as reais condições ambientais onde esses microrganismos vivem, dificultando a estimativa da real diversidade microbiana endofítica (Rozsak & Colwell 1987, Pace 1997).

A coloração de Gram constatou a presença de bactérias gram positivas e negativas, com variados tipos morfológicos, representadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Resultados da coloração de Gram em bactérias endofíticas isoladas de Cerrado.

Bactérias Endofíticas	Coloração de Gram	Morfologia
AB2.3	+	Bacilo
AB4	+	Bacilo
AB5	-	Bastonete
AB7.1	+	Coco
KB2	-	Bastonete
K2	-	Bastonete
K3	+	Coco
K5.1	-	Bastonete
TSA2.2	+	Bacilo

### 4.1. Teste em placa da capacidade de degradação de hidrocarbonetos de Petróleo e derivados

O teste realizado para degradação de hidrocarbonetos de petróleo e derivados apresentou resultado significativos. Os resultados encontram-se representados nas tabelas 2,3 e 4.

**Tabela 2.** Perfil de degradação dos microrganismos com incubação em shaker por 24 horas e leitura com 24 horas de crescimento na placa.

MO	C(+)	OQ	20W40	20W50	5W50	15W40	C(-)	P37*	P38*	P40*	D	G
AB2.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AB4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
AB5	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
AB7.1	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
KB2	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
K2	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
K3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K5.1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TSA2.2	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-

Legendas: MO = microrganismo; C(+) = controle positivo; OQ = óleo queimado; 20W40, 20W50, 5W50 e 15W40 = óleo lubrificante; C(-) = controle negativo; P37, P38 e P40 = frações de petróleo; D = óleo diesel; G = gasolina; + = degradação positiva; - = ausência de degradação. \*Tipos de petróleo: P37(°API 37.7), P38 (°API 19.6), P40 (°API 18.6). °API =  $(141.5/g) - 131.5$  sendo “g” a densidade relativa do petróleo a 15.6°C. Fonte: PETROBRAS.

**Tabela 3.** Perfil de degradação dos microrganismos com incubação em shaker por 24 horas e leitura com 48 horas de crescimento na placa.

MO	C(+)	OQ	20W40	20W50	5W50	15W40	C(-)	P37*	P38*	P40*	D	G
AB2.3	+	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-
AB4	+	-	-	-	X	-	-	-	-	-	+	-
AB5	+	-	-	-	X	-	-	+	+	+	+	+
AB7.1	+	-	-	-	X	-	-	-	+	-	-	-
KB2	+	-	-	-	X	X	-	+	+	+	-	+
K2	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
K3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K5.1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TSA2.2	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-

Legendas: MO = microrganismo; C(+) = controle positivo; OQ = óleo queimado; 20W40, 20W50, 5W50 e 15W40 = óleo lubrificante; C(-) = controle negativo; P37, P38 e P40 = frações de petróleo; D = óleo diesel; G = gasolina; + = degradação positiva; - = ausência de degradação; X = degradação parcial. \*Tipos de petróleo: P37(°API 37.7), P38 (°API 19.6), P40 (°API 18.6). °API =  $(141.5/g) - 131.5$  sendo “g” a densidade relativa do petróleo a 15.6°C. Fonte: PETROBRAS.

**Tabela 4.** Perfil de degradação dos microrganismos com incubação em shaker por 24 horas e leitura com 72 horas de crescimento na placa.

MO	C(+)	OQ	20W40	20W50	5W50	15W40	C(-)	P37*	P38*	P40*	D	G
AB2.3	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
AB4	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
AB5	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
AB7.1	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
KB2	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
K2	+	-	X	X	X	-	-	+	+	+	+	+
K3	+	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-
K5.1	+	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-
TSA2.2	+	+	-	-	X	-	-	+	+	+	+	-

Legendas: MO = microrganismo; C(+) = controle positivo; OQ = óleo queimado; 20W40, 20W50, 5W50 e 15W40 = óleo lubrificante; C(-) = controle negativo; P37, P38 e P40 = frações de petróleo; D = diesel; G = gasolina; + = degradação positiva; - = ausência de degradação; X = degradação parcial. \*Tipos de petróleo: P37(°API 37.7), P38 (°API 19.6), P40 (°API 18.6). °API = (141.5/g) – 131.5 sendo “g” a densidade relativa do petróleo a 15.6°C. Fonte: PETROBRAS.

Analisando as Tabelas 2, 3 e 4 observamos que o isolado AB2.3 não apresentou crescimento com 24 de incubação. Seu crescimento foi mais lento quando comparado aos demais isolados (48 horas), positivando para o teste do óleo lubrificante 5W50 e gasolina após incubação de 72 horas. A amostra AB4 apresentou resultado positivo com 24 horas para óleo Diesel e após 72 horas de incubação para óleo 5W50.

As amostras AB5, KB2, K2 e TSA2.2 apresentaram resultados positivos com 24 horas de crescimento em placa para os diferentes tipos de petróleo testados. Os isolados AB5 e K2 apresentaram também resultados positivos para óleo Diesel e gasolina com 24 horas. KB2 foi positivo também para gasolina com 24 horas de crescimento. Já o isolado TSA2.2 apresentou positividade também para óleo queimado e óleo Diesel com 24 horas.

#### **4.2. Teste para produção de ácido indol-acético (AIA) e solubilização de fosfatos**

Entre os isolados testados, somente KB2 apresentou resultado positivo para produção de AIA, observado por halo avermelhado após coloração da

membrana de nitrocelulose com solução de Salkowski (Gordon & Weber 1951). Nenhum isolado apresentou resultados característicos de bactérias solubilizadoras de fosfatos.

#### 4.3. Teste para fixação de nitrogênio

Todos os isolados testados apresentaram crescimento nos meios de teste livres de nitrogênio semelhantes ao de bactérias diazotróficas, conhecidas como fixadoras de nitrogênio. No entanto, os isolados testados não apresentaram resultados positivos para o teste de redução do acetileno, que confirma a atividade da enzima nitrogenase, responsável pelo processo de fixação.

#### 4.4. Determinação de atividade enzimática

Os testes para determinação da atividade enzimática detectaram atividade para as enzimas amilase, esterase, lipase, protease e  $\beta$ -glucosidase (Tabela 5). Não houve resultados positivos para as atividades de endoglucanases, pectinases e celulasas. O isolado AB4 se apresentou como produtor de diversas enzimas testadas, destacando a produção de  $\beta$ -glucosidase. Os isolados AB5 e K2 não apresentaram halos de degradação.

**Tabela 5.** Índice Enzimático produzido pelos isolados endofíticos testados.

ATIVIDADE ENZIMÁTICA	ISOLADOS					
	AB4	AB7.1	K3	K5.1	KB2	TSA2.2
Esterásica	1,7	2,4	2,0	1,2	-	2,0
$\beta$ -glucosidase	3,0	-	-	-	2,3	3,0
Proteolítica	1,2	1,2	1,4	3,6	-	1,4
Amilolítica	1,3	-	-	-	-	-
Lipolítica	-	1,4	1,4	-	-	-

\* Índice Enzimático calculado em mm.

#### 4.5. Teste de produção de extratos com atividade antimicrobiana

Os extratos obtidos dos isolados testados apresentaram variados perfis de atuação contra as bactérias indicadoras testadas. Os isolados AB5, K2 e

K5.1 apresentaram atividade antimicrobiana frente à maioria das bactérias indicadoras testadas. O perfil de atuação dos extratos está representado na Tabela 6.

**Tabela 6.** Perfil de atividade antagônica dos extratos das bactérias endofíticas frente às cepas indicadoras.

BACTÉRIAS INDICADORAS	ISOLADOS ENDOFÍTICOS			
	AB5	K2	K5.1	TSA2.2
<i>S. aureus</i>	9,0	7,0	18,0	-
<i>S. aureus</i> MRSA (hospitalar)	8,0	7,0	15,0	-
<i>S. aureus</i> MRSA (comunidade)	-	-	19,0	-
<i>S. marcescens</i>	-	-	9,0	-
<i>B. subtilis</i>	13,0	12,0	14,0	-
<i>M. luteus</i>	12,0	9,0	15,0	-
<i>B. cereus</i>	10,0	10,0	13,0	9,0

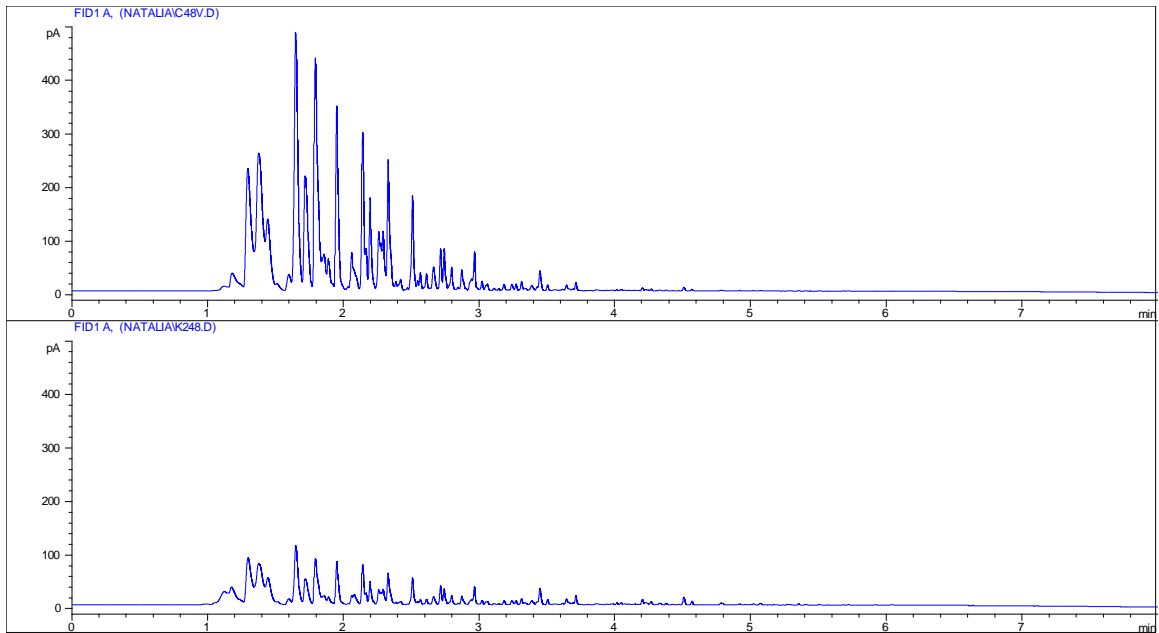
\*Halos de inibição medidos em mm.

Não foi detectada atividade contra *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium e *Pseudomonas aeruginosa*. Os isolados AB4, AB7.1, K3 e KB2 não demonstraram atividade frente às bactérias indicadoras testadas.

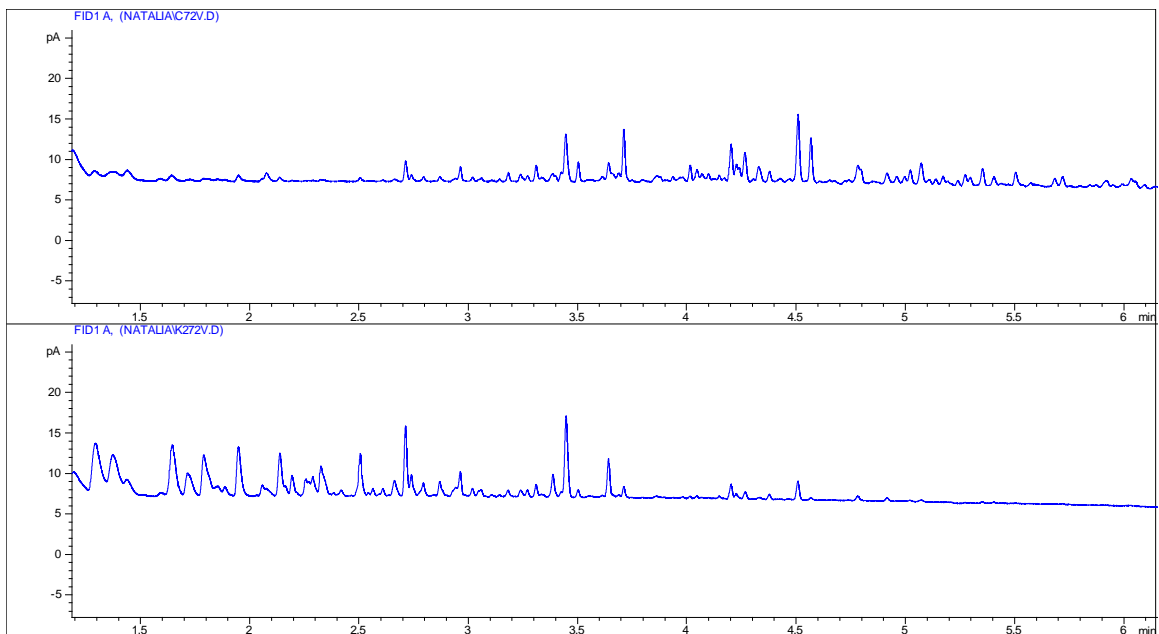
#### 4.6. Análise de biodegradação de gasolina por cromatografia

O teste de cromatografia realizado com os isolados testados apresentou confirmação dos dados obtidos nos testes de degradação em placa. No teste em placa para detecção da capacidade de degradação de petróleo e derivados pelos microrganismos isolados foram encontradas três amostras (AB5, K2 e KB2) que apresentaram resultados positivos para a degradação da gasolina. Os dados obtidos através da cromatografia da fase vapor estão demonstrados nas figuras 4, 5, 6 e 7.

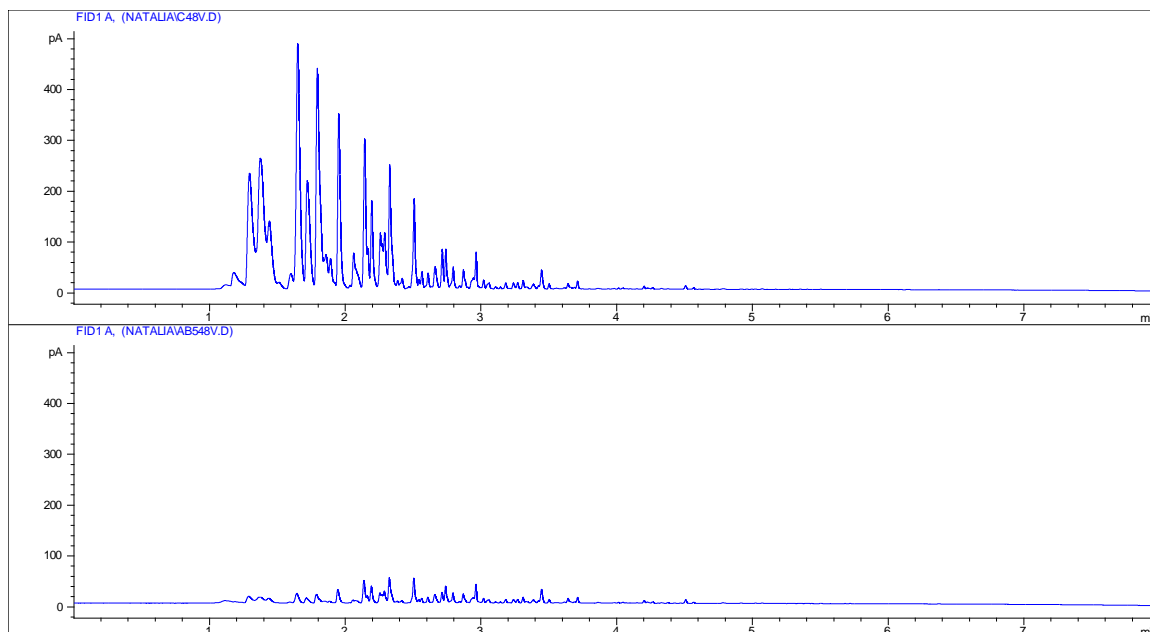
Os cromatogramas com o controle para a presença da gasolina são característicos desse composto, segundo análise de Bonfim (2006). Comparados aos controles, os cromatogramas das amostras apresentaram variados perfis de degradação, principalmente para hidrocarbonetos leves.



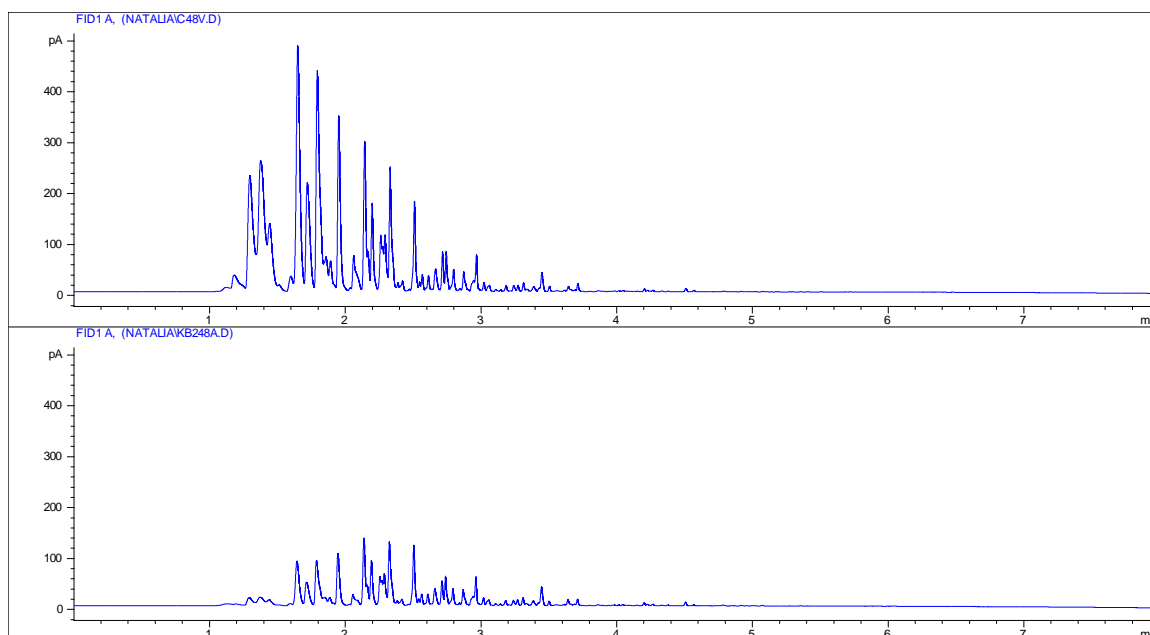
**Figura 4.** Cromatograma referente ao perfil de degradação de gasolina pelo isolado K2 após 48 horas de incubação. Legendas: C48V – controle; K248 – amostra.



**Figura 5.** Cromatograma referente ao perfil de degradação de gasolina pelo isolado K2 após 72 horas de incubação. Legendas: C72V – controle; K272V – amostra.



**Figura 6.** Cromatograma referente ao perfil de degradação de gasolina pelo isolado AB5 após 48 horas de incubação. Legendas: C48V – controle; AB548V – amostra.



**Figura 7.** Cromatograma referente ao perfil de degradação de gasolina pelo isolado KB2 após 48 horas de incubação. Legendas: C48V – controle; KB248A – amostra.

De acordo com a análise dos cromatogramas expostos para a amostra K2, houve degradação de hidrocarbonetos leves após 48 horas de incubação (C<sub>4</sub>-C<sub>7</sub>) (Figura 4), e em 72 horas houve aparente degradação de hidrocarbonetos médios (C<sub>8</sub>-C<sub>12</sub>) e aromáticos (C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) a frações mais leves (Figura 5). As amostras AB5 e

KB2 apresentaram perfis característicos de degradação de hidrocarbonetos leves (Figuras 6 e 7).

#### 4.7. Análise de Sequenciamento

Os dados obtidos após a comparação das sequências no banco de dados estão representados na Tabela 7.

**Tabela 7.** Identificação dos isolados por comparação das sequências no banco de dados GenBank.

Isolado	Resultado BLAST	Nº de acesso	% Identidade
AB4	<i>Bacillus cereus</i>	<b>U500VRPU016</b>	100
AB5	*	<b>U50JWBB6013</b>	*
AB7.1	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	<b>U50SZM0U016</b>	99
K2	*	<b>U53JAHD1011</b>	*
K3	*	<b>U543P181016</b>	*
KB2	<i>Pseudomonas sp.</i>	<b>U548U88U016</b>	87

\* Baixo índice de similaridade encontrado.

## **5. Discussão**

## 5. DISCUSSÃO

A análise bibliográfica, em geral, sugere que parte das informações sobre microrganismos endofíticos trata de fungos e pouco se conhece sobre as bactérias e o seu potencial. Ainda não se sabe o real papel da comunidade endofítica, sua diversidade é pouco caracterizada e estima-se que muito ainda tem a ser estudado e descoberto sobre microrganismos desse grupo.

Em estudo de diversidade de bactérias endofíticas de arroz (*Oriza sativa* L.), Sun et al. (2008) detectaram grande diversidade de bactérias do grupo *Archaea* e de bactérias com alta similaridade a grupos não cultiváveis, sugerindo alta diversidade endofítica ainda não diagnosticada.

Após o sequenciamento da região 16S DNA dos microrganismos isolados, estes foram identificados como: *Bacillus cereus* (AB4), *Staphylococcus pasteurii* (AB7.1) e *Pseudomonas* sp. (KB2). Estes dados confirmaram a classificação morfo-tintorial previamente realizada pela coloração de Gram. Para os isolados AB5, K2 e K3 não foram encontrados índices de similaridade significativos no banco de dados utilizado. O sequenciamento e análise bioquímica destas amostras serão repetidos, no entanto, sugere-se que esses isolados sejam representantes de novas espécies ainda não diagnosticadas.

Existem diversas estratégias para a remoção de contaminantes ambientais, como descontaminação química e biorremediação. Poluentes orgânicos podem ser removidos enzimaticamente, enquanto metais pesados necessitam do contato direto da célula com o contaminante, que o capta do meio, metabolizando até a completa remoção física do mesmo. Como exemplo temos a *Pseudomonas putida*, que é utilizada para a remoção de cádmio quando inoculada em regiões da rizosfera de trigo (*Triticum sativum*), milho (*Zea* sp.) e girassol (*Helianthus annuus*) (Wu et al. 2006).

Testes rápidos para a detecção da degradação microbiológica de petróleo e derivados são de grande interesse. Um teste de grande rapidez e facilidade de execução é baseado na reação de redução do DCPIP ocasionando sua descoloração. Este indicador redox (DCPIP) foi utilizado em diversos trabalhos, como os citados por Hanson et al. (1993), Peixoto & Vieira (2005) e Mariano et al. (2007). Van Aken et al. (2004) observaram que uma bactéria endofítica do gênero

*Methylobacterium* apresenta potencial para remediação de solo contaminado com o explosivo 2,4,6-trinitro-tolueno (TNT), através da reação de redução do DCPIP.

Entre os isolados testados neste trabalho, as bactérias gram negativas apresentaram os melhores resultados no teste de degradação de petróleo e derivados, apresentado resultados positivos para ao menos um dos compostos testados. Observamos também uma variação do tempo de incubação para detecção de atividade degradativa, variando de 24 a 72 horas. Dos isolados testados, somente K3 e K5.1 não apresentaram resultados positivos (Tabela 3).

Quando a leitura final (72 horas) foi realizada observamos que as bactérias analisadas apresentavam um perfil de degradação diferenciado quando comparado com os resultados de 24 horas de crescimento (Tabela 2 e 4). Estes resultados podem ser devidos a complexidade de constituição dos derivados de petróleo analisados. Wongsu et al. (2004) sugerem em seus experimentos de teste para degradação *in vitro* de derivados de petróleo que o tempo gasto pelos isolados testados foi de uma a duas semanas, tendo *Pseudomonas aeruginosa* apresentado os melhores resultados para a atividade degradativa. Como o teste com DCPIP é um teste rápido e realizado em placa em uma mini escala, a leitura com 24 a 72 horas de incubação apresenta resultados positivos demonstrando sua real potencialidade como um teste para seleção de microrganismos degradadores de diferentes compostos.

Peixoto & Vieira (2005) sugerem que o teste em placa utilizando DCPIP é um método de triagem de microrganismos com capacidade degradativa simples e de baixo custo, podendo ser amplamente padronizado e utilizado para detecção da degradação de compostos de interesse.

Em geral, as bactérias testadas não apresentaram resultados positivos para degradação de óleos lubrificantes, exceto para o óleo lubrificante 5W50 e para o óleo queimado (TSA2.2). Seabra (2008) considera que os óleos lubrificantes, devido a presença de acenafthenos, possuem a menor taxa de degradação quando comparado aos demais derivados de petróleo.

Em testes *in situ* realizados por Mariano et al. (2008) os melhores resultados de degradação foram obtidos com uso de consórcios microbianos. Seabra (2008) em uma revisão de literatura, sugere que consórcios sejam utilizados quando em teste de degradação *in situ*. Entretanto, para que consórcios microbianos sejam utilizados faz-se necessário o conhecimento da capacidade

degradativa individual dos isolados a serem utilizados para que ocorra um sinergismo de degradação. Este conhecimento individual pode ser obtido em teste rápido utilizando o DCPIP.

A cromatografia é amplamente utilizada para a quantificação e caracterização da composição de hidrocarbonetos. Diversos trabalhos citam a técnica como teste de confirmação de degradação de hidrocarbonetos por microrganismos (Cunha & Leite 2000, Ramos 2006, Mariano et. al. 2007). Este teste realizado com os microrganismos isolados confirma a eficiência destes isolados em processos de biodegradação de gasolina, assim como a eficiência do teste utilizando o DCPIP.

Para todos os isolados a fase vapor foi considerada o melhor parâmetro para comparação do que a fase líquida. Na fase líquida não foi possível detectar a presença da gasolina no controle ou tubos teste com as amostras, ao contrário da fase vapor, onde o cromatograma apresentou características desse composto comparado a análises descritas na literatura (Bonfim 2006).

A gasolina comercializada no Brasil apresenta etanol como composto de oxigenação, o que pode facilitar sua solubilização em compostos aquosos. Isso possivelmente ocorreu no teste realizado, já que a composição do meio de cultura utilizado é aquosa, e impossibilitou a detecção da gasolina em alguns tubos. Segundo Österreicher-Cunha et. al. (2009), a presença do etanol junto a gasolina pode afetar a infiltração, distribuição e degradação final dos compostos da gasolina em contaminações no solo, devido a sua grande solubilização em compostos aquosos junto aos compostos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno), o que retarda sua degradação.

O tempo de incubação de 48 horas foi considerado ideal para a análise por cromatografia, pois tanto a análise dos controles quanto das amostras foi considerada satisfatória. Na análise do controle e amostras com o tempo de incubação de 72 horas não foi possível detectar a presença da gasolina, possivelmente devido a este tempo de incubação ser longo o suficiente para que grande parte deste composto seja solubilizado no meio teste, e parte sofrer volatilização.

A atuação dos microrganismos no ciclo e remediação de hidrocarbonetos no ambiente é indiscutível, sendo que estes são muito encontrados em ambientes

contaminados (Labud et al. 2007), embora sua atuação dependa do contaminante presente e sua disponibilidade para ser utilizado como fonte de carbono.

Os testes realizados sugerem que os microrganismos isolados podem ser utilizados para biorremediação de hidrocarbonetos de petróleo e dos derivados testados, no entanto, para uso *in situ* ainda são necessários estudos para melhor conhecimento de seus produtos metabólicos. Sua eficácia será diretamente influenciada pelas condições ambientais as quais forem submetidos, como disponibilidade de nutrientes e do contaminante. Apesar do conhecimento da existência do processo de biodegradação de contaminantes, este ainda não é totalmente compreendido, e pode não ser totalmente eficaz na ausência de outros fatores necessários ao metabolismo celular. A adição de nitrogênio e fósforo é comprovadamente benéfica para o processo de remediação (Steffensen & Alexander 1995), pois sua ausência é considerada um dos fatores limitantes ao metabolismo celular na biodegradação de compostos como petróleo (Gallego et al. 2001, Van Hamme et al. 2003).

A diversidade da comunidade endofítica ainda tem muito a ser elucidada. Algumas bactérias diazotróficas como *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Azoarcus* spp. e *Azospirillum* spp. (Chaintreuil et al. 2000), antes descritas somente com localização na região de rizosfera, agora também são descritas em regiões endofíticas.

A enzima responsável pelo processo de fixação de nitrogênio, a nitrogenase, é composta por duas unidades, a Ferro-proteína e Molibdênio-Ferro-proteína. Durante o processo de redução do  $N_2$ , essa enzima é auxiliada por uma molécula de ferridoxina, que transporta elétrons para a unidade Fe-proteína, que então reduzida transfere o elétron para a Mo-Fe-proteína, e esta unidade acumula os elétrons até a redução de  $N_2$  a  $NH_3$ . Esta é a forma da nitrogenase 1 (clássica, codificada por genes *nif*), mas também existem outras formas alternativas, nitrogenase 2 (dependente de vanádio, codificadas por genes *vnf*) e nitrogenase 3 (alternativa, dependente apenas de ferro, codificada por genes *anf*) (Evans & Burris 1992).

Os diferentes metais presentes na estrutura da enzima sugerem que o Mo não é estritamente necessário, no entanto altera a especificidade dos substratos (Teixeira et al. 1998). A forma que contém vanádio é similar fisicamente a forma Mo-nitrogenase, no entanto quando submetida ao teste de redução do acetileno

ocorre a produção de etano ao invés de etileno (Scott et al. 1992), e geralmente essa forma alternativa é sintetizada quando molibdênio é ausente no meio (Teixeira et al. 1998).

A forma da nitrogenase clássica é a mais estudada, e ainda faltam testes para diagnóstico das formas alternativas. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem a presença de uma forma alternativa da enzima, pois as amostras cresceram em meios livres de nitrogênio após vários repiques, no entanto, não apresentaram resultados positivos para redução do acetileno. Para confirmação desses resultados é necessária a realização de mais testes complementares, como cromatografia para detecção de outros produtos ou seqüenciamento para verificar a presença de genes que codificam as outras formas da nitrogenase.

Existe uma estreita relação entre o nicho ocupado por um microrganismo e a características de suas enzimas intra e extracelulares (Gomes et al. 2007). Entre as bactérias testadas foram encontradas produtoras de esterases,  $\beta$ -glucosidases, proteases, lipases e amilases, sendo o isolado AB4 o produtor de maior variedade entre as enzimas testadas (Tabela 5). Este isolado, identificado como *Bacillus cereus*, corrobora com os dados da literatura que citam esta espécie como produtora de grande quantidade e variedade de enzimas (Heck et al. 2002, Carrim 2005, Anto et al. 2006).

Gonçalves (2007) e Vieira (1999) consideram que as amostras que apresentam o índice enzimático com valor igual ou maior que 1,0 são promissoras para a produção enzimática. Considerando este índice, todos os isolados testados, exceto AB5 e K2 que não apresentaram halos de degradação, podem ser considerados produtores em potencial (Tabela 5).

Não foi detectada a produção de pectinases entre as amostras testadas. Pectinases são enzimas capazes de hidrolisar a pectina presente na lamela média e parede primária de células vegetais (Gomes et al. 2007), o que auxiliaria a entrada do microrganismo nos vegetais. Essas enzimas são normalmente utilizadas na indústria alimentícia para extração e clarificação de sucos de frutas e produção de vinhos (Teixeira et al. 2000, Polizeli et al. 2006).

A produção de glucose, álcool e proteínas a partir de celulose são os principais alvos de estudo para aplicação de celulasas (Heck et al. 2002). As celulasas podem ser produzidas por bactérias e fungos, embora as bactérias ainda não sejam amplamente utilizadas (Ariffin et al. 2006), e podem ser aplicadas

nos variados processos industriais que envolvam utilização de material vegetal. Heck et al. (2002) sugerem, a partir de experimentos com produção de xilanases e celulases por amostras do gênero *Bacillus*, que bactérias podem ser tão boas produtoras de enzimas como os fungos.

A degradação total de celulose, principal composto encontrado na parede de células vegetais, é realizada por uma sucessão de reações com as enzimas endoglucanases, celulases e  $\beta$ -glucosidases, sendo a produção dessas enzimas variável de acordo com a disponibilidade de carbono no meio (De Vries & Visser 2001). A  $\beta$ -glucosidase atua na decomposição final da celulose (Matsuoka et al. 2003), responsável pela hidrólise de resíduos e formação de açúcares simples. A utilização de consórcios microbianos para produção de variadas enzimas em processos biotecnológicos parece promissora para melhoria de produção. Os isolados AB4 (*Bacillus cereus*), KB2 e TSA2.2 apresentaram atividade de  $\beta$ -glucosidase com elevados índices enzimáticos, o que sugere grande potencial para a utilização biotecnológica das mesmas.

As proteases são as enzimas com maior utilização em processos biotecnológicos industriais (Nascimento & Martins 2004, Naidu & Devi 2005). Estas enzimas são termoestáveis e produzidas por diversos organismos, como fungos, bactérias, animais e plantas, com inúmeras aplicações em indústrias de alimentos, couro, detergente, farmacêutica e tratamento de resíduos (Naidu & Devi 2005). Dos isolados testados somente KB2 não apresentou atividade proteolítica. Os isolados AB4 (*Bacillus cereus*) e TSA2.2 apresentaram os maiores Índices Enzimáticos sugerindo um potencial para futura aplicação biotecnológica.

A produção de amilases por microrganismos é fonte de pesquisa para utilização em processos de panificação, fermentação, solubilização de goma, indústria têxtil e branqueamento de papel (Anto et al. 2006, Kurosawa et al. 2006). Geralmente são termoestáveis, sendo as  $\alpha$ -amilases mais comumente encontradas e utilizadas. A atividade amilolítica foi observada somente para o isolado AB4 (*Bacillus cereus*).

Lipases e esterases são enzimas utilizadas para fins industriais principalmente na hidrólise de lipídeos (Gonçalves 2007). O potencial biotecnológico das lipases tem sido constantemente ampliado, com elucidação de novos fins para utilização dessa enzima, como desenvolvimento de sabores específicos na indústria alimentícia (Gonçalves 2007), obtenção de biodiesel

(Shieh et al. 2003), adição em detergentes (Cardenas et al. 2001) e na indústria de papel para a remoção de componentes hidrofóbicos da madeira (Jaeger & Reetz 1998). Os isolados AB7.1 (*Staphylococcus pasteurii*) e K3 apresentaram resultados positivos para a produção de lipases. A produção de esterases foi detectada nos meios de teste com vários isolados: AB4 (*Bacillus cereus*), AB7.1 (*Staphylococcus pasteurii*), K3, K5.1, KB2 e TSA2.2.

Algumas bactérias produzem substâncias que tem efeito antagônico em relação a outros microrganismos, inibindo seu crescimento, genericamente denominadas bacteriocinas. Essas bacteriocinas geralmente têm natureza protéica, com ação bactericida ou bacteriostática (Carrim 2005), tem ação específica e são produzidas em condições de estresse (Souza et al. 2005).

A bactéria endofítica *Bacillus mojavencis* tem atividade tóxica contra o fungo *Fusarium moniliforme*, fitopatógeno em milho, sendo que diferentes cepas apresentam variadas formas de antagonismo como efeito através do contato direto com o fungo ou por produção de toxinas que se difundem no meio e destroem hifas (Bacon & Hinton 2002).

De Martins et al. (2002) cita bactérias lácticas, gram positivas anaeróbias e aerotolerantes com metabolismo fermentativo, como grandes produtoras de bacteriocinas. A *Escherichia coli* foi a primeira a ser estudada como produtora de colicinas (Romeiro 1989). Geralmente as bacteriocinas produzidas por bactérias gram positivas não tem efeitos contra bactérias gram negativas (Bromberg et al. 2006).

As bacteriocinas são amplamente utilizadas na indústria alimentícia para a conservação de alimentos (Messi et al. 2003, Souza et al. 2005), com o objetivo de garantir qualidade microbiológica dos mesmos. Messi et al. (2003) afirmam que bactérias produtoras de bacteriocinas ou extratos semelhantes tem vantagens na competição por habitat.

Os isolados testados que apresentaram atividade antagônica são gram negativos, com o isolado K5.1 mostrando um perfil de inibição para *S. aureus* e *S. aureus* metilicina resistente (MRSA) de origem hospitalar e da comunidade, com halos de inibição acima de 15 mm. O extrato produzido por este isolado sugere um potencial de aplicabilidade em tratamento frente a *S. aureus* e *S. aureus* metilicina resistente (MRSA). Esta aplicabilidade deverá ser confirmada apos outros testes (DL<sub>50</sub>, citotoxicidade, teratogênese, etc).

Os resultados obtidos para a atividade antagônica dos extratos aquosos obtidos após o crescimento das bactérias endofíticas frente às cepas indicadoras sugerem que elas possuem atividade antagônica frente a bactérias gram positivas. Este fato é contrário ao geralmente observado, entretanto, algumas espécies bacterianas podem produzir bacteriocinas com atividade inespecífica. Como exemplo pode-se observar a atividade de *Lactococcus* frente a bactérias gram positivas e gram negativas (Souza et al. 2005). *Aeromonas hydrofila*, uma bactéria gram negativa, é descrita por Messi et al. (2003) como produtora de bacteriocinas com efeito sobre bactérias gram positivas como *Listeria ivanovii*, *L. welshimeri*, *Streptococcus agalactiae* e *Lactobacillus* sp.

## **6. Conclusões**

## 6. CONCLUSÕES

Os microrganismos endofíticos têm sua diversidade ainda pouco estudada e conhecida, assim como suas potencialidades biotecnológicas. A realização deste trabalho deu um passo inicial na elucidação desta diversidade endofítica em ambiente de Cerrado. Durante a realização deste trabalho foram isoladas bactérias de plantas presentes em ambientes contaminados com rejeitos de lama asfáltica, demonstrando que, mesmo nesse ambiente considerado pouco favorável em termos nutricionais, há crescimento microbiano.

A biorremediação de compostos é um processo em constante aprimoramento, com surgimento de novas técnicas e descobertas de organismos em potencial para serem utilizados. As bactérias isoladas apresentaram potencial para sua utilização em processos de biorremediação de hidrocarbonetos de petróleo e seus derivados, embora ainda sejam necessários testes *in situ* para sua padronização de condições para o uso.

A presença de microrganismos em ambiente endofítico sugere que estes possam auxiliar de alguma forma a sobrevivência do vegetal, como atuando na fixação de nitrogênio, solubilização de fosfatos e produção de fitormônios. A utilização de microrganismos com alguma dessas capacidades é de grande interesse para melhoria da produção agrícola, pois aumenta o crescimento vegetal de forma natural e evita a adição de aditivos químicos. Entre os isolados testados, somente um apresentou possível produção de ácido indolacético, característica que necessita de confirmação por cromatografia. O mesmo ocorreu para a fixação de nitrogênio, que também necessita de testes para a sua confirmação.

Os microrganismos são grande alvo de pesquisas para sua utilização em processos biotecnológicos. Enzimas produzidas por microrganismos são um exemplo dessa utilização, de interesse para indústrias têxtil, farmacêutica, tratamento de resíduos, papel, entre diversas outras. Os isolados testados apresentaram potencial para melhoramento e aumento de produção destas moléculas, visto que nos testes realizados foi detectada a produção de diversas enzimas. Entre as potencialidades biotecnológicas pesquisadas, encontrou-se também a produção de bacteriocinas, que são moléculas de interesse para o

melhoramento de qualidade de produção na indústria alimentícia e para a produção de novos fármacos pela indústria farmacêutica.

A identificação dos microrganismos é de extrema importância para estudo de diversidade do Cerrado. Este bioma, que se encontra em processo crescente de devastação, ainda não tem uma estimativa de diversidade microbiana, tão pouco a caracterização de suas potencialidades. Este trabalho deu um passo inicial nessa caracterização, no entanto, muito ainda deve ser pesquisado para um levantamento significativo da biodiversidade deste bioma.

## **7. Referências Bibliográficas**

Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP. Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo e do Gás Natural 2007. [http://www.anp.gov.br/conheca/anuario\\_estat.asp](http://www.anp.gov.br/conheca/anuario_estat.asp) Acessado em 01/07/2008.

Anto H, Trivedi U, Patel K 2006. Alpha Amylase Production by *Bacillus cereus* MTCC 1305 Using Solid-State Fermentation. *Food Technology and Biotechnology* 44 (2): 241–24.

Araújo LW, Lima AOS, Azevedo JL, Marconi J, Sobral JK, Lacava PT 2002. Manual: isolamento de microrganismos endofíticos. *Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP*, 86p.

Ariffin H, Abdullah N, Umi Kalsom MS , Shirai Y, Hassan A 2006. Production and Characterisation of Cellulase by *Bacillus pumilus* EB3. *International Journal of Engineering and Technology* 3 (1): 47-53

Azevedo, JL 1999. Botânica: uma ciência básica ou aplicada? *Revista Brasileira de Botânica* 22 (2): 225-229.

Azevedo JL, Maccheroni Jr W, Pereira JO, Araújo WL 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology* 3 (1).

Bacon CH, Hinton DM 2002. Endophytic and Biological Control Potential of *Bacillus mojavencis* and Related Species. *Biological Control* 23: 274-284.

Baldani JI, Caruso L, Baldani VLD, Goi SR, Döbereiner J 1997. Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry* 29 (5/6): 911-922. In: Marin VA, Baldani VLD, Teixeira KRS, Baldani JI 1999. Fixação Biológica de Nitrogênio: Bactérias Fixadoras de Nitrogênio de Importância para a Agricultura Tropical. [www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/download/doc091.pdf](http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/download/doc091.pdf) Acessado em 15/05/2008.

Benizri E, Baudoin E, Guckert A 2001. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. *Biocontrol Science and Technology* 11: 557-574. *In: Oliveira ALM, Urquiaga S, Baldani JI 2003. Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal. Documentos 161- Embrapa Agrobiologia, 40p.*

Bento FM, Camargo FAO, Okeke B 2003. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. *Brazilian Journal of Microbiology* 34 (1): 65-68.

Bonfim RR 2006. Desenvolvimento de Métodos por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução para o Controle de Qualidade de Gasolina e Óleo Diesel. M.Sc. Tese, UFG.

Bric JM, Bostock RM, Silverstone SE 1991. Rapid *in situ* assay for indolacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 535-538. *In: Cattelan AJ 1999. Métodos Quantitativos para Determinação de Características Bioquímicas e Fisiológicas Associadas com Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal. Documentos 139 - Embrapa Soja, 36p.*

Bromberg R, Moreno I, Delboni RR, Cintra HC 2006. Características da Bacteriocina Produzida por *Lactococcus lactis ssp. hordniae* CTC 484 e seu Efeito sobre *Listeria monocytogenes* em Carne Bovina. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos* 26(1): 135-144.

Cardenas F, Alvarez E, Castro-Alvarez MS, Sanchez-Montero JM, Valmaseda M, Elson SW, Sinisterra JV 2001. Screening and catalytic activity in organic synthesis of a novel fungal and yeast lipases. *Journal of Molecular Catalyses B: Enzymatic* 14: 111-123. *In: Gonçalves FAG 2007. Produção de lipase extracelular por leveduras em cultivo submerso. M.Sc. Tese, UFMG.*

Carrim AJI 2005. Bioprospecção de microrganismos endofíticos com atividade enzimática e bacteriocinogênica em isolados de *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha do campo). M. Sc. Tese, UFG.

Chaintreuil C, Giraud E, Prin Y, Lorquin J, Ba A, Gillis M, De Lajudie P, Dreyfus B 2000. Photosynthetic Bradyrhizobia Are Natural Endophytes of the African Wild Rice *Oryza breviligulata*. *Applied and Environmental Microbiology* 66(12): 5437-5447.

Cho KM, Hong SY, Lee SM, Kim YH, Kahng GG, Lim YP, Kim H, Yun HD 2007. Endophytic Bacterial Communities in Ginseng and their Antifungal Activity Against Pathogens. *Microbial Ecology* 54: 341–351.

Cunha CD, Leite SGF 2000. Gasoline Biodegradation in Different Soil Microcosms. *Brazilian Journal of Microbiology* 31: 45-49.

De Martins ECP, Alves VF, Franco BDGM 2002. Bioconservação de Alimentos. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento* 29.

De Vries RP, Visser J 2001. *Aspergillus* Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65 (4): 497–522.

Döbereiner J, Baldani VLD, Baldani JI 1995. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. *Embrapa - CNPAB*, 60p.

Doty SL 2008. Enhancing phytoremediation through the use of transgenics and endophytes. *New Phytologist* 179: 318–333.

Elliot SL, Savelis MW, Janssen A, van der Geest, LPS, Beerling EAM, Fransen J 2000. Can plants use entomopathogens as body guards. *Ecology Letters* 3: 228-235.

Ellis DR, Gumaelius L, Indriolo E, Pickering IJ, Banks JA, Salt DE 2006. A novel arsenate reductase from the arsenic hyperaccumulating fern *Pteris vittata*. *Plant Physiology* 141: 1544–1554.

Evans HJ, Burris RH. Highlights in Biological Nitrogen Fixation during the last 50 years. *In*: Marin VA, Baldani VLD, Teixeira KRS, Baldani JI. Fixação Biológica de Nitrogênio: Bactérias Fixadoras de Nitrogênio de Importância para a Agricultura Tropical. [www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/download/doc091.pdf](http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/download/doc091.pdf) Acessado em 15/05/2008.

Faoro H 2006. Determinação da Biodiversidade de *Archaea* e Bacteria da Mata Atlântica Paranaense. M.Sc. Tese, UFPR.

Fischer PJ, Petrini O, Lanppin Scott HM 1992. The Distribution of Some Fungal and Bacterial Endophytes in Maize (*Zea mays* L.). *New Phytologist* 122 (2): 299-305. [www.jstor.org](http://www.jstor.org) Acessado em 04/12/2007.

Gallego JLR, Loredó J, Llamas JF, Vazquez F, Sanchez J 2001. Bioremediation of diesel-contaminated soils: Evaluation of potential *in situ* techniques by study of bacterial degradation. *Biodegradation* 12: 325-335.

Garcia CE 2006. Isolamento e Identificação de Actinobactérias em Solos de Terra Preta Antropogênica (TPA) da Amazônia Central por ARDRA e seqüenciamento da região 16S rRNA. Tese de Doutorado, UNICAMP.

GESAMP (IMO/FAO/UNESCO/WMO/IAEA/UNEP) Impact of oil and related chemicals and wastes on the marine environment 1993. GESAMP 50: 180p. *In*: CURY JC 2002. Atividade Microbiana e Diversidades Metabólica e Genética em Solo de Mangue Contaminado com Petróleo. M.Sc. Tese, ESALQ/USP, 95p.

Gomes E, Guez MAU, Martin N, Silva R 2007. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. *Química Nova* 30 (1): 136-145.

Gonçalves FAG 2007. Produção de lipase extracelular por leveduras em cultivo submerso. M.Sc. Tese, UFMG.

Gordon SA, Weber RP 1951. Colorimetric estimation of indolacetic acid. *Plant Physiology* 26: 192-195. In: Cattelan AJ 1999. Métodos Quantitativos para Determinação de Características Bioquímicas e Fisiológicas Associadas com Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal. *Documentos 139 - Embrapa Soja*, 36p.

Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF, Kloepper JW 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology* 43: 895-914.

Hanson KG, Desai JD, Desai AJ 1993. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. *Biotechnology Techniques* 7: 745-748.

Hankin L, Anagnostakis SL 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia* 67: 597-607.

Hankin L, Zucker M, Sands DC 1971. Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria. *Applied of Microbiology* 22: 205-209.

Heck JX, Hertz PF, Ayub MAZ 2002. Cellulase and Xylanase Production by Isolated Amazon *Bacillus* Strains Using Soybean Industrial Residue Based Solid-state Cultivation. *Brazilian Journal of Microbiology* 33: 213-218.

Ilyina A, Castillo Sanchez MI, Villarreal Sanchez JA, Ramirez Esquivel G, Candelas Ramirez J 2003. Isolation of Soil Bacteria for Bioremediation of Hydrocarbon Contamination. *Becth. Mock. YH-TA. CEP. 2. T. 44. № 1*, p.88-91.

Jaeger KE & Reetz M 1998. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. *Tibtech* 16: 396-403. In: Gonçalves FAG 2007. Produção de lipase extracelular por leveduras em cultivo submerso. M.Sc. Tese, UFMG.

Jensen AMD & Roulund N 2004. Occurrence of *Neotyphodium* endophytes in permanent grassland with perennial ryegrass (*Lolium perenne*) in Denmark. *Agriculture, Ecosystems and Environment*.

Katznelson H, Bose B 1959. Metabolic activity and phosphate dissolving and non-rhizosphere soil. *Canadian Journal of Microbiology* 5:79-85.

Katznelson H & Bose B 1959. Metabolic activity and phosphate-dissolving capability of bacterial isolates from wheat roots, rhizosphere and non-rhizosphere soil. *Canadian Journal of Microbiology* 5: 79-85. In: Cattelan AJ 1999. Métodos Quantitativos para Determinação de Características Bioquímicas e Fisiológicas Associadas com Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal. *Documentos 139 - Embrapa Soja*, 36p.

Kurosawa K, Hosaka T, Tamehiro N, Inaoka T, Ochi K 2006. Improvement of  $\alpha$ -Amylase Production by Modulation of Ribosomal Component Protein S12 in *Bacillus subtilis* 168. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (1): 71–77.

Labud V, Garcia C, Hernandez H 2007. Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. *Chemosphere* 66: 1863–1871.

Lima VMG 2004. Produção e purificação da lipase de *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 e sua aplicação em biocatálise de solventes orgânicos. Tese de Doutorado, UFPR.

Macrae A 2000. The Use of 16S rDNA Methods in Soil Microbial Ecology. *Brazilian Journal of Microbiology* 31: 77-82.

Maluche-Baretta CRD 2007. Diversidade microbiana em solos sob florestas de *Araucaria angustifolia*. Tese de Doutorado, ESALQ/USP.

Manulis S, Haviv-Chesner A, Brandl MT, Lindow SE, Barash I 1998. Differential Involvement of Indole-3-Acetic Acid Biosynthetic Pathways in Pathogenicity and Epiphytic Fitness of *Erwinia herbicola* pv. *Gypsophylae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11 (7): 634-642.

Mariano AP, De Angelis DF, Bonotto DM 2007. Monitoramento de Indicadores Geoquímicos e Avaliação de Biodegradação em Área Contaminada com Óleo Diesel. *Engenharia e Sanitarismo Ambiental* 12(3): 296-304.

Mariano AP, Kataoka APAG, De Angelis DF, Bonotto DM 2007. Laboratory Study on the Bioremediation of Diesel Oil Contaminated Soil From a Petrol Station. *Brazilian Journal of Microbiology* 38: 346-353.

Mariano AP, Bonotto DM, De Angelis DF, Piróllo MPS, Contiero J 2008. Biodegradability of Commercial and Weathered Diesel Oils. *Brazilian Journal of Microbiology* 39:133-142.

Marin VA, Baldani VLD, Teixeira KRS, Baldani JI 1999. Fixação Biológica de Nitrogênio: Bactérias Fixadoras de Nitrogênio de Importância para a Agricultura Tropical. [www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/download/doc091.pdf](http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/download/doc091.pdf) Acessado em 15/05/2008.

Matsuoka M, Mendes IC, Loureiro MF 2003. Biomassa Microbiana e Atividade Enzimática em Solos sob Vegetação Nativa e Sistemas Agrícolas Anuais e Perenes na Região de Primavera do Leste (MT). *Revista Brasileira de Ciências do Solo* 27: 425-433.

Melo IS. A importância da celulase na degradação de matéria orgânica. In: Frighetto RTS & Valarini PJ 2000. *Indicadores Biológicos e Bioquímicos da Qualidade do Solo: Manual Técnico*. Embrapa Meio Ambiente, 89-98.

Melo IS. Importância da Rizosfera na Biodegradação de Xenobióticos. p. 589-607. In: Melo IS & Azevedo JL 2008. *Microbiologia Ambiental*. 2ª Ed. *Embrapa Meio Ambiente*, 647p.

Meloan CE, Pomeranz Y 1973. Food Analysis Laboratory Experiment. *The AVI Publishing Company*, 116-117.

Mendes AA, Castro HF, Pereira EB, Furigo Jr A 2005. Aplicação de Lípases no Tratamento de Águas Residuárias com Elevados Teores de Lipídeos. *Química Nova* 28 (2): 296-305.

Mendes IC, Reis Jr FB 2003. Microrganismos e disponibilidade de fósforo (P) nos solos: uma análise crítica. *Embrapa Cerrados*, 26p.

Messi P, Guerrieri E, Bondi M 2003. Bacteriocin-like substance (BLS) production in *Aeromonas hydrophila* water isolates. *FEMS Microbiology Letters* 220: 121-125.

Minamisawa K, Nishioka K, Miyaki T, Ye B, Miyamoto T, You M, Saito A, Saito M, Barraquio WL, Teaumroong N, Sein T, Sato T 2004. Anaerobic Nitrogen-Fixing Consortia Consisting of Clostridia Isolated from Gramineous Plants. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (5): 3096–3102.

Misaghi IJ, Donndelinger CR 1990. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. *Phytopathology* 80: 808-811.

Muratova A, Hübner T, Narula N, Wand H, Turkovskaya O, Kusch P, Jahn R, Merbach W 2003. Rhizosphere microflora of plants used for the phytoremediation of bitumen-contaminated soil. *Microbiological Research*, 158: 151–161.

Naidu KSB, Devi KL 2005. Optimization of thermostable alkaline protease production from species of *Bacillus* using rice bran. *African Journal of Biotechnology* 4 (7): 724-726.

Narloch C, Oliveira VL, Anjos, JT, Silva Filho GN 2002. Respostas da cultura do rabanete à inoculação de fungos solubilizadores de fosfatos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 37 (6): 841-845.

Nascimento WCA, Martins MLL 2004. Production and Properties of an Extracellular Protease from Thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology* 35:91-96.

Newman LA & Reynolds CM 2005. Bacteria and phytoremediation: new uses for endophytic bacteria in plants. *Trends in Biotechnology* 23(1):6-8.

Ogino H, Yasui K, Shiotani T, Ishihara T, Ishikawa H 1995. Organic Solvent-Tolerant Bacterium Which Secretes an Organic Solvent-Stable Proteolytic Enzyme. *Applied and Environmental Microbiology* 61(12).

Oliveira AN, Oliveira LA, Andrade JS, Chagas Jr AF 2006. Atividade Enzimática de Isolados de Rizóbia Nativos da Amazônia Central Crescendo em Diferentes Níveis de Acidez. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos* 26(1): 204-210.

Oliveira ALM, Urquiaga S, Baldani JI 2003. Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal. *Documentos 161- Embrapa Agrobiologia*, 40p.

Österreicher-Cunha P, Vargas Jr EA, Guimarães JRD, Lago GP, Antunes FS, Silva MIP 2009. Effect of ethanol on the biodegradation of gasoline in an unsaturated tropical soil. *International Biodeterioration & Biodegradation* 63: 208–216.

Pace NR 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276: 734-740.

Patten CL, Glick BR 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology* 42: 207-220. In: Oliveira ALM, Urquiaga S, Baldani JI 2003. Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal. *Documentos 161- Embrapa Agrobiologia*, 40p.

Peixoto RM, Vieira JDG 2005. Determination of the degrading potential of bacteria isolated from an environment impacted by petroleum and derivatives using 2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP). *In: First Brazilian Symposium on Petroleum Biotechnology, Natal – RN, Brasil.*

Polizeli MLTM, Guimarães LHS, Peixoto-Nogueira SC, Michelin M, Rizzatti ACS, Sandrim VC, Zanoelo FF, Aquino ACMM, B. Junior A 2006. Screening of Filamentous Fungi for Production of Enzymes of Biotechnological Interest. *Brazilian Journal of Microbiology* 37: 474- 480.

Prantera MT, Drozdowicz A, Leite SG, Rosado AS 2002. Degradation of gasoline aromatic hydrocarbons by two N<sub>2</sub>-fixing soil bacteria. *Biotechnology Letters* 24: 85-89.

Prinsen E, Costacurta A, Michiels K, Vanderleyden J, Van Onckelen H 1993. *Azospirillum brasiliense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 6: 609-615. *In: Sobral JK 2003. A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (Glycine max) e estudo da interação endófitos-planta, Tese de Doutorado, ESALQ/USP, 174p.*

Radwan T EI-S EI-D, Mohamed ZK, Reis VM 2004. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 39 (10): 987-994.

Ramos UM 2006. Estudo da biodegradação de gasolina por bactérias presentes no solo da área de armazenamento e distribuição de combustíveis no município de Ribeirão Preto. M.Sc. Tese, UNAERP.

Raven PH, Evert FR, Eichhorn SE 2001. *Biologia Vegetal*, 6ª ed. Guanabara Koogan, p. 708-713.

Rodriguez H, Fraga R 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnonology Advances* 17: 319-339.

Romeiro RS 1989. Constatação da Produção de Bacteriocinas por Isolamentos de Bactérias Fitopatogênicas. Departamento de Fitopatologia - UFV, Viçosa, MG – Brasil, 10 p.

Rosato YB. Biodegradação do petróleo. *In: Melo IS & Azevedo JL 1997. Microbiologia Ambiental - Embrapa p.307-334.*

Rozsak DB & Colwell RR 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiology Review* 51: 365-379.

Santos AB 2005. Fundamentos da Biotecnologia Aplicada à Remoção de cor de Esgotos Têxteis. *Revista Tecnologia Fortaleza* 26 (1): 80-90.

Santos WLM 1993. Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producida por *Pediococcus sp.* 347, de origem cárnico. Tese de Doutorado, Universidade Complutense de Madrid, 294p.

Scott DJ, Dean DR, Newton WE 1992. Nitrogenase-catalyzed Ethane Production and CO-sensitive Hydrogen Evolution from MoFe Proteins Having Amino Acid Substitutions in an  $\alpha$ -Subunit FeMo Cofactor-binding Domain. *The Journal of Biological Chemistry* 267 (28): 20002-20010.

Seabra PN 2008. Biorremediação de Solos Contaminados por Petróleo e Derivados, p. 547-570. *In: Melo IS & Azevedo JL 2008. Microbiologia Ambiental. 2ª Ed. Embrapa Meio Ambiente, 647p.*

Shieh CJ, Liao HF, Lee CC 2003. Optimization of lipase-catalysed biodiesel by response surface methodology. *Bioresource Technology* 88: 103-106. *In: Gonçalves FAG 2007. Produção de lipase extracelular por leveduras em cultivo submerso. M.Sc. Tese, UFMG.*

Siciliano SD, Fortin N, Mihoc A, Wisse G, Labelle S, Beaumier D, Ouellette D, Roy R, Whyte LG, Banks MK, Schwab P, Lee K, Greer CW 2001. Selection of

specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (6): 2469-2475.

Sierra GA 1957. A simple method for the detection of lypolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substracts. *Antonine van Leeuwenhoeck* 28: 15-22.

Silva Filho GN, Narloch C, Scharf R 2002. Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de cultivos de *Pinus* e *Eucalyptus* de Santa Catarina. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 37: 847-854.

Sloan NA. Oil impacts on cold-water marine resources: a review relevant to Parks Canada's evolving marine mandate. Occasional Papper 11. <http://dsp-psd.pwgsc.gc.ca/Collection/R61-2-8-11E.pdf> Acessado em 23/07/2008.

Solano-Serena F, Marchal R, Casare'gola S, Vasnier C, Lebeault JM, Vandecasteele JP 2000. A *Mycobacterium* Strain with Extended Capacities for Degradation of Gasoline Hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 2392–2399.

Song WY, Sohn EJ, Martinoia E, Lee YJ, Yang YY, Jasinski M, Forestier C, Hwang I, Lee Y 2003. Engineering tolerance and accumulation of lead and cadmium in transgenic plants. *Nature Biotechnology* 21: 914–919. In: Doty SL 2008. Enhancing phytoremediation through the use of transgenics and endophytes. *New Phytologist* 179: 318–333.

Souza EL, Silva CA, Sousa CP 2005. Bacteriocins: Molecules of Fundamental Impact on the Microbial Ecology and Potential Food Biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48 (4): 559-566.

Sprent JI, Sprent P 1990. Nitrogen fixing organisms. *London: Chapman and Hall*, 2ed., 256p. In: Marin VA, Baldani VLD, Teixeira KRS, Baldani JI. Fixação Biológica de Nitrogênio: Bactérias Fixadoras de Nitrogênio de Importância para a Agricultura Tropical.

[www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/download/doc091.pdf](http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/download/doc091.pdf) Acessado em 15/05/2008.

Stamford TL, Araújo JM, Stamford NP 1998. Atividade enzimática de microrganismos isolados de jacatupé (*Pachyrhizus erosos* L. Urban). *Ciência e Tecnologia dos Alimentos* 18(4): 382- 385.

Steffensen WS, Alexander M 1995. Role of Competition for Inorganic Nutrients in the Biodegradation of Mixtures of Substrates. *Applied and Environmental Microbiology* 61(8): 2859-2862.

Strobel GA & Daisy B 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology Molecular Biologic Review* 67: 491-502.

Sturz AV, Christie BR, Matheson BG 1998. Associations of bacterial endophyte populations from red clover and potato crops with potential for beneticial allelopathy. *Canadian Journal of Microbiology* 44: 162-167.

Sun L, Qiu F, Zhang X, Dai X, Dong X, Song W 2008. Endophytic Bacterial Diversity in Rice (*Oryza sativa* L.) Roots Estimated by 16S rDNA Sequence Analysis. *Microbiology Ecology* 55: 415–424.

Taiz L, Zeiger E 1998. *Plant Physiology*, 2<sup>a</sup> ed., Sunderlands: Sinauer, 792p.

Teixeira KRS, Marin VA, Baldani JI 1998. Nitrogenase: Bioquímica do processo de FBN. *Documentos – 84 Embrapa Agrobiologia*, 25p.

Teixeira MFS, Lima Filho JL, Duran N 2000. Carbon Sources Effect on Pectinase Production From *Aspergillus japonicus* 586. *Brazilian Journal of Microbiology* 31: 286-290.

Turner GL, Gibson AH. Measurement of nitrogen fixation by indirect means. *In*: Bergensen FJ 1980. *Methods for evaluating biological nitrogen fixation*. London: John Wiley & Son Publ. 139: 111.

Uneojo M, Pastore G 2006. M. Isolamento e Seleção de Microrganismos Pectinolíticos a partir de Resíduos Provenientes de Agroindústrias para Produção de Aromas Frutais. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos* 26(3): 509-515.

Ururahy AFP, Pereira Jr N, Marins MDM 1998. Desempenho de um biorreator do tipo CSTR no processo de degradação de borra oleosa. *Boletim Técnico PETROBRAS*, Rio de Janeiro, 41 (3/4): 125-132.

Van Aken B, Yoon JM, Schnoor JL 2004. Biodegradation of Nitro-Substituted Explosives 2,4,6-Trinitrotoluene, Hexahydro-1,3,5-Trinitro-1,3,5-Triazine, and Octahydro-1,3,5,7-Tetranitro-1,3,5-Tetrazocine by a Phytosymbiotic *Methylobacterium* sp. Associated with Poplar Tissues (*Populus deltoides* X *nigra* DN34). *Applied and Environmental Microbiology* 70 (1): 508-517.

Van Hamme JD, Singh A, Ward OP 2003. Recent Advances in Petroleum Microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67: 503–549.

Van Soolingen D, de Haas PE, Hermans PW, van Embden JD 1994. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods in Enzymology* 235: 196-205.

Vieira JDG 1999. Purificação e caracterização de uma  $\alpha$ -amilase de *Streptomyces* sp. Tese de Doutorado, USP.

Walton BT, Hoylman AM, Perez MM, Anderson TA, Johnson TR, Guthrie EA, Christman RF 1994. Rhizosphere microbial communities as a plant defense against toxic substances in soils, p. 82-92. *In*: Anderson, T.A. & Coats (ed.) 1994. Bioremediation through rhizosphere technology. ACS Symposium Series 563. American Chemical Society.

Wei G, Klopper JW, Tuzun S 1996. Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under field conditions. *Phytopathology* 86: 221-224.

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Gene-Trak DJL 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173 (2): 697-703. In: Garcia CE 2006. Isolamento e Identificação de Actinobactérias em Solos de Terra Preta Antropogênica (TPA) da Amazônia Central por ARDRA e seqüenciamento da região 16S rRNA. Tese de Doutorado, UNICAMP.

Wongsa P, Tanaka M, Ueno A, Hasanuzzaman M, Yumoto I, Okuyama H 2004. Isolation and Characterization of Novel Strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* Possessing High Efficiency to Degrade Gasoline, Kerosene, Diesel Oil and Lubricating Oil. *Current Microbiology* 49: 415–422.

Wu CH, Wood TK, Mulchandani A, Chen W 2006. Engineering Plant-Microbe Symbiosis for Rhizoremediation of Heavy Metals. *Applied and Environmental Microbiology* 72(2): 1129–1134.

## **8. Apêndices**

## 8.1. MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

### 8.1.1. Meio de King – meio seletivo para *Pseudomonas sp.*

Peptona .....	20 g
Glicerina .....	10 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1,5 g
MgSO <sub>4</sub> .....	1,5 g
Agar .....	15 g
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p .....	1000mL

Ajustar pH para 7,0 – 7,2.

### 8.1.2. Meio Mínimo (Peixoto & Vieira 2005)

NaCl .....	0,5%
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,1%
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,1%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	0,1%
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	0,02%
KNO <sub>3</sub> .....	0,3%

### 8.1.3. Solução de 2,6-dicloroindofenol (DCPIP) (Meloan & Pomeranz 1973)

DCPIP .....	50 mg
NaHCO <sub>3</sub> .....	42 mg
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p .....	200 mL

### 8.1.4. Solução de Salkowski (Gordon & Weber 1951)

FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O 0,5 M .....	1 mL
HClO <sub>4</sub> 35% .....	50 mL

### 8.1.5. Teste para solubilização de fosfatos (Katznelson & Bose 1959)

Solução I -  $K_2HPO_4$  0,57 M

$K_2HPO_4$ .....	100 g
$H_2O$ destilada q.s.p. ....	1000 mL

Solução II –  $CaCl_2$  0,9 M

$CaCl_2$ .....	100 g
$H_2O$ destilada q.s.p. ....	1000 mL

Solução III – NaOH 1 N

NaOH .....	40 g
$H_2O$ destilada q.s.p. ....	1000 mL

Procedimento:

As soluções e o meio devem ser autoclavados separadamente. Acrescentar 50 mL da solução I e 100 mL da solução II a 850 mL de meio TSA. Ajustar pH para 7,0 com solução III e incubar a 28-30°C.

A presença de halos claros ao redor das colônias revela bactérias solubilizadoras de fosfatos.

### 8.1.6. Teste para fixação de nitrogênio (Döbereiner *et al.* 1995)

Em todos os meios para teste de fixação de nitrogênio são utilizadas soluções de micronutrientes e vitaminas com a mesma composição. As soluções de bromotimol (0,5% em 0,2 N KOH) e FeEDTA (1,64%) também são comuns. Houve acréscimo de 1,8 g/L de ágar para os meios semi-sólidos. As substâncias devem ser colocadas na ordem indicada.

Solução de Micronutrientes

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ .....	0,04 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ .....	1,2 g
$H_3BO_3$ .....	1,4 g
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ .....	1,0 g
$MnSO_4 \cdot H_2O$ .....	1,75 g
$H_2O$ destilada q.s.p. ....	1000 mL

### Solução de Vitaminas

Biotina .....	10 mg
Piridoxol – HCl .....	20 mg
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p .....	100 mL

Dissolver em banho-maria e então completar o volume com água.

Manter solução em geladeira.

#### A) Meio NFb

Ácido málico.....	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	0,2 g
NaCl .....	0,1 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O .....	0,02 g
Solução de Micronutrientes .....	2 mL
Azul de bromotimol .....	2 mL
FeEDTA .....	4 mL
Solução de Vitaminas .....	1 mL
KOH .....	4,5 g
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p .....	1000 mL

Ajustar pH para 6,5-6,8 com NaOH.

#### B) Meio LGI

Sacarose .....	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,6 g
MgSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O .....	0,2 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O .....	0,02 g
Na <sub>2</sub> Mo <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O .....	0,02 g
Azul de bromotimol .....	5 mL
FeEDTA .....	4 mL
Solução de Vitaminas .....	1 mL
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p .....	1000 mL

Ajustar pH para 6,0-6,2 com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

### C) Meio LGD

Glucose .....	20 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,05 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,15 g
CaCl <sub>2</sub> .....	0,01 g
MgSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O .....	0,2 g
Na <sub>2</sub> Mo <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O .....	0,02 g
FeCl <sub>3</sub> .2H <sub>2</sub> O .....	0,01 g
Azul de bromotimol .....	2 mL
NaHCO <sub>3</sub> .....	0,01 g
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p .....	1000 mL

Ajustar pH para 7,0.

### D) Meio JNFb

Ácido málico.....	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,6 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1,8 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	0,2 g
NaCl .....	0,1 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O .....	0,02 g
Solução de Micronutrientes .....	2 mL
Azul de bromotimol .....	2 mL
FeEDTA .....	4 mL
Solução de Vitaminas .....	1 mL
KOH .....	4,5 g
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p .....	1000 mL

Ajustar pH para 5,8 com KOH.

### 8.1.7. Meio mínimo para testes de atividade enzimática

NaCl .....	0,5%
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,1%
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	0,05%
NaNO <sub>3</sub> .....	0,05%
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	0,01%
Agar .....	2%
Extrato de Levedura .....	0,1%

### 8.1.8. Detecção de Atividade Aminolítica (Hankin & Anagnostakis 1975)

Meio Agar nutriente é acrescido com 0,2% de amido solúvel, com ajuste de pH para 6,0. Após 48 horas de incubação a 30°C as placas devem ser reveladas com vapores de Iodo Metálico. A atividade aminolítica é revelada pela presença de halo claro ao redor da colônia.

### 8.1.9. Detecção da Atividade Celulolítica (Stamford *et al.* 1998)

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	7 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	2 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O .....	0,1 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	1 g
Extrato de Levedura .....	0,6 g
Avicel .....	10 g
Agar .....	15 g
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p .....	1000 mL

Ajustar pH para 7,0 – 7,2. Após 48 horas de incubação a 30°C as placas devem ser incubadas por mais 12 h a 50°C. A visualização de halo claro ao redor da colônia é indicativo positivo

### 8.1.10. Detecção da Atividade de Endoglucanases (Melo 2000)

Meio mínimo acrescido com 0,1% de extrato de levedura e 0,1% de caboximetilcelulose. A leitura é realizada após a exposição da placa a uma

solução 1% de brometo de cetiltrimetil amônio por uma hora a 4°C. A presença de halos claros ao redor das colônias é indicativo positivo.

#### 8.1.11. Detecção da Atividade Lipolítica e Esterásica (Sierra 1957)

Meio Bacto Peptona .....	10 g
NaCl .....	5 g
CaCl <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O .....	0,1 g
Agar .....	18 g
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p .....	1000 mL

Ajustar pH para 7,4. Após esterilizarão o meio deve ser suplementado com 1mL de Tween 80 a concentração de 1% (v/v) para teste de atividade lipolítica; suplementação com Tween 20 nas mesmas condições para atividade esterásica. As placas devem ser incubadas por 96 h a 30°C e a presença de halo opaco ao redor da colônia é indicativo positivo.

#### 8.1.12. Detecção de Atividade Pectinolítica (Hankin *et al.* 1971)

##### Solução I

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,36 g
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p .....	200 mL

##### Solução II

Pectina .....	5 g
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p .....	200 mL

##### Solução III

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	2 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	0,001 g
CaCl <sub>2</sub> .....	0,001g
Extrato de Levedura .....	1 g
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p .....	600 mL

As soluções devem ser esterilizadas separadamente e reunidas no momento da utilização, com proporção de 200 mL solução I + 200 mL solução II + 600 mL solução III. Após 48 horas de incubação a 30°C, as placas devem ser recobertas com solução de Brometo de Hexadeciltrimetil Amônio (CTAB) a 1% (p/v) e incubadas por 1h a temperatura ambiente. Lavar as placas com água destilada esterilizada. A presença de halo claro ao redor da colônia é indicativo positivo.

#### 8.1.13. Detecção de Atividade Proteolítica (Vieira 1999)

Caldo Nutriente .....	8 g
Glucose .....	1 g
Leite Desnatado .....	15 mL
Agar .....	18 g

Após 48 horas de incubação a 30°C as placas devem ser reveladas em solução de ácido acético 5%. A presença de halo claro ao redor da colônia é indicativo positivo.

#### 8.1.14. Meio de Kado (Romeiro 1989)

Sacarose.....	10 g
Extrato de levedura.....	4 g
Caseína hidrolisada.....	8 g
MgSO <sub>4</sub> .....	0,3 g
H <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	2 g
Ágar.....	15 g
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p .....	1000 mL

#### 8.1.15. Tris-HCl 1M

Tris base .....	121,1 g
H <sub>2</sub> O pura q.s.p .....	1000 mL

Dissolver o Tris em aproximadamente 800 mL de água, ajustar o pH para 7,5 com HCl concentrado, e então completar para o volume final 1000 mL.

#### 8.1.16. Solução de EDTA 0,5M pH 8

EDTA.....	9,3 g
NaOH .....	1 g
H <sub>2</sub> O pura q.s.p .....	50 mL

Ajustar o pH com NaOH.

#### 8.1.17. Tampão TE

Tris-HCl 10mM .....	1 mL
EDTA 1mM .....	200 µL
H <sub>2</sub> O pura q.s.p .....	100 mL

#### 8.1.18. SDS 10% (duodecil sulfato de sódio)

SDS .....	10 g
H <sub>2</sub> O pura q.s.p .....	100 mL

Dissolver o SDS em 80 mL de água aquecida. Após o resfriamento, completar o volume para 100 mL e estocar em temperatura ambiente.

#### 8.1.19. Solução NaCl 5M

NaCl .....	292,24 g
H <sub>2</sub> O q.s.p .....	1000 mL

#### 8.1.20. Solução CTAB/NaCl

A solução CTAB/NaCl é feita utilizando 10%CTAB acrescido a 0,73M NaCl.

#### 8.1.21. Clorofil

A solução clorofil é feita a partir de clorofórmio e álcool isoamílico, na proporção de 24:1 (v/v).

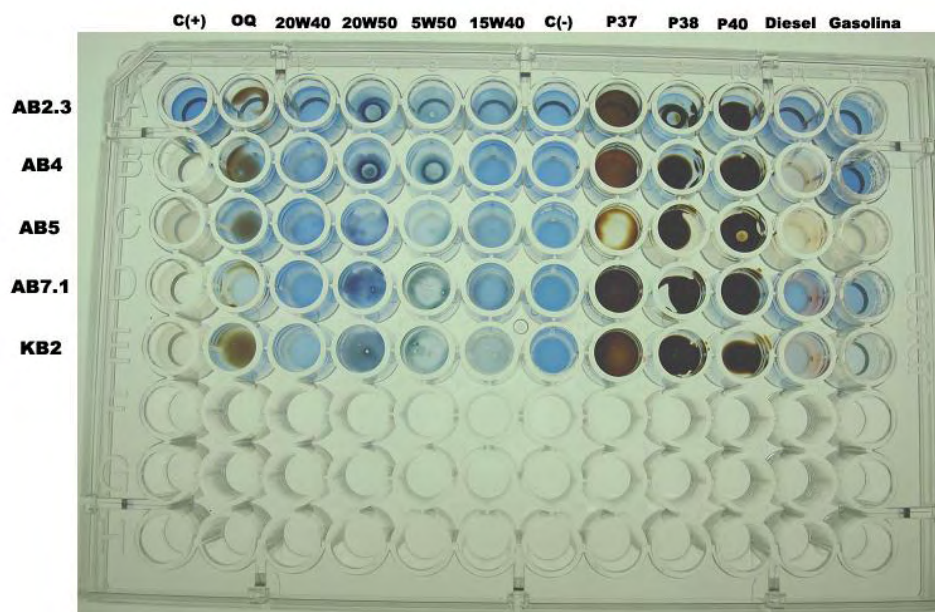
### 8.1.22. Tampão TBE 10X ( Tris Ácido Bórico)

Tris base .....	54 g
Ácido Bórico .....	27,5 g
Solução de EDTA 0,5M pH 8 .....	20 mL
H <sub>2</sub> O pura q.s.p .....	500 mL

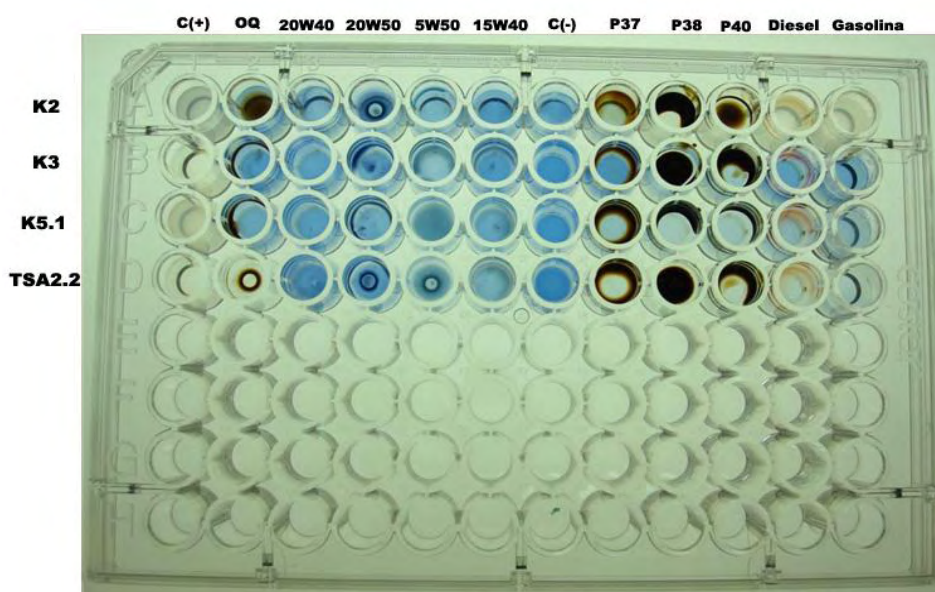
### 8.1.23. Gel de agarose 1%

Agarose .....	2 g
Tampão TBE1X .....	200 mL

## 8.2. FOTOS

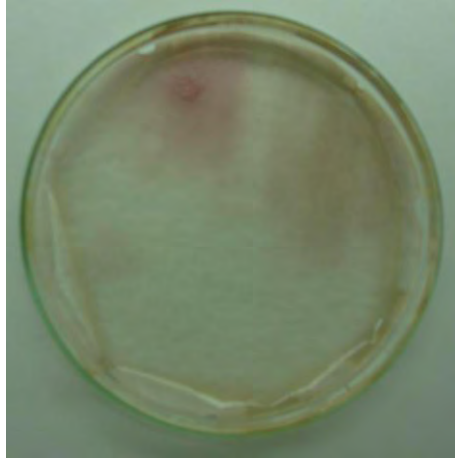


A

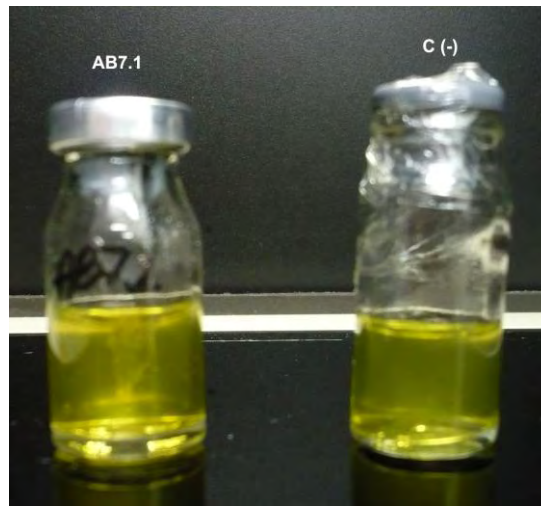


B

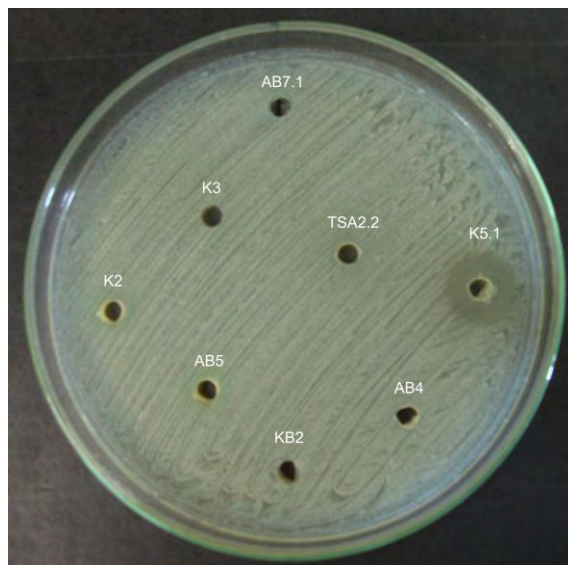
**Figura 8.** A) Placa teste do perfil de degradação dos microrganismos com incubação em shaker por 24 horas e leitura com 24 horas e B) 48 horas de crescimento na placa. Legendas: AB2.3, AB4, AB5, AB7.1, KB2, K2, K3, K5.1 e TSA2.2 - microrganismos; C(+)- controle positivo; OQ - óleo queimado; 20W40, 20W50, 5W50 e 15W40 - óleo lubrificante (Lubrax); C(-) - controle negativo; P37, P38 e P40 - frações de petróleo. \*Tipos de petróleo: P37 (°API 37.7), P38 (°API 19.6), P40 (°API 18.6). °API =  $(141.5/g) - 131.5$  sendo “g” a densidade relativa do petróleo a 15.6°C. Fonte: PETROBRAS.



**Figura 9.** Teste para produção de ácido indol-acético (AIA). Isolado KB2 apresentou halo avermelhado, indicativo de resultado positivo.



**Figura 10.** Crescimento do isolado AB7.1 em meio LGI. C(-): controle negativo.



**Figura 11.** Atuação dos extratos obtidos a partir dos isolados testados sobre *Staphylococcus aureus* metilicina resistentes MRSA (comunidade).

### 8.3. RESULTADOS DO SEQUENCIAMENTO

#### 1. Isolado AB4

1541-Rev

AACGCGTNTGAGTACCCAGNTATCTGTCCCAGGCATANAGTGCGGCTGGATC  
ACTCCTTGATACCCACCGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGT  
GGCGGATGTGTACAATGCCCGGGAACGTATTCACCTGCGGCATGCTGATCC  
GCGATTACTACGATTCCAGCTTCATGTATGCGAGTTGCAGCCTACAATACCTG  
AACTGAGAACGTGTTTTATGAGATTAGCTCCACCTCGCGGTCTTGCAGCTCTT  
TGTACACGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCGATGATG  
ATTTGACGTCATCNCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAAGTCNCACCTTA  
GAAGTGCCCAACATTTTCATTGATTGGCCAACTAAGNATCAACAGGGTTGCG  
CCTCGTATGCGGGACTTAACACCAACATACTCAACGACACGATGCTGACGA  
CAAACCATGCACCAACTGTCACTCATGCTCCCGAANTGAGAAGCCCTATCAT  
CTAGAGGTTANTCAGAGTGATGTCAATGACCTGGATAAGGTTCTTCGCGTTTG  
CTTCGGAATTAACCACATAGCTCCACCGACTTGTGCTGTGGCCCCGNTCAA  
AATTCATTTTTGAGGTTTCTCACGACNCCNATGCAGTGACCCGGTACAATCCC  
CCAATTGCGGCATGTTGCATTAATTGGCGTTANAACCTTCAGACACTAAAAGG  
GGCGGGAANAACCCCTCATAAACACTTAAGCAACTTCATCGTTTAACCAGTGT  
TNGGACATACCCATGGGGTTCTAAATCCCTGTTNTGCTCCCCAAGACATTTAG  
GCAGCCACACAAGATCAGTTACAGGACACAAAAGAATCACCTATGACAAATA  
G

27-Fwd

GCGTCTATGACATCCAAGTCGATTCGAATGGATTAAGAGCGTTGCTCTTATGA  
AGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACTGTGGTGTAACTGCCATAAGG  
ACGTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGGATAACATTTTGAAC  
CAGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACCTTATGTGATGGAC  
CCGCGATCGCATTAGCTAGTTGGTAGAGGTAACGGCTCACCAANGCAACGAT  
GCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCACACTGGGACTGAGACCACGGCC  
AGACTCCTACGGGAGGCAGCCAGTAGGGAATCTTTCCGCAATGGACGAAAGT  
CTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATTGAAGGCTTTCCGGTCGTAAAACT  
CTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGT  
ACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGACAGCCGCGGTAATACG  
TAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTACAAGCGCGCGCAGGTG  
GTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTG  
GAACTGGGAGACTTGAGTGCCGAACGAGGAAAGTGGAATNCCATGTGTAA  
GCGGTGAAATGCGTAAANATATGGGAGGANACCCNATGGGAAAGGGA

#### 2. Isolado AB5

1541-Rev

GTTATCACGTCACGNATTGCAAGCCCAGAGTTTAATANACNTTGGAGNACCG  
ANAGTGGGGGGCAAGCCANCGGGACTTAACTCAGCAAGANGGCTTAGCTAT  
TAGACTGATATCCAAAATGATGAAAATCAATCGAGCACCAGCGCTGCAGATTC  
TGCTATGNGCTTGCCGCGCACCGTTGATGGAAGTGCGCNAATGACGGAACC

ATGGCAACGGTCCGAATAAGGACTGGCTAGTAGNAACCNTTTGACTTAACTG  
TCGGGGCGAGGTATNAATACCCGCGAGCCACATNCCGAGATTGTGGTCTCC  
CCGGAATACAGGTTGATNAGGGTGTNGTGGAACCATTAGCTCCCATAGTCG  
TGCGACAACCTTACTCGGATGTAGNGCTGTAGCGACGTTGNNAGATAATTTT  
ATTTGCGTCTGACACCCGTTACAAAATGGGTACCATGTGGTGATCGAAAAGAT  
GANCTCGCCGTTTGGTAACACCTGTTTGCACCAAATTTGGTGGTTTGAATTT  
CGCGCGGNTTGAACANGTTTTAGCGTCCCCTAACACGAGGATATTCTAAAA  
ATNCACAGTCCGTTAACAAACATCCAAATTAGAATAGTGGACGGGACACAGG  
ATGNCATAAACACCACAGCACCTTNGATGTAAACCCATTNGACATAGNGATA  
TTGTCGATCACAATCTNACAGATAGGATTACAGATAAAAAATCCAGNATTGATAT  
GGAACGGTGAATGACAAAAAAAACCAACTATAAAAAATTATAAGCTTATNACG  
CAATAANCAGGAATAAACAGTCAGACCACACAAGCCG

27-Fwd

AACNCTGGAACGCTAAGAGTANCCAAGCTATGTTCAATAGAATGAGCGTGAC  
CAGCAATGCNGGCCNCNTGANCCGNCCAAATCCGGAGANCAGAGATNACNG  
ACNAGATGAAATAAATNCAGCCAGTAGCGTCAGAATCGATTAGTAAGNGNGC  
AGAGCTCAATTTGAAAGGGGAGAGATAAGTCAGACACGAAATAAGGCAATA  
TTGAGCGAAGAGTTACNCAGGTGANCGTACCATCNTGANCTCACGTACAAG  
AGTCATCATGCNGATGATAAGAATACTCCCATATCGTAATTGGAATGCGCATT  
TGTTGCGCTACCATTATNACATANATGCCATCCCTAACGTTTAAAGTACACATA  
CCANGGGCAGCTAATTTCCGAGGTCCCCGTGATAAGACTTAGTTCCATGAAA  
CCGAGCCCCGNCGCCCGGAATATGAAAACCAATNAATTTAACANCNTGAAC  
TNTGGTTTGCCGCCAGGTGGAGTTNGGCT

### 3. Isolado AB7.1

1541-Rev

AGTCAGNCGGGTACGTACACTTCCCCCAATCATTTGTCCACCTTCGACGGC  
TAGCTCCATAAATGGTTACTCCACCGGCTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGT  
GTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGTAGCATGCTG  
ATCTACGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGTCGAGTTGCAGACTACAAT  
CCGAACTGAGAACAACCTTTATGGGATTTGCTTGACCTCGCGGTTTAGCTGCC  
CTTTGTATTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAAATCATAAGGGGCATGAT  
GATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGTTTTGTCACCGGACAGTCAACTTAG  
AGTGCCCAAACCTTAATGATGGCAACTAAGCTTACAGGGTTGCGCTCGTTGCG  
GGACTTAACCCAACATACTCACGACACGAGCTGACGACAAACATGCAACCAC  
CTGTCACTTTGTCCCCCGAAGGGGAAGACTCTATCTCTAGANCGGTCCCACA  
GGATGTCAACGATTTTGGTTACAAGGTTCTTCGACGTTGCTTCGAATTAACC  
ACATGCTCCAACGCTTGATGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCT  
TGACAGGTCGTACTCCCCAGACGGAATGCTTAAATGCCGTAAGCTTGCAAGC  
AACTTAAAAGGGGGCGGGGAAAACCCCCCTTTANACACTTTAAGCACTCNA  
TACGTAACAGCGGCGTTNGGAACCCTNACCANGGGTCATCCTNAACTCCCTT  
GTTATGGATCCACCCAACGGCATTATCAGGCACAATCACACGNTCGNTATAA  
CGAACCCAGAACAAGTCGCTTTTTCGCCACTGGGNGGTTCTGCACAATCTTC  
AGAGACATTACACGNAACAAATGGAATTCAGTTTCANCNCTGATCAGCACCCAC  
AATTGNCAACAACAAGANCCACCACGGCACCNGGGNTCAAAANATAAAAACA  
GCAAGGCGCNAGCAACGATCAGAAGATACACAATATCACGNGGANAAAGGTT  
CGAGCGAAGANAACTCAGACAAACCAACNGCGCCTCNGCANNG

27-Fwd

AGGGCGGGGCGCGCCTAATANACANACAGATAGGAGCTTGCGTCCTTTGAC  
GTTAGCGGGCGAGACGGGTTGCAGTAACACGTGNGTATAGACCTACCTATAA  
GACTGGGATAACTTCGGGGAAANCGGAGCTAATACGCTGGATAACATATTGA  
ACCGCGATGGTTCGAAATGATGTGAAAGGCTGGCTTTGCGTGTGACTTATA  
GATGGATCCGCGCCGTATTGAGCGTAGTTGGTAAAGTGTAACGGCGTTACCA  
ATGCAGACGAGTACGTAGCCGACTCGTGAGAGGGTGATCTGGCCAGCACT  
GGAAGTATGACACGGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAAGTAGGGAAT  
CTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAG  
GTCTTCGGATCGTAAACTCTGTTTCATCACGGGAAGAACAATGTGTAAGTAA  
CTGTGCACATCTTGACGGTACCTGATCACGAAAGCCACGGCTAAACTACGTG  
CCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGTGTGGCAAGCGTTATCCGGACATTATTGG  
GCCGTAAAGCGCGCGTAGGCCGTTTATATAAGTCTGATGTGAAAGCCCAACG  
GCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGAAAACCTTGAGTGACAGCAAGAG  
GAAACGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGCAAATGCGCCAGAANGATATGGAC  
GGGAAACCACCCAAGTGGCGAACAGGGCGAACTTTTCTTGGTCTGTAAACTT  
GAACGACTGAATGTGCGAAAAGCCGTTGGGGGATCACACCNGATTAATACC  
CTGGGTTATNCACAGCCGTAAAACNATGAAGTGCTAAGAGGTAGGGGGGTTCC  
CCGCCTTNTGTATGATAGCCATTAACCTCAGCTGGGGATTACACAAGGGTA  
CACAAGGATGCGGGCCCCACACNGGCATTTNTATTCAACACGNAACT

4. Isolado K2

1541-Rev

AAAAGAAAACAAAAGTAAGACGGCAATAGCTGTATATGCGAGCANGCGATG  
GGCTAAGCCCAGGCTCANCCCCGCATATGGTTAGGTAAGTACTTAGACCTGATCTA  
NCTGAGGGATAGNAATACACGACACNCCCCGCGACTANNCTGCTTTGAGCTG  
CGCGACGGCGATGCTCGGTACGAGATATGCTCCAGTGAGAAGCGGTGCAAT  
ATCGCCTGCTGTCAGACCAGTATCTGACTTAGTGTGCGAGTATAACNACAGC  
GCGTTCCNTGATGGTCCAGTCAAGGTCTTGTAGTGATTTGTGAAAACCTTGCCC  
CAGTGCGCACGTGCAACATTCACCTTGAGTGACAGACTTGCTTGTTGCGAAG  
AAATATCATTGCGTTCGCAAGCCCTACCGAACGGTNACCTGTGGTGACGAAAG  
TAGGCTTGCGTTGGTGAAAACCTGTANCCATTGTTTGTAAAGCCAGCGGGTT  
GAAGATTGGCCGNTCAAGAAGTAACCTTANGTAGAAATTGGGCACCACTAGCN  
TTAGATANTGTGCGAAACAGTGACAGAAAACCCACCATGNTGTAACCTTGGCAT  
NGAGAGCTTTGNTCTAACTTGCAAGTGGNTAGAACNGGAATAACGGCCTGN  
TTAGAAAGGGTAGGCCCAAAAACCAATTGGAATCTATTTGANTTTAGCGCC  
CTCATTNCGTTTAAACAGGTNGCACCCCAACAGGTCGCGNGNTTAGACAGCCC  
GTAACCTTTGTGTTACACAAGCACGTAAAAGCCTCTGATTTGCGCGAAACATT  
CCACTTCTTTGACGCCAGNAATCTTAAGGATTGGCGNTGGNACCCAGGAATA  
GACACCCGACTTGTTCAAACCGATACTCGAAGGCCTGTGTCAATTGAAGGTT  
NACACGCCTAGCACAGTNGTGGCCGACCCACATGTTTCTACAATCACTCCC  
TTTCNGANAAAATTNGGGNATATTCTTTGCCNCAGGCGGCATTGTGGTTCCC  
CCTGAGCGACCCCAATGGGGCTGAGNTTGTGGTACATCCCTATTAGGTATCG  
GAGTTNTGACANTTTCTCCGAACATTTGCAACACCCGACCAGGAATGGCAAA  
ACACCCATTTGAGCAATTTTGGTCTCGTTGTGGCACCCATCGCAGTAACAAAA  
CCATATATACCATAGGAAAGTGATTTGAGNAACATCTAGATATCGCGATGTAC  
CATGTAGAGGAAACCCACCTAGGAACAAGAGATGCGATAGCCTTAACACTAT

CGGGAGTTTGGTCACCCAGATGCAGNCCCACCGATAGCGTCCAGGCCGCCAA  
AATGGAATATGGCCAGCAAACACGNGGACCCACGNGATAAACCGAATGNAGA  
GGCAAACCCGATGGTAGGAATNTNAAGCAAGACGGGAATCAACCAGCAAACA  
CGAGATGAGGGCGCCCCACAAGGGACAAGAACTGGGACGGAAAAACA  
ACCAGGAAATCACACGGGATGCGGGAGGTGACAGCACCACCANGCACAANA  
GNGGGACACCAATACAGGAACAGNTGANACCACACAATCACGGAACATAAGC  
GGNAAACACAAGCGAAGTCGAACGGNCAGAAGNGCNAAANACTCAAAAAGA  
ACAAAACGNACACN

27-Fwd

ACGTTANCAGTCGNCGATTTGAATGCACGGGAGCGTTGCTCCTTNATNCAC  
GCGCGCAGGACGATGGTGACGTAATGCCTAGTAGAAGTCTTGCCGTGAGTNT  
ACGATGGATCGGGACAAACAGTGTTCAAAAAGGAGCAGCGNAAATACCTGC  
ATACAGTCACGTACTIONGAGAAGAAAGACAATGGTGACCCATTGAGGCCTTG  
CGAGCATAGTCAAGAATAAAGTAGCCTAAGTCAGCGATTAACATAGCTTGTG  
ATGATCGAGATAGAGATTGAGANATCGACCCAATGGCAGATCGAATCCGTAA  
AACGTGAGCTCATGAGAAGGAATAATCAGGTGACACTGGCACAACCTTGAGA  
CACCGGTCCAAAACCTCCCTACCGAGAGAAGATGCACNCAATTTGGGGGGAAA  
TTTATTTGGNACACAATTGGGGGCGGAAAACAGGCCTTGACAATACCCAGAC  
CCCAATTTGACACAGGCACGTTTGGTTGGTTTNAGAACACGAAAAAAGGGGT  
ACTTATCCAGAGGAAAATTATGGTAAAACATGACACACCTTTTTACATNGAGT  
TTTGGAGGGGAAGGGGNAACATGGGNGACCAAAGANAACACAAGTTATAACA  
ATAACCCCCCTTTTACTNGATTTTAATCAGAAACCGNTTAAACACCCGAGAAC  
CAAGACACATNAAAAAGCCAACACCGAGTGACCTTAAACATTCCATTGTTGG  
NCCAANCAAAGAGCCACGGACGAGTTAACTTAAACAAAGTAAANGGGGGATT  
TGGCCCCACAGGCCAGATTTACATACTGGNACATTTTACTTTGTGTGGGA  
CCATGTAACAACAGCCGACGGCCGGGCTTAAAGGTTTGGGATAATCCCAANT  
ACAACAAGGTTTNGGACACTAGNTTGAACACAACAGCCCACCCGAGAGGACN  
ATNCAAAAACCGAGTGAGANGGAACAAAACGATGGNAAATTTCCATAAAAAACC  
AATTGTGAGCCTGAAGCCATACAGAAGGTNCCCAGGAATAACGACAACGGGC  
GTAGGGACNAGGGAACAATATATCCATTAGAGGTTATACACGTGGATGAAAA  
ATTGCGACNGTTCAACCTTATTATGNGAACCAAGTGACACACCACCCCAATTATN  
GAACAACAATACGGCGAACCCCTACCCGTTNGACATTATAGTACATTTTATACG  
ACTTTNACTGGTTGN

5. Isolado K3

1541-Rev

AAAACAAAAACAAAAAAGACACAAAANTAAAATCGAGTACTGTANAAGAATC  
ACGTTATGCACTTTGACAGGCATAGACTCACACTAAAATGGTTACATCCANCT  
GAGACATTCAGAGGNTTGATAACCAACAACCTCTCGTGGATGTGACCAGAGGG  
CTGTGTGTTGTCAAAGACCCCGGGACACTGTACTTACACCTTGTAGACATGC  
ATGANTCTAACGAATATACATAAACTGAATTCCACGCATATCAAATGTACGATA  
CAGACGATATAGCAAGAACATAACACAATCNCCTGAACCATTGAGAACAACAAA  
CATTTACTTGTAGTGAATTTTGCATTTAGAACACCTCGNCGTGATATATAGCAT  
TTGCACACCATTANGATAATTATGGGTCCCAAATTATGATAAAGACAACCTG  
ATTGATTGATATAGACCCCAAATATCACGTACACATGGTGGTGCAAATTTGAA  
ATTGAAATTTTGACCAANTTCAAATTACACCCACAACACCAAATATTCACAAA  
TCANCCGAGGAATTTATATAGGATCGAACAACTGAGGCNTAAGTATATCGAA  
TACAATAATNATAACAAGAATGGACACCNAAAAAACGATATTTANAATNGNAA

GTNAGGGCAAAAACAATCANAAGCGCCACATTATACAAAGANNGGGNNCTTA  
TATGNNNGGCCCATATCACGAATTTTGACCTCGAAGTGCAACAATTTATACTA  
ATACCACACAAACAAGAAAAATTAGGTTCACTAACCCAGAACCATAACAAGA  
ACAGTACCATTTAGACATAACNAAATCNACAAAAAGATCACAACATTTGACCN  
ACCCATAAGCCCNCGTTGGATATCAANACGCAATTTTTATNGNTTAACACCCC  
AAGCTAGATAAAAAGNTGNGAGGACAANAACAGTTCNTTTAATTCNATATNA  
ATATATCGAAACGGCCAAGTGATACACCAATNATAGNGAAATTTGTTCAAACA  
CAGACACATATTCTANGGGAAAAAAATGGATAGTANA

27-Fwd

AAATGANAGTTCCTTAGCCGATNACGATAGGGAGTCGTGCGTCCTTTGACG  
TTAAGCGGGCCNGACGGGGTGAGGTACACACTGTGAGATAGTCCTACCTATA  
NAGAGCTGGGATAACATTCGGGAGAAACGCTGGAGCTAATACGCTGGATAAG  
CGATATTGAACCGCGATTGGTTCGAAATGNTNANACAGCGCTGGCTTTTTGC  
GTAGTGCACCTTTATAAGATGGATCCGCAGCCAGTATTGAAGCGTACNATTNG  
GTAAAGTGTAAGTACGAGCGTTACCAATGCAGTCNCGATACGTATGCACGGAC  
CTCGTAGATAGGTGGTTCGAGTCTGGCCAGCACGCTTTGAAAACCTTGATGACA  
CGGTCCAAGACTTCCATACCGGGGAAGNGCAANCAAGTACAGCGNGGAATCTT  
TCCCGCCAAACTTGGGGCCGAACACGCCCTGAACAAGNGACAACGCCCGGC  
AGTAACGTAGAATGCACAGGCGTTCATTTCCGGAGNATTGAGTCAAAAAACTC  
CTTGGTATATTCAAAGAGGGACAAGAAACCAAACATTGTTTGTAAACGAGT  
AAACACTTGGTTGGCCAACATTCATTTTGACACGGGTGAACCCCNCTGGAATTA  
CAAGNAAAANGCACCAACGTGGACTTAACACCTAACCAAGATTTGACCAAGCA  
CAATGCACCNGCAGGGNTACAATACACCAGGATAAGGGTTAGAGGCAAANAG  
GATGGTTTAAATTTTACCAAGNAGAAAAATATTATAATTATGGGGGGACGGTAT  
ACAAACAGAGACAGACCGGCACAGGTTAAAGNAGCAGGGGGGAATTATATCNT  
CAAAGCGTTCCTTNGAATTTGTTTCGAAACATCGCACACCCACCGTGGCCTTC  
CAACACCACCGGGTGNAAGGGGGNGTCCATTTGGGGGANAACCTTCGGGAA  
AAAAACCATTAGAAGTTGGACACAAGCACACAAGAGAACACGGTAGGTGAN  
ATTCCCAGTTGTCACACTACGCCGGGGTGACAATTAGCCGCCAAGAAGAATTT  
ACATCGAGAGATGGAAACACAACCCAGTTGGGGCAAATGGGNNCACNCTTT  
TCTAGCGTTCTCGTCACCTTGACCGNCTTGAATATTACNAAACAAGCAGTTG  
GCNCTGCTCTC

6. Isolado KB2

1541-Rev

AAACCAAATGGTACNTGGAATACATCTATCACACACGTGGTAAGCGCCCATC  
CCGAAGGTTAAGCATAACCATAACATTTNTTTTTGCAACCCCAATGCGNCCGCT  
ATGGCTGATGGACGTGGGCGGTGTGCTACGAAGGTCGCCGGCGAACGTATT  
CATCCGTNGCGCATGGCTGAATCCAACGCGATNTACTGAGACGATTACCGAA  
CATTTCTACGTGGAGGTCANAGCTGTGCTAGACNCCTGACTCGCGGCACCTA  
CGTACGCTACATTTGATGCACGGATTCCCGCGTTGGCTCATCGGCCGACGCG  
TACTGGCATTCTCNTGTATGCTATTGCGCCAATTGTAGCACTGTGTGTAGCC  
CTGGCCTGTAAGTGGCCATGATGACTTTGACGTCAATCCCCACCTTCCTCCG  
GTTTTATCGACACGGCAAGTCTCCACATGNAGGTTACCGAACCGAAATCA  
GACTTGTGCAAACAAGGACGCGATAACGTGGTTTGGCCGCATCGTTTGCAGN  
GGGGACATTTAACCCCAAACATTTTCAACACAAACAACNGAGCTTGACACGAC  
AAGCACAATTGCAAGACAACCTTGGTCTCCACCAATGTTCCCTAGAAGTGCAC  
TCCAAAAGACACTTCTACCTGGACATAAACAATTTACTTGTTAGGGGCAATT

GGTCCAAAGGGGCGCCATGGGGTTAAGGGTTTACTTATCAGCAGATTTTGGC  
ATTCCGAACATTTAAAACCCAACAATTTGGNATTCCCAACACGCTATAGTTGA  
CGTGGGCCCCACACGGNTAACAATTCAATTATGACGTTANTACAACCNTTTGA  
CAGAGACCCGGATACTCACCACAAGGACTGGGTGACCTTAAACGGCTCGTT  
TAAAAGGCATCCNACGAGAACAAGCCANAACGCCCTTACANGGGGGGC  
CAAAAACACCTTCCCAAAGTCCAAAACACTCACGGTTNTAAAACCTGGGAAG  
GTGGAGACCTTACCCAAGAGGANTATTCCTAAAATCCCTTGGTTTTGGCTTCC  
CACCCACAGACATTCATGCAACCCTGAAAAACGTTAAGGTTCTTACGCCAA  
TGGGGGGGACGNCCATTTAGCAAACCGGGTANTACCTNCACNAAAATTATT  
AAGATTTAAACCAGATTAACCAATTGAAATTCTTACCCCCATTAGAACATAAA  
GACTGCCAAGATAATCACTGNACNACCCCG

27-Fwd

AGGGTATGGCAAACCGNATCGNGTTANGGTANAAGCTTGCTTCTTTGCCCGA  
CGAATGTGGCTCGGGACGTGGGGTGTAGTAACTTGTCGTTGTGGGCACAATC  
GTTGCGCCTGAGTAGGCAGGNTGCGAGNATNCACCCTAGCGTCGGAGAACN  
AGAGCTACCATTAGCTACCGGCAAATAAACGTCGTTTACAGAGATCGCAANA  
ATCGTGGNGGACTCTTTCTGACAGAGCTCGTCGACACCCGATTTGAGAGCT  
TGCTGCCCAAGGATTGCGAGCGAGTTTANAGCTATAGACTAGTGATAGNGA  
GGATAGATATAGCGGTCACTCTACCGCGTCGGAACCGAGTCCCCTCACGAC  
GTGCGTTCGTAGACGAACGACTTGTACACAGGCCGCACTTGNAACTTGAAG  
ACACGGTCCAGAACTCCTAACGGAGAAGTGCAAAGCCAAAGTTGGGGCGAAT  
ATTTTGCAACAATGTGGGCGGCAAAGGCCTTTGATTAGCAGCCCAATAGCC  
CGAGCAAGGTTTGGTTTAAATTTAGAAAAANGAAAAAGGTGGCCCCTTTCCGG  
AGCNAGTTTTAGGTTAAACAGNTTAAACCTTTATTCCANAGCCGGCGAGGTG  
GACAGGCGGACAACGNGGCCGCAAATTTGGTAGANGGTTAACTACAACCCA  
GGTCANGTTCACGGACNTTTGAAACTAGAGTTTATTAACCCCCGAGCAAGA  
GAAACAGAAAAAGCCAACCCNTGNTGCCATTAAACACTTACACCCAGTTTGA  
CCCCACAAAGACCAATNCNCCGGCAGNGGGTTACATTAACGCGAAAGAGTG  
TTGCCAAAGCCGTTTTNCACTTCCGAGGGAAAAGTTTTAACCATTGGNCG  
GACCGGTTTACAAAAAGCGTCGGCCACCAGCCCAAGTGGCCAGGTCCCTTG  
TTAAACAACGTTCCCGAGTCATTCGTTGAACACATTTCCCCACNGAAGTNAGA  
CTTCAAAACACCCACAGNGGTCAAACCCTTTGGCAATTTTTATGAAACAAC  
CTTGGGCCAAGGGGGCATTATAACAAAGTTACCTCGGNTACCAACGGGGGTN  
GGGGTTCNCAAATTACCATAGGTTTTGTTATCACAGGGATAACACCATTAGCG  
GTTAAGNAAGAAATTCCTAGGCATAGNACAATAACCGCGGCTGGGCCTCAA  
NANGCGAGCCACCCCNATGGGACGNTACAGAACTTGAACGGCCTNAAAAG  
GTATCANCAAAACAGCGTATAGGGACAGCCACAAACANNGTCATTTTAA