



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANA CAMILA MUNIS JARDIM

**DIVERSIDADE E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE
BACTÉRIAS ISOLADAS DE *Baccharis trimera* (CARQUEJA)**

ANA CAMILA MUNIS JARDIM

**DIVERSIDADE E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE
BACTÉRIAS ISOLADAS DE *Baccharis trimera* (CARQUEJA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Genética de Biologia Molecular.

Londrina
2017

ANA CAMILA MUNIS JARDIM

**DIVERSIDADE E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BACTÉRIAS
ISOLADAS DE *Baccharis trimera* (CARQUEJA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Genética de Biologia Molecular.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Elisete Pains Rodrigues
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof Dr. Gislayne F. L. Trindade Vilas Boas
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. André Luiz Martinez de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 30 de junho de 2017.

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Jardim, Ana Camila Munis.

Diversidade e potencial biotecnológico de bactérias isoladas de *Baccharis trimera* (Carqueja) / Ana Camila Munis Jardim. - Londrina, 2017.
115 f. : il.

Orientador: Elisete Pains Rodrigues.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Diversidade Microbiana - Tese. 2. Potencial biotecnológico - Tese. 3. Antagonismo - Tese. I. Rodrigues, Elisete Pains. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Londrina (UEL), Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) e à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e seus respectivos professores, alunos e funcionários que se mostraram sempre à disposição;

À CAPES e CNPq pelo apoio financeiro;

Aos professores funcionários dos departamentos de Biologia Geral e Bioquímica pelos ensinamentos;

Aos senhores membros da banca;

À Prof^a Dr^a Elisete Pains Rodrigues pela excelente orientação, incentivo e amizade. Obrigada por contribuir para minha formação científica, profissional e pessoal;

Às Professoras Ilce Mara Syllós Cólus e Claudete Ruas pela disponibilidade de seus laboratórios;

Aos ICs Jéssica Éllen de Oliveira, Giovana Gutuzzo, ao doutorando Gilberto de Aguiar Pereira e o ICs júnior Vitor Andrade pelo auxílio nas atividades laboratoriais;

Aos parceiros de projeto Dorival Bião de Melo e Kamila Kock;

Ao técnico de laboratório Ideval Azarias;

Aos amigos do Laboratório de Genética de Microrganismos, Dorival, Gilber, Stefani, Kamila, Ilmara, Douglas, Cátia, Giovana, Jéssica, Vitor e Amanda, pelo apoio para a realização deste trabalho, pelos bons momentos, pela amizade ao longo desse tempo de convivência. E aos amigos conquistados de outros laboratórios que tornaram esse tempo de pesquisa prazeroso e descontraído;

Aos familiares que sempre mostraram apoio aos meus estudos.

“Se vi mais longe foi por estar sobre os ombros de gigantes”

Isaac Newton

JARDIM, Ana Camila Munis. **DIVERSIDADE E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE *Baccharis trimera* (CARQUEJA)**.2017. 115.f Dissertação (Programa de Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil.

RESUMO

As plantas podem abrigar uma grande diversidade de microrganismos desconhecidos e que apresentam grande potencial para produção de compostos bioativos, incluindo antimicrobianos. Neste sentido, este trabalho investigou a composição da comunidade bacteriana e o potencial antimicrobiano dos isolados de *Baccharis trimera* (Less DC Ateraceae). Para isto, amostras das raízes foram coletadas em Ponta Grossa-PR e Ortigueira-PR. Inicialmente, foi realizada a contagem para estimar a densidade populacional da rizosfera e endorrizosfera nos meios de cultivo R₂A e Ágar Batata. O posicionamento filogenético dos isolados foi realizada através do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Posteriormente os isolados foram avaliados quanto a produção de compostos antimicrobianos através de testes de antagonismo e pela produção de sideróforos e biossurfactantes. A contagem populacional da rizosfera foi maior que a contagem da endorrizosfera independentemente da localidade de coleta ou do meio de cultivo utilizado. Foram obtidos 182 isolados a partir do plaqueamento da rizosfera e endorrizosfera. Foi realizado um agrupamento dos isolados através da técnica de ARDRA e a partir deste foram selecionados 129 isolados para sequenciamento. Foram identificados 38 gêneros bacterianos alocados nas seguintes classes: Bacilli (30%), Actinobacteria (24%), α -Proteobacteria (22%), β -Proteobacteria (12%) e γ -Proteobacteria (12%). Os principais gêneros encontrados nas duas localidades foram *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Methylobacterium*, *Staphylococcus*, *Paenibacillus*, *Variovax*, *Burkholderia*, *Luteibacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus* e *Bradyrhizobium*. Dos 182 isolados, 112 apresentaram produções em diferentes níveis de antimicrobianos, sideróforos e biossurfactantes. Os resultados deste trabalho demonstram que a comunidade bacteriana da rizosfera e endorrizosfera associada à planta medicinal *B. trimera* é diversa e com alto potencial antimicrobiano.

Palavras-chave: Bactérias associativas. Planta medicinal. Antagonismo. Sideróforos. Biossurfactantes.

JARDIM, Ana Camila Munis. **DIVERSITY AND BIOTECNOLOGICAL POTENCIAL OF BACTERIAS ISOLATED OF *Baccharis trimera* (CARQUEJA)**. 2017. 115.p
Dissertation (Programa de Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil.

ABSTRACT

Plants can harbor a large diversity of unknown microorganisms and these can present great potential to produce bioactive compounds. In this sense, this work investigated the composition of bacterial community and the biotechnological potential of bacterias isolated from *Baccharis trimera* (Less DC Asteraceae). For this, root samples were collected in Ponta Grossa-PR and Ortigueira-PR. Initially, the enumeration was performed to estimate the rhizosphere and endorhizosphere population density in R2A media and potato agar media. The phylogenetic affiliation of the isolates was realized by partial sequencing of the 16S rRNA gene. Subsequently the isolates were evaluated for the production of antimicrobial compounds through tests of antagonism and the production of siderophores and biosurfactants. The rhizosphere population count was higher than the endorhizosphere count independently of the collection site or the culture medium used. A total of 182 isolates were obtained from rhizosphere and endorhizosphere. A clustering of the isolates was carried out using the ARDRA technique and from this, we selected 129 isolates for sequencing. A total of 38 bacterial genera were identified in the following classes: Bacilli (30%), Actinobacteria (24%), α -Proteobacteria (22%), β -Proteobacteria (12%) and γ -Proteobacteria (12%). The major genera found in both localities were *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Methylobacterium*, *Staphylococcus*, *Paenibacillus*, *Variovax*, *Burkholderia*, *Luteibacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus* and *Bradyrhizobium*. Of the 182 isolates, 112 showed productions at different levels of antimicrobials, siderophores and/or biosurfactants. The results of this work demonstrate that the bacterial community of the rhizosphere and endorhizosphere associated to the medicinal plant *B. trimera* is diverse and with high biotechnological potential.

Key-Words: Associated bacterias. Medicinal plants. Antagonism.
Siderophores. Biosurfactants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Plantas de <i>Baccharis trimera</i>	18
Figura 2 -	Rizodepósitos gerados a partir de células da epiderme do ápice apical das raízes e de células mortas da rizoderme provocam mudança no bioma do solo rizosférico.	20
Figura 3 -	Representação esquemática do gene ribossômico 16S rRNA.	27
Figura 4 -	Placas de Isolamento.....	62
Figura 5 -	Relações evolutivas dos isolados do gênero <i>Rhizobium</i>	80
Figura 6 -	Relações evolutivas do isolados do gênero <i>Streptomyces</i>	82
Figura 7 -	Relações evolutivas do isolados do gênero <i>Burkholderia</i>	84
Figura 8 -	Relações evolutivas do isolados do gênero <i>Bacillus</i>	87
Figura 9 -	Relações evolutivas do isolados do gênero <i>Methylobacterium</i>	89
Figura 10 -	Relações evolutivas do isolados do gênero <i>Pseudomonas</i>	90
Figura 11 -	Número de isolados representados para cada nível de produção dos diferentes testes bioquímicos (Sideróforo, surfactante e antagonismo).....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Filos bacterianos dominantes na rizosfera e endosfera de diferentes plantas hospedeiras.	25
Tabela 2	Contagem populacional em Unidades Formadoras de Colônia (UFC g ⁻¹ de peso fresco) da rizosfera e endosfera de <i>B. trimera</i>	67
Tabela 3	Análise química dos solos de região de coleta de Ponta Grossa e Ortigueira	64
Tabela 4	Número de Isolados da rizosfera e endosfera de <i>B. trimera</i> coletadas na região de Ponta Grossa e Ortigueira, Paraná-Brasil.	65
Tabela 5	Classes bacterianas encontradas após a identificação dos isolados	66
Tabela 6	Identificação taxonômica em nível de gêneros	74
Tabela 7	Análise de similaridade da sequência parcial do 16S rRNA de 6 isolados de <i>Rhizobium</i> sp. de <i>B. trimera</i>	78
Tabela 8	Análise de similaridade da sequência parcial do 16S rRNA de 17 isolados de <i>Streptomyces</i> sp. de <i>B. trimera</i>	80
Tabela 9	Análise de similaridade da sequência parcial do 16S rRNA de 8 isolados de <i>Burkholderia</i> sp. de <i>B. trimera</i>	83
Tabela 9	Análise de similaridade da sequência parcial do 16S rRNA de 22 isolados de <i>Bacillus</i> sp. de <i>B. trimera</i>	84
Tabela 10	Análise de similaridade da sequência parcial do 16S rRNA de 9 isolados de <i>Methylobacterium</i> sp. de <i>B. trimera</i>	88
Tabela 11	Análise de similaridade da sequência parcial do 16S rRNA de 6 isolados de <i>Pseudomonas</i> sp. de <i>B. trimera</i>	89
Tabela 12	Número de isolados positivos em diferentes níveis por parte da planta analisada.	91
Tabela 13	Principais isolados que apresentaram maior produção de Sideróforos.	93
Tabela 14	Principais isolados que apresentaram alta produção (+++) de biossurfactantes.	94
Tabela 15	Somatória das notas atribuídas à cada atividade de acordo com o potencial biotecnológico dos isolados.	97

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 -	Parâmetros gerais médios para a interpretação preliminar de resultados de análises dos solos.	104
Anexo 2 -	Curva de calibração realizada com diferentes concentrações de EDTA para a estimativa da quantidade de sideróforos. A curva foi realizada nas mesmas condições que os isolados foram avaliados. Eixo X: Concentração de EDTA em μM . Eixo Y: Absorbância medida a 630 nm.....	104
Anexo 3 -	Tabela representando os 182 isolados avaliados juntamente com a identificação dos 129 isolados sequenciados.....	105
Anexo 4 -	Dendograma gerado a partir da digestão do gene 16S dos isolados da endorrisosfera da coleta de Ponta Grossa.....	111
Anexo 5 -	Dendograma gerado a partir da digestão do gene 16S dos isolados da endorrisosfera da coleta de Ortigueira.	112
Anexo 6 -	Dendograma gerado a partir da digestão do gene 16S dos isolados da risosfera da coleta de Ponta Grossa.....	113
Anexo 7 -	Dendograma gerado a partir da digestão do gene 16S dos isolados da risosfera da coleta de Ortigueira	114

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	<i>BACCHARIS TRIMERA (LESS DC ASTERACEAE)</i>	17
2.2	INTERAÇÕES PLANTA-MICROORGANISMOS (RIZOSFERA E ENDOSFERA).....	20
2.3	DIVERSIDADE DE MICROORGANISMOS ASSOCIADOS ÀS PLANTAS	23
2.3.1	GENE 16S RRNA.....	26
2.4	IMPORTÂNCIAS DOS MICROORGANISMOS RIZOSFÉRICOS E ENDOFÍTICOS.....	27
2.4.1	PRODUÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS	28
2.5	ANTAGONISMO E PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS.....	32
2.6	SIDERÓFOROS.....	34
2.7	BIOSSURFACTANTES	37
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
3	OBJETIVOS	50
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	50
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
4	CAPÍTULO I	51
	PALAVRAS-CHAVE: MICROORGANISMOS ASSOCIATIVOS, PLANTA MEDICINAL, ANTAGONISMO, SIDERÓFOROS, BIOSSURFACTANTES, BIOPROSPECÇÃO.....	52
	INTRODUÇÃO	53
	MATERIAL E MÉTODOS.....	54
	COLETA DO MATERIAL VEGETAL	54
	CONTAGEM E ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS.....	55
	AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16SRRNA.....	56

ANÁLISE DE RESTRIÇÃO DO DNA RIBOSSÔMICO AMPLIFICADO (ARDRA)	56
PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S RRNA.....	57
BIOPROSPECÇÃO DOS ISOLADOS PARA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS	58
<i>ATIVIDADE ANTAGONISTA CONTRA FITOPATÓGENOS</i>	58
<i>PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS</i>	59
<i>PRODUÇÃO DE SURFACTANTES</i>	59
<i>ANÁLISES ESTATÍSTICAS</i>	60
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
ISOLAMENTO E DENSIDADE POPULACIONAL.....	60
ANÁLISE QUÍMICA DO SOLO.....	63
PURIFICAÇÃO E CONFECÇÃO DA COLEÇÃO BTM.....	64
ANÁLISE DA DIVERSIDADE BACTERIANA DA ENDOSFERA E RIZOSFERA DE <i>B. TRIMERA</i> POR ARDRA	65
ANÁLISE FILOGENÉTICA DA COMUNIDADE BACTERIANA CULTIVÁVEL DE <i>B. TRIMERA</i>	66
<i>BIOPROSPECÇÃO DOS ISOLADOS DE B. TRIMERA</i>	91
ATIVIDADE ANTAGONISTA.....	92
SIDERÓFOROS.....	93
BIOSURFACTANTE	94
CONCLUSÃO.....	99
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos estão presentes em vários nichos ecológicos tanto em ambientes terrestres como aquáticos, bem como ambientes extremos. Em particular, o solo, possui uma vasta diversidade bacteriana muitas vezes associada a partículas de solo ou interagindo com as raízes das plantas. Esta diversidade de microrganismos tanto do solo quanto associados às plantas representam uma fonte promissora de compostos bioativos.

As plantas são fontes promissoras de novos microrganismos de interesse para a busca por compostos bioativos. Atualmente com a contínua busca por novos compostos naturais, a taxa de reisolamento de compostos já conhecidos aumentou. Portanto, é necessário que novos ambientes microbianos sejam estudados.

Se considerarmos que cada uma das 300 mil espécies de plantas superiores pode habitar um ou mais endófitos é imensa a oportunidade de se descobrir microrganismos ainda não estudados (STROBEL et al., 2004). Segundo Qi, as plantas medicinais possuem uma comunidade microbiana distintiva devido aos seus inúmeros metabolitos secundários estruturalmente diferentes que provavelmente são responsáveis pela alta especificidade dos microrganismos associados. Sendo assim, as plantas medicinais representam uma fonte pouco explorada de microrganismos de uso potencial na medicina moderna e na agricultura (QI et al., 2012).

No Brasil, são encontrados poucos trabalhos relacionados a investigação da comunidade de microrganismos associados às plantas medicinais. As plantas medicinais apresentam inúmeras propriedades farmacológicas, como exemplo, antimicrobiana, antitumoral, antimutagênica e antifúngica, antimitótico, anti-histamínica, entre outras. Sendo assim, as pesquisas são guiadas a partir do conhecimento destas propriedades farmacológicas e do conhecimento popular.

Um dos gêneros de plantas medicinais encontrados na flora brasileira é o gênero *Baccharis* (Família Asteraceae) que possui cerca de 500 espécies descrita entre arbustos, subarbustos, árvores e trepadeiras (FERRACINI et al., 1995). As espécies deste gênero ocorrem em diversas regiões da América desde os Estados Unidos até a Argentina, sendo que 90% está localizada na América do Sul (BONA et al., 2005; BUDEL et al., 2005). Uma das espécies deste gênero é a espécie *Baccharis trimera* que se apresenta como plantas subarborescentes encontradas na

região sul e sudeste do Brasil. É muito conhecida por seu sabor amargo e utilizada contra distúrbios hepáticos e digestivos.

A análise da diversidade microbiana é importante para compreender a função dos microrganismos nos seus habitats específicos, pois desta forma é possível o desenvolvimento de técnicas, processos e produtos ecologicamente corretos e substituir produtos poluentes que possuam melhor atividade biológica (GRIFFITHS; PHILIPPOT, 2013).

A microbiota das plantas medicinais pode estar associada à praticamente todas as partes das plantas. Um dos principais locais de associação é a rizosfera, que é representada por uma breve porção de solo que circunda as raízes das plantas e apresenta uma intensa colonização microbiana influenciada pelos exsudados radiculares vegetais. Outro local importante de associação entre plantas e microrganismos é o tecido interno vegetal, onde microrganismos que se encontram neste local são definidos como endófitos (QIN et al., 2011). As interações entre plantas e bactérias podem ser benéficas, neutras ou deletérias. As bactérias classificadas como benéficas para as plantas podem promover o crescimento vegetal ao diminuírem os efeitos dos estresses ambientais (bióticos e abióticos).

Os microrganismos também podem conviver em interações de antagonismo no ambiente, a qual um organismo cria condições desfavoráveis para o desenvolvimento de outros. Por conta destas interações deletérias no ambiente em que os microrganismos compartilham, ocorrem interações chamadas de antibiose em que um organismo produz um metabólito que será prejudicial sobre outro organismo. Estes microrganismos antagonistas terão mais chances de se estabelecer e perpetuar no ambiente em detrimento de outros influenciando, portanto, a comunidade microbiana (SINGH et al., 2011). Os microrganismos podem utilizar as diferentes formas para sua proteção e do hospedeiro, através da produção de moléculas bioativas, as quais podem ser expressas conforme as condições do ambiente, como em situações de estresse biótico e abiótico (HARDOIM et al., 2015).

Os microrganismos quando crescem em ambientes sob limitada disponibilidade de ferro produzem sideróforos. Sua principal função é captar o ferro do ambiente e torná-lo disponível para a célula microbiana. Os sideróforos são comumente liberados para o meio ambiente, aonde irão se ligar ao ferro e posteriormente serão absorvidos novamente pela célula.

A presença de sideróforos eleva significativamente a biodisponibilidade de ferro para os microrganismos o que resulta na proliferação da população microbiana, acarretar em uma alteração na comunidade microbiana do solo (SULLIVAN et al., 2012). Os sideróforos possuem diversas aplicações biotecnológicas tais como, no fornecimento de Ferro para a planta, agentes de biocontrole, remoção de metais pesados do solo (Peralta, 2012; Singh, 2016), como biossensor para a detecção de baixas concentrações de ferro (AHMED; HOLMSTROM, 2014), na área medicinal são utilizados para formar complexos com antibióticos aumentando a eficiência de absorção do fármaco (SAHA et al., 2016).

Já os biossurfactantes são geralmente de origem microbiana, estes compostos diminuem a tensão superficial e possuem alta capacidade emulsificante, são provenientes de subprodutos de metabólitos de bactérias, fungos e leveduras. Eles possuem característica anfifílica que os permitem atuar entre duas interfases de fluídos de diferentes polaridades tais como água/óleo e água/ar diminuir a tensão superficial e interfacial (GAUTAM; TYAGI, 2006; BANAT et al., 2010).

Neste sentido, este trabalho foi desenvolvido a fim de investigar como é composta a comunidade bacteriana cultivável da rizosfera e endorrizosfera da planta medicinal *B. trimera* a fim de melhor caracterizar esta comunidade e adicionalmente foi investigado potencial antagonista, produção de sideróforo e surfactantes dos isolados obtidos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

As plantas são naturalmente colonizadas por microrganismos tanto externamente como internamente através de diversas formas de interações. Um dos locais de interação são as superfícies externas das plantas onde ocorrem diversas interações microbianas, principalmente na zona da raiz (rizosfera) assim como nas partes aéreas, especialmente nas folhas (filosfera) (GOSWAMI et al., 2016). Alguns dos microrganismos provenientes da rizosfera e da filosfera, bactérias e/ou fungos, podem adentrar os tecidos internos das plantas e colonizar os espaços intercelulares e tecidos vasculares vegetais, onde residem por pelo menos parte de suas vidas promovendo benefícios e desempenhando diferentes funções importantes que influenciam a planta, estabelecendo interações simbióticas, neutras ou patogênicas (VERMA; GANGE, 2014).

Os recentes avanços na pesquisa de interações planta-microrganismo revelaram que as plantas são capazes de moldar seu microbioma da rizosfera, como evidenciado pelo fato de que diferentes espécies de plantas hospedam comunidades microbianas específicas ainda que cultivadas no mesmo solo (BERENDSEN, 2012).

A diversidade de microrganismos associados às raízes das plantas é enorme, estimada na ordem de dezenas de milhares de espécies. Estas complexas comunidades microbianas associadas às plantas, também são conhecidas como o segundo genoma das plantas, se fazendo imprescindível para a saúde vegetal pelos benefícios que os microrganismos associativos proporcionam para as plantas (BERENDSEN, 2012).

Os microrganismos associativos de plantas, incluindo aqui microrganismos rizosféricos e endosféricos, de diversas plantas agrícolas e também aqueles que são simbióticos, como nas associações entre plantas leguminosas e as bactérias do grupo dos rizóbios (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, entre outras), são estudados há bastante tempo devido a sua importância agrônoma. Diversas espécies bacterianas dos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas*, entre outras, têm sido obtidas de plantas como milho, cana-de-açúcar, arroz e trigo, sendo os benefícios destas bactérias na nutrição e crescimento das plantas hospedeiras, conhecidos para diferentes culturas agrícolas (BHATTACHARJEE; SINGH, 2008; VELÁZQUEZ et al., 2008; PISARSKA; PIETR, 2011).

Portanto, grande parte do conhecimento atual sobre as interações entre microrganismos e plantas, sobre a diversidade microbiana e a importância destes microrganismos no habitat da rizosfera e endosfera são provenientes de estudos com espécies de importância agrônoma (MELOROSE et al., 2015). Somente mais recentemente esta visão tem sido ampliada, evidenciando que diversas espécies vegetais, principalmente as medicinais, podem habitar uma grande diversidade de microrganismos desconhecidos e que apresentam um potencial enorme na produção de compostos bioativos com diferentes atividades biológicas, principalmente antimicrobianas (STROBEL et al., 2003).

Estes e outros estudos similares têm mostrado o crescente interesse pelos microrganismos associados a plantas, principalmente os endofíticos, os quais concentram grande maioria das pesquisas. Apesar do crescente interesse e dos inúmeros estudos que vem sendo realizados nos últimos anos, a diversidade

microbiana associada a endosfera e a rizosfera da grande maioria das espécies vegetais é ainda desconhecida. Do mesmo modo, o conhecimento sobre o potencial metabólico desta microbiota é ainda incipiente.

O Brasil é um país privilegiado pela sua megabiodiversidade, detendo em seu território entre 15 e 20% do número total de espécies do planeta e também, a flora mais diversa do mundo que é composta por mais de 55 mil espécies vegetais (LEWINSOHN, 2006). Para a busca de microrganismos com interesse na produção de compostos bioativos dentro desta enorme diversidade, as plantas que apresentam biologia única, propriedades medicinais, uso popular reconhecido, história etnobotânica e que sejam endêmicas, possuem maior relevância nestes estudos (STROBEL et al., 2003).

Conforme destacado por Strobel, se considerarmos que cada uma das 300 mil espécies de plantas superiores pode habitar um ou mais endófitos e que a maior parte destas plantas permanece ainda inexplorada, é imensa a oportunidade de se descobrir novos e interessantes microrganismos (STROBEL et al., 2004).

As plantas medicinais apresentam inúmeras propriedades farmacológicas, como exemplo, pode-se citar efeitos como, anti-helmintico (MONTELLI et al., 2016), antimicrobiana (AKTHAR et al., 2014), antitumoral, antimutagênica e antifúngica (HUANG et al., 2001), antimitótico (BOSCO; GOLSTEYN, 2017), anti-HIV/AIDS (NYAMUKURU et al., 2017), antiestrogênica e anti-histaminica (MUHIT et al., 2016), imunoestimulador (NIE et al., 2013), vasoconstritor (WÖLFLE et al., 2017), antioxidantes (CAI et al., 2004), anticonvulsivante (RABIEI, 2017), antidiabetes e antiobesidade (SAAD et al., 2017), antiplasmodial (TAHIR et al., 1999), antileishmania (GONZÁLEZ et al., 1998). Além destas, as plantas medicinais possuem muitas outras ações como revisadas por Carvalho que também possuem ações analgésicas de modo geral e analgésicas contra enxaqueca, ansiolíticos simples, antiagregante plaquetário, antidepressivos, cicatrizante, diuréticos, moduladores do apetite e produtos para dietas especiais, entre muitas outras (CARVALHO et al., 2008).

Devido às inúmeras propriedades, diferentes espécies de plantas medicinais vêm sendo estudadas visando à caracterização de sua composição fitoquímica e muitas das substâncias isoladas destas plantas são fontes de moléculas para o desenvolvimento de novos fármacos. Diversos princípios ativos de plantas medicinais brasileiras estão disponíveis no mercado na forma de fármacos

fitoterápicos, alguns exemplos são MARACUGINA[®], um fitoterápico com ação sedativa muito conhecida a qual seu princípio ativo é extraído de *Passiflora alata* e comercializado na forma de comprimidos (CASTILLO et al., 2003); ÁGUA INGLESA[®] extraído de *Cinchona calisaya* é utilizado como produto tônico e estimulante do apetite (LABORATÓRIO CATARINENSE, 2016); a CATUAMA[®] é um fitoterápico extraído de *Trichilia catigua*, age como estimulante do sistema nervoso central, cardiotônico e vasodilatadores (LABORATÓRIO CATARINENSE, 2005); o fitoterápico TEBONIN[®], extraído de *Ginkgo biloba* foram descritos no tratamento da insuficiência cerebral, déficits cognitivos e na doença vascular periférica (CAIEIRO; MARCUCCI, 2010); SENE HERBARIUM[®] é extraído de *Senna alexandrina* e é utilizado no caso de constipação ocasional (HERBARIUM, 1998); CLIFEMIN[®] é um fitoterápico extraído de *Actaea racemosae* é utilizado para o alívio dos sintomas do climatério, como rubor, ondas de calor, suor excessivo, palpitações e alterações depressivas de humor (HERBARIUM, 2016); NATUS GERIN[®] é uma associação de vitaminas, minerais, aminoácidos essenciais e *Panax ginseng*, esta associação combate os sintomas causados pela fadiga, cansaço, exaustão, envelhecimento e convalescência (LEGRAND, 2003).

A OMS (Organização Mundial da Saúde) define planta medicinal como sendo "todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos". A diferença entre planta medicinal e medicamento fitoterápico reside na elaboração a partir de uma planta para uma formulação específica, o que caracteriza um fitoterápico. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos do seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. É o produto final acabado, embalado e rotulado (CARVALHO et al., 2008).

2.1. *Baccharis trimera* (Less DC Asteraceae)

Um dos gêneros encontrados na flora brasileira é o gênero *Baccharis* L. (Família Asteraceae e Bercht. & J. Presl; tribo Astereae Cass.) que possui atualmente cerca de 500 espécies descrita entre arbustos, subarbustos, árvores e trepadeiras (FERRACINI et al., 1995). As espécies deste gênero ocorrem em regiões geográficas dos Estados Unidos até a Argentina com predominância de 90% na América do Sul, principalmente no Brasil, Argentina, Chile e Colômbia, onde ocupam

geralmente regiões de elevada altitude. A alta concentração destas plantas no Brasil e no Andes oferece indícios de que esses possam ser os prováveis centros de origem deste gênero (BONA et al., 2005; BUDEL et al., 2005). No Brasil, as espécies de *Baccharis* sp. são encontradas em todas as regiões brasileiras fazendo parte do ecossistema da Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa, Pantanal (JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO, 2017).

O gênero *Baccharis* foi subdividido em 28 grupos para formar unidades mais amplas baseados nas similaridades morfológicas entre elas, um destes grupos é o grupo Trimeria que reúne espécies com cladódios como por exemplo *B. trimera* e *B. microcephala*, ambas são utilizadas popularmente como diuréticos, digestivos e hepatoprotetor (BARROSO et al., 2002; BUDEL et al., 2003) e na indústria de fitoterápicos, as carquejas também participam de fórmulas emagrecedoras. As plantas deste grupo são encontradas nas regiões sul e sudeste do Brasil e também em regiões da Argentina, Bolívia, Paraguai e Uruguai (BONA et al., 2005).

Baccharis trimera é uma planta nativa subarborescente que atinge de 0,5 a 1,0 m de altura e medindo cerca de 0,5 a 1,3 cm de largura. É uma espécie dióica, ramificada com ramos sem folhas tripladas com alas descontínuas membranosas (Figura 1) (SIMÕES-PIRES et al., 2005). As inflorescências são do tipo capítulo, dispostas lateralmente nos ramos e de cor esbranquiçada (KARAM et al., 2013).

Figura 1: Plantas de *Baccharis trimera* em estágio vegetativo (A) e reprodutivo (B), ramo de inflorescência (C) e detalhe dos frutos aquênios (KARAM et al., 2013).



A espécie *Baccharis trimera* (Less.) D.C., conhecida popularmente como Carqueja ou Carqueja-amargosa, pois é conhecida por seu sabor amargo e seu uso medicinal é bastante difundido no Brasil, sendo utilizado principalmente na forma de infusão de suas partes aéreas, o qual é amplamente empregado na medicina popular pelos seus efeitos terapêuticos contra distúrbios hepáticos e digestivos, reumatismo, diabetes, processos inflamatórios, angina e má circulação. De acordo com OLIVEIRA (2012), o óleo essencial de *B. trimera* possui efeitos contra *Schistosoma mansoni*.

Diversos estudos fitoquímicos revelaram que a composição química de *B. trimera* é rica em taninos, polifenóis e flavonóides, tais como, como quercetina, luteolina, lactonas, sesquiterpenos (SUZUKI et al., 2016) e taninos apigenina e hispidulina, neptina e o diterpeno clerodano (BRANDA et al., 2000; LIGON et al., 2000; BORELLA; FONTOURA, 2002).

No óleo essencial foram encontrados α -pineno, β -pineno, carquejol, acetato de carquejila, canfeno e nopineno (SIMÕES-PIRES et al., 2005). Testes realizados com o óleo essencial da carqueja verificaram as ações hepatoprotetora e anti-inflamatória (REIS LÍVERO, DOS et al., 2016), analgésica, bacteriostática e bactericida (BUDEL et al., 2005), antiproteolítica e anti-hemorrágica contra veneno de cobra (JANUÁRIO et al., 2004) e antidiabética (REIS LÍVERO, DOS et al., 2016).

Recentemente Vieira e colaboradores, estudaram a comunidade de fungos endofíticos e seu potencial antimicrobiano. Encontraram 23 taxa de fungos endofíticos em *B. trimera*. Todos os isolados de fungos foram cultivados e seus extratos brutos foram selecionados para ser examinados quanto suas atividades antimicrobianas. Vinte e três extratos (12,8%) exibiram atividades antimicrobianas contra ao menos um microrganismo alvo. Os resultados deste trabalho mostram que a comunidade de fungos endofíticos da comunidade associada à planta medicinal *B. trimera* é diversa e podem representar fontes de compostos com atividade antifúngica (MARIANA L. A. VIEIRA, SUSANA JOHANN, FREDERIC M. HUGHES, 2014).

Apesar dos inúmeros trabalhos acerca dos estudos fitoquímicos de plantas do gênero *Baccharis*, existem poucos estudos sobre a diversidade microbiana associada a plantas deste gênero.

2.2 Interações planta-microrganismos (Rizosfera e Endosfera)

A rizosfera compreende uma pequena região do solo adjacente às raízes e sob influência direta destas. A rizosfera é um ambiente altamente dinâmico, pois as raízes liberam diversos compostos, em um processo conhecido como rizodeposição que compreende a liberação de células (ápices das raízes emergentes, coifa, epidérmicas) e de exsudatos radiculares (COMPANT et al., 2010). Uma grande fração (5-30%) do carbono fixado pelas plantas, é liberado através das raízes na forma de compostos de baixo peso molecular como aminoácidos, carboidratos, hormônios vegetais, ácidos orgânicos, açúcares, compostos fenólicos, íons entre outros metabólitos. Os compostos de alto peso molecular como mucilagem (polissacarídeos) e proteínas que, embora sejam menos diversos, representam a maior parte da massa dos exsudatos radiculares (Figura 2)(BAIS et al., 2006; BALDANI et al., 2014; LUGTENBERG, 2014; SACHDEVA, 2014).

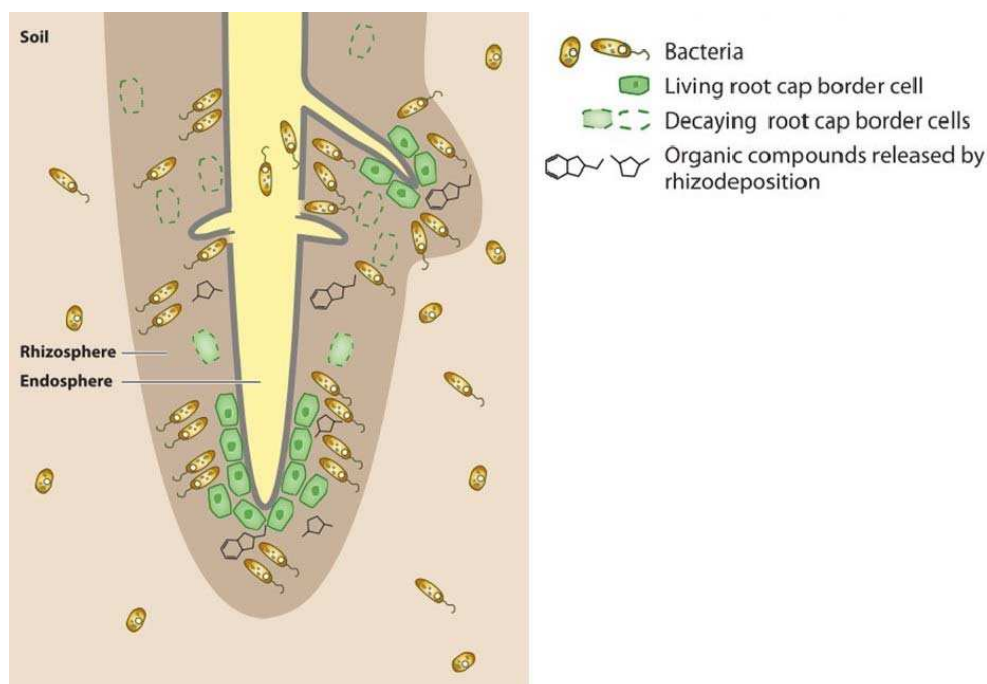


Figura 2: Rizodepósitos gerados a partir de células da epiderme do ápice apical das raízes e de células mortas da rizoderme provocam mudança no bioma do solo rizosférico. A disjunção celular da superfície radicular durante a emergência da raiz lateral fornece uma entrada potencial para a microbiota da rizosfera para o interior da raiz. Os habitats são, de fora para dentro da raiz, solo, rizosfera e endosfera. Fonte: (BULGARELLI et al., 2012).

A rizosfera é um habitat altamente propício para os microrganismos do solo, sendo colonizado por inúmeras espécies microbianas. Os exsudatos radiculares

liberados pelas raízes representam uma fonte rica e diversa de nutrientes para os microrganismos do solo, os quais são atraídos por quimiotaxia para esta região, um evento conhecido efeito rizosfera. Devido ao efeito rizosfera, a quantidade e a diversidade de microrganismos é 10 a 1000 vezes maior na rizosfera que em solo não-rizosférico, sendo mais elevada na região mais próxima à superfície radicular (rizoplane) (BAIS et al., 2006; LUGTENBERG, 2014; MEENA, 2015).

O efeito rizosférico pode ser medido pela razão entre a densidade populacional em unidades formadoras de colônia (UFC) da rizosfera (R) e do solo (S). Esta razão (R/S) pode ser diferente de acordo com a espécie vegetal, bem como, a sua idade e estágio em que se encontra, e isto está diretamente relacionada com a quantidade de liberação dos exsudatos radiculares. A composição da comunidade microbiana da rizosfera pode ser influenciada por fatores bióticos e abióticos. O solo tem uma forte influência sobre a comunidade microbiana na rizosfera, pois suas características físico-químicas afetam a fisiologia das plantas e, conseqüentemente, a composição e quantidade dos exsudatos radiculares. Segundo PHILIPPOT et al. (2013), a composição da microbiota da rizosfera é resultado de uma hierarquia de eventos. Primeiro, o solo pode ser considerado como uma fonte células microbianas e as propriedades físico-químicas juntamente com os processos biogeográficos estruturam esta comunidade. Então, o local onde as plantas são cultivadas determina a qual biota as raízes das plantas serão expostas. Em seguida, as espécies de plantas e o genótipo determinam fortemente quais os membros deste reservatório podem crescer e prosperar na rizosfera.

O solo é um dos maiores e mais diversos ecossistemas microbianos pois habita uma grande diversidade de bactérias e fungos sendo considerado a fonte principal de microrganismos da rizosfera e endosfera. Os principais grupos filogenéticos comumente encontrados no solo Fungi, Bactéria, Metazoa, Alveolata e Archaea (SCHNEIDER et al., 2012). Os principais filos bacterianos comumente encontrados no solo são Firmicutes, Actinobacteria, Acidobacteria, Proteobacteria, Bacteroidetes, Gemmatimonadetes, Nitrospira, Verrucomicrobia assim como os principais grupos filos fungicos encontrados no solo são Ascomycota, Basidiomycota, Zigomycota, Deuteromycota, Mucoromycotina e Glomeromycota (SINGH et al., 2007; SCHNEIDER et al., 2012; LUGTENBERG, 2014; PROBER et al., 2015)

A maior parte dos microrganismos associados a plantas são habitantes comuns do solo. Estes microrganismos podem se mover do solo para a rizosfera e colonizar essa região e as raízes das plantas, sendo que algumas espécies podem também colonizar o caule, folhas, flores e, eventualmente, sementes (COMPANT et al., 2010). Existem diversas definições sobre endófitos, no entanto, são definições pouco diferentes, como microrganismo capazes de colonizar tecidos internos das plantas sem causar sintomas de danos ao hospedeiro (HALLMANN et al., 1997). Apesar de a natureza assintomática da ocupação endofítica nos tecidos vegetais costuma ser relacionada com relações simbióticas ou mutualísticas entre ambos, entre a biodiversidade dos endófitos também podem ser encontrados saprófitas agressivos ou patógenos oportunistas (Strobel et al., 2003).

Exceto os endófitos oriundos de sementes, o método passivo mais utilizado para entrar nas raízes ocorre através de fissuras radiculares e através de fendas teciduais resultantes do crescimento e abrasão contra o solo das raízes (SESSITSCH et al., 2012). No local dessas lesões, acontece o extravasamento de metabólitos das plantas e por isto ocorre uma intensa atração de bactérias (BERG et al., 2005). O ápice apical radicular e a coifa são os locais preferenciais para adesão de bactérias rizosféricas e posteriormente entrada nas raízes. As bactérias também utilizam como local de entrada onde ocorrem diferenciação e alongamento dos pelos radiculares, assim como, espaços intercelulares da epiderme das raízes. As bactérias também podem adentrar os tecidos por outros locais como estômatos, lenticelas, radículas e raízes emergentes (LUGTENBERG, 2014).

O reconhecimento é considerado um evento chave para a interação entre microrganismos e plantas hospedeiras. O reconhecimento pode ocorrer através de interações físicas utilizando, por exemplo, adesinas, fimbrias e flagelos ou através de sinalização por pequenas moléculas (LUGTENBERG et al., 2002). Para colonizar os tecidos internos os endófitos precisam ter características necessárias competentes para atravessar as barreiras impostas pelas raízes, ou seja, possuir mecanismos ativos para o processo de penetração, tais como a produção de enzimas que degradem parede celular como celulases e poligalacturonidase, produção de lipopolissacarídeos, motilidade (flagelos), adesão celular (pili Tipo IV) e vias metabólicas envolvidas no reconhecimento e catabolismo de compostos da planta, tais como a absorção e degradação de polissacarídeos derivados de plantas (MATTICK, 2002; COMPANT et al., 2010).

Para os endófitos sobreviverem dentro de um tecido é necessário se adequar a um novo ambiente que fornece abrigo mais seguro, nutrientes e baixa exposição a estresses bióticos e abióticos, levando isto em consideração, é esperada uma competição entre os microrganismos endofíticos, ainda assim, nada comparado, com o ambiente competitivo da rizosfera (LUGTENBERG, 2014). A colonização dos tecidos internos das plantas precisa ser coordenada para que não ocorra um excesso na concentração de endófitos, ou seja, uma densidade celular bacteriana excessivamente grande, pois isso poderia resultar em morte do hospedeiro. Para isto, genes envolvidos com o sistema *quorum sensing* são comumente encontrados em microrganismos endofíticos (REINHOLD-HUREK; HUREK, 2011; LUGTENBERG, 2014). O termo *quorum sensing* descreve um fenômeno em que as bactérias possuem a capacidade de perceber e responder a moléculas de sinal autogeradas para coordenar o seu comportamento frente ao tamanho da população. As bactérias desencadeiam estes sinais somente quando a densidade celular atinge um determinado limiar (quórum) a qual a expressão de genes é ativada ou reprimida (DANHORN; FUQUA, 2007; LUGTENBERG, 2014).

2.3 Diversidade de microrganismos associados às plantas

Os microrganismos desempenham papéis fundamentais na manutenção e funcionamento de diversos ecossistemas (PROBER et al., 2015), e isto pode ser atribuído a grande diversidade microbiana existente nos diferentes ecossistemas.

A diversidade microbiana pode ser avaliada por diferentes níveis de diversidade, tais como diversidade de espécies (representada pelo número de espécies diferentes em um bioma ou habitat); genética (variedade de genes dentro de uma espécie), funcional (quantidade de processos biológicos, funções ou características de um ecossistema particular), trófica (indicador da complexidade da cadeia alimentar), ecológica (inclui a variabilidade na estrutura da comunidade); fenotípica e funcional (processos ou padrões de utilização de fontes de carbono na comunidade, no entanto, é restrita às informações genéticas expressas em determinadas condições ambientais) (JOHNSEN et al., 2001; TORSVIK; ØVREÅS, 2002; DENG, 2012).

A diversidade microbiana inclui a variabilidade genética entre as espécies podendo ser avaliada pela sua riqueza e equitabilidade/uniformidade das espécies e

grupos funcionais na comunidade. O termo riqueza refere-se ao número de espécies na amostra (comunidade, flora, fauna, etc.) enquanto o termo uniformidade representa a distribuição de indivíduos entre as espécies em uma amostra (abundância relativa). A diversidade microbiana descreve a complexidade e variabilidade entre os diferentes níveis de organização biológica (JOHNSEN et al., 2001; TORSVIK; ØVREÅS, 2002).

Os índices de diversidade de espécies refletem a variedade de espécies de organismos vivos de uma região, habitat ou comunidade. Estes índices utilizam definições de informações taxonômicas do grupo a ser analisado. No entanto, os índices de diversidade não podem indicar a composição de uma comunidade por ser um valor único, ou seja, duas ou mais comunidades podem ter o mesmo valor de diversidade, mas com valores de riqueza e uniformidade diferentes entre as comunidades (ZILLI et al., 2003).

A diversidade pode ser definida em diferentes escalas e são designadas de alfa (α), beta (β) e gama (γ). A diversidade α também é chamada de diversidade local, correspondendo à diversidade dentro de uma comunidade ou habitat. Já a diversidade β mede o quanto a composição de espécies varia de um lugar para outro ou em resposta a variações ambientais quaisquer. A diversidade γ , também chamada de diversidade regional, remete à uma diversidade de uma grande área, bioma, ilha, continente (PROBER et al., 2015).

A análise da diversidade microbiana é extremamente importante para compreender a função dos microrganismos nos seus habitats específicos, pois através disso é possível caminhar em direção ao desenvolvimento de técnicas, processos e produtos ecologicamente corretos e substituir produtos poluentes e que sejam tão efetivos quanto ou mais que os atuais em comercialização, e principalmente que possuam melhor atividade biológica (GRIFFITHS; PHILIPPOT, 2013).

A rizosfera é uma das fontes principais microrganismos que colonizam a endosfera, onde apenas alguns filos bacterianos (Tabela 1) que são comuns na rizosfera são capazes de colonizar os tecidos internos das plantas (RASCHE et al., 2006; BULGARELLI et al., 2013). A diversidade bacteriana da endosfera pode ser considerada, um subconjunto da rizosfera e/ou da comunidade associada as raízes (SANTOYO et al., 2016).

Tabela 1: Filos bacterianos dominantes na rizosfera e endosfera de diferentes plantas hospedeiras.

Espécie Hospedeira	Rizosfera	Endosfera	Filo dominante
Aveia brava (<i>Avena fatua</i>)	X		Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria
Carvalho (<i>Quercus</i> sp.)	X		Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria
Álamo (<i>Populus deltoides</i>)	X		Acidobacteria, Proteobacteria
		X	Proteobacteria
Batata (<i>Solanum tuberosum</i>)	X		Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria
Batata (<i>Solanum tuberosum</i>)	X		Actinobacteria, Proteobacteria
Batata (<i>Solanum tuberosum</i>)		X	Actinobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria
Beterraba (<i>Beta vulgaris</i>)	X		Actinobacteria Firmicutes Proteobacteria
Milho (<i>Zea mays</i>)	X		Proteobacteria
Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	X		Actinobacteria, Proteobacteria
Arroz (<i>Oryza sativa</i>)		X	Firmicutes, Proteobacteria
<i>Arabidopsis thaliana</i>	X		Acidobacteria, Planctomycetes, Proteobacteria
		X	Actinobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria
<i>Arabidopsis thaliana</i>	X		Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria
		X	Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes Proteobacteria

Fonte: Adaptado de BULGARELLI et al. (2013).

Já foram reportados mais de 200 gêneros e 16 filos bacterianos relatados como endófitos, incluindo bactérias cultiváveis e ainda não cultivadas pertencentes aos Filos Acidobacteria, Actinobacteria, Aquificae, Bacteroidetes, Chlorob, Chloroflexi, Cyanobacteria, Deinococcus-Thermus, Firmicutes, Fusobacteria, Gemmatimonadetes, Nitrospira, Planctomycetes, Proteobacteria, Spirochaetes e Verrucomicrobiae (ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006; HALLMANN E BERG, 2006; Sessitsch et al., 2012; Sun et al., 2006). No entanto, são encontrados principalmente os filos Actinobacteria, Firmicutes e Proteobacteria. Estudos têm mostrado a grande diversidade de microrganismos habitando a rizosfera e a endosfera de inúmeras plantas. Estudos independentes de cultivo têm revelado que estes habitats têm o microbioma altamente complexo.

As pesquisas de diversidade microbiana equiparam espécies microbianas com unidades taxonômicas operacionais (OTUs) com base na sequência de DNA do gene 16S rRNA. O gene 16S é utilizado como marcador molecular e é utilizado nos estudos de diversidade, evolução e ecologia de procaríotos, muito utilizado para

classificação de bactérias e arqueias. No entanto, o gene 16S possui uma resolução genética insuficiente para nomeação de espécies. OTUs são definidos geralmente como um número de distintas sequências de 16S rRNA agrupadas a um certo nível de diversidade das sequências, geralmente a menor unidade taxonômica é utilizada para o estudo, podendo ser espécies ou táxons superiores ou até mesmo amostras de populações ou indivíduos (ACHTMAN; WAGNER, 2008).

Embora algumas bactérias tenham os genes 16S rRNA 98% idênticos podem ser tratadas como espécies diferentes no mesmo estudo, assim como, espécies diferentes podem ter o 16S mais que 98% ou ocasionalmente completamente idênticos (ACHTMAN; WAGNER, 2008).

2.3.1 Gene 16S rRNA

Os ribossomos são moléculas compostos por proteínas e RNA ribossomal. Sua função é a síntese protéica ou o processo chamado tradução. Para isto ocorre a leitura de um RNA mensageiro como fonte de informação enquanto os RNA transportadores carregam os aminoácidos que serão incorporados ao polipeptídeo que está sendo formado (WEIL, 2016).

O ribossomo funcional é composto por duas subunidades, a maior e a menor. A subunidade maior é responsável pela síntese das proteínas correspondente ao mRNA. Esta subunidade possui uma taxa de sedimentação de 50S por ser constituída por 30 proteínas, pelo rRNA 23S (codificado por um gene de 2900 pb) e pelo rRNA 5S (codificado por um gene de 120 pb). Já a subunidade menor possui a função de “leitura” do mRNA. Esta subunidade possui uma taxa de sedimentação de 30S por ser composta por 20 proteínas mais o rRNA 16S (codificado por um gene de 1550 pb) (WEIL, 2016).

O fato de o gene 16S codificar um componente imprescindível para a célula, expressa a importância do grau de conservação deste gene. O tamanho da sequência é grande o suficiente e com polimorfismos interespecíficos. Embora o uso de um único gene tenha muitas desvantagens, o gene 16S é considerado um bom marcador taxonômico e amplamente utilizado por ser suficientemente informativo para a identificação de microrganismos até o nível de gênero e em muitos casos até nível de espécie (RENVOISÉ et al., 2013).

Um dos métodos utilizados para o estudo da diversidade microbiana é a investigação da sequência parcial do gene 16S rRNA. Este gene é amplamente utilizado por possuir propriedades adequadas para a identificação de bactérias, pois (i) está presente em todos os organismos procariotos, (ii) possui informações para a realização de análises filogenéticas, (iii) apresenta regiões conservadas que permitem a identificação de diversas espécies com o mesmo *primer*, bem como, o estudo de comunidades microbianas por técnicas independente de cultivo utilizando este mesmo *primer* (iv) e também possui regiões hipervariadas que permitem a nomeação de gêneros bacterianos e em muitos casos até espécies bacterianas diferentes. O nível de variação pode atuar como uma medida da distância evolutiva entre espécies microbianas. Outro motivo para sua ampla utilização é que já possui milhares de sequências em bancos de dados de livre acesso (CASE et al., 2007).

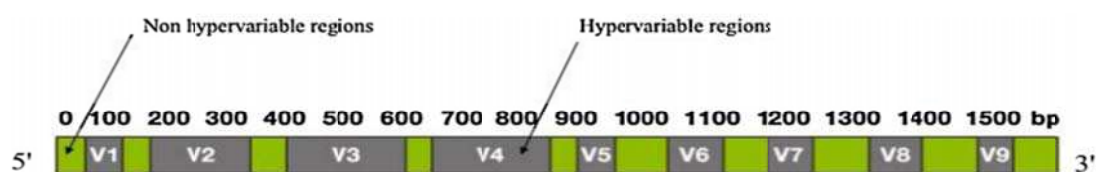


Figura 3: Representação esquemática do gene ribossômico 16S rRNA. As setas indicam as regiões conservadas (*Non hypervariable regions*) e hipervariadas (*Hypervariable regions*) (RENVOISÉ et al., 2013).

2.4 Importâncias dos microrganismos Rizosféricos e Endofíticos

Diversos microrganismos são capazes de promover o crescimento das plantas, geralmente são designadas como PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria* - rizobactérias promotoras de crescimento de plantas). Os efeitos benéficos dessas rizobactérias no crescimento das plantas podem ser diretos ou indiretos (LUGTENBERG; KAMILOVA, 2009). Para exercer seus efeitos benéficos, as bactérias geralmente devem colonizar a superfície da raiz ou colonizar a porção de solo logo após as raízes – a rizosfera. Alguns exemplos de promoção direta do crescimento das plantas incluem biofertilização, estimulação do crescimento radicular, rizorremediação e controle do estresse da planta (LUGTENBERG; KAMILOVA, 2009). Mecanismos de controle biológico pelos quais as rizobactérias podem promover indiretamente o crescimento da planta, isto é, reduzindo o nível de

doença, incluindo antibiose, indução de resistência sistêmica e competição por nutrientes e nichos através da produção de substâncias e moléculas (WHIPPS, 2001).

2.4.1 Produção de compostos bioativos

Os microrganismos que interagem com as plantas podem ter diferentes efeitos, tais como, prejudicial (patogênicos), neutro ou benéfico sobre a planta hospedeira (BHATTACHARYYA; JHA, 2012). São os sinais químicos produzidos pelas plantas e pelos microrganismos que fazem a mediação entre estas interações e determinam se uma interação será benéfica ou prejudicial (BAIS et al., 2006). A maior parte das bactérias associativas de plantas são comensais e não apresentam efeitos visíveis no crescimento e fisiologia da planta hospedeira. Já os microrganismos saprofíticos utilizam material vegetal morto e participam de processos importantes como a ciclagem de elementos e compostagem (LUGTENBERG et al., 2002; BHATTACHARYYA; JHA, 2012). Os microrganismos patogênicos, podem infectar qualquer parte da planta seja caule, folhas, frutos ou raízes e, pela produção de substâncias fitotóxicas e/ou outros mecanismos, eles prejudicam o crescimento e fisiologia da planta.

Em contrapartida, colonizando os mesmos habitats encontram-se os microrganismos benéficos chamados coletivamente de bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP). Cerca de 2 a 5 % das bactérias da rizosfera (rizobactéria) tem atividade promotora do crescimento vegetal. O termo “rizobactérias promotoras do crescimento vegetal” foi cunhado por Joe Kloepper no final dos anos de 1970, e definidas como “bactérias do solo que colonizam as raízes das plantas previamente inoculadas nas sementes e que aumentam o crescimento das plantas” (SACHDEVA, 2014). Assim como as rizobactérias, as endofíticas também podem afetar positivamente o crescimento e a saúde de plantas (SANTOYO et al., 2016).

Diferentes mecanismos tanto diretos quanto indiretos podem ser utilizados pela BPCPs. Nos mecanismos diretos os microrganismos promovem a aquisição de nutrientes e minerais essenciais para a planta, tais como: (a) fixação biológica de nitrogênio (FBN), (b) solubilização de fosfato (MISHRA et al., 2015) e (c) mobilização de outros nutrientes também muito essenciais para as plantas como Ca, K, Fe, Cu,

Zn e Mn. Outro método direto é a fitoestimulação em que as bactérias produzem hormônios vegetais, tais como, auxinas, citocininas e giberelinas (COMPANT et al., 2010; BALDANI et al., 2014). Estas bactérias também são capazes de estimular o crescimento da planta indiretamente por diferentes mecanismos como a produção de substâncias quelantes (sideróforos) e compostos antibióticos (biocontrole), degradação de compostos tóxicos, proteção contra estresses bióticos e abióticos, entre outros (BAIS et al., 2006; COMPANT et al., 2010).

Além destes, as BPCP podem ter um efeito indireto no crescimento da planta via controle biológico de fitopatógenos. Entre os mecanismos indiretos encontra-se a produção de antibióticos e substâncias voláteis, que atuarão na proteção e supressão dos efeitos deletérios de fitopatógenos, diminuindo os danos à planta (GLICK, 1995; SANTOYO et al., 2016). Além deste, a estimulação da resistência sistêmica da planta pela produção de diversas moléculas tais como, lipopolissacarídeos, antibióticos, flagelos, N-acyl homoserino-lactonas, sideróforos e biossurfactantes. A produção de quitinases e β -1,3-glucanases que agem na degradação da parede celular de fungos. Algumas bactérias promotoras do crescimento produzem ácido cianídrico (HCN), um inibidor eficaz do citocromo C oxidase e outras metaloenzimas. A sua produção implica no controle biológico de alguns patógenos, como no caso da podridão negra de raízes do tabaco (RAMAMOORTHY et al., 2001; LUGTENBERG, 2014; MISHRA et al., 2015; SREEVIDYA et al., 2016).

A grande maioria das bactérias promotoras tem um ou mais destes mecanismos que em conjunto podem levar a melhoria do estado nutricional da planta e conseqüentemente no seu crescimento e produtividade. Os gêneros bacterianos mais encontrados atuando com promotores do crescimento vegetal *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azobacter*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Frankia*, *Serratia*, *Streptomyces*, *Bacillus* e *Pseudomonas*, sendo os dois últimos são mais comumente estudados e encontrados na rizosfera (BERG et al., 2005; COMPANT et al., 2005; GOSWAMI et al., 2016).

A descoberta de novos compostos bioativo é muitas vezes direcionada pelo conhecimento popular sobre as plantas medicinais (STROBEL et al., 2003, 2004; GUNATILAKA, 2006; CHANDRA, 2012; MOUSA; RAIZADA, 2013). Estudos com plantas medicinais têm sido realizados em todo o mundo principalmente por grupos

de pesquisa chineses, que culturalmente fazem uso terapêutico de diversas espécies medicinais. Estes estudos têm revelado uma grande diversidade de fungos e bactérias, em especial actinobactérias do gênero *Streptomyces* sp., inclusive com a descoberta de algumas espécies e gêneros novos na rizosfera e endosfera de diferentes espécies medicinais. Estes estudos têm também evidenciado que estes microrganismos, em especial os endofíticos, são produtores de diversos metabólitos secundários que podem ter grande relevância biotecnológica, evidenciando o grande potencial destes habitats como fonte de novos microrganismos e de novos compostos bioativos (QIN et al., 2011).

As plantas medicinais abrigam, de fato, uma microbiota diferenciada devido aos metabólitos secundários únicos e divergentes que produzem, esta é a causa mais provável responsável pela alta especificidade dos microrganismos associados às plantas medicinais (QI et al., 2012). Microrganismos associados às plantas representam, principalmente, os endofíticos, representam uma fonte rica e confiável de diversidade genética e espécies ainda não descritas e juntamente com eles é possível que sejam encontrados novos compostos naturais (STROBEL et al., 2003).

Tan e Zou (2001), descrevem que a razão pela qual alguns endófitos são capazes de produzir certos compostos fitoquímicos, originalmente característicos do hospedeiro, podem estar relacionados com uma resposta evolutiva entre o endófito e o hospedeiro através de recombinação genética.

Este conceito foi proposto por STIERLI (1993) ao tentarem explicar o mecanismo pelo qual o fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, foi encontrado produzindo o composto paclitaxel (Taxol®). A produção deste composto foi identificada inicialmente no seu hospedeiro, planta *Taxus brevifolia*, no entanto, mais tarde, foi observado que ambos os microrganismos eram capazes de produzir o mesmo composto (Strobel et al., 2003). O paclitaxel (Taxol®) um diterpenóide com atividade antimitótica muito utilizado contra câncer de ovário e de mama. Mais tarde, foi observado a produção deste composto em diversos outros microrganismos endofíticos isolados de uma ampla variedade de plantas não produtoras de paclitaxel, indicando que a capacidade de produção deste composto, em particular, é mais disseminada entre os fungos do que em plantas (ALY et al., 2010). Esta conexão entre as plantas e seus microrganismos em relação a síntese de compostos bioativos tem sido observada em outras interações principalmente com fungos endofíticos, como nas interações entre *Myceliasterilia* e *Catharanthus roseus*

que produzem vincristina (YANG et al, 2004), *Trametes hirsute* e *Podophyllum hexandrum* produtores de podofilotoxina (PURJ et al, 2006), *Entrophospora infrequense* *Nothapodytes foetidana* produção de camptotecina (PURI et al., 2006), *Thielavia subthermophilae* *Hypericum perforatum* que produzem hipericina (KUSARI et al., 2008).

Conforme reportado por GUNATILAKA (2006), os microrganismos endofíticos são produtores hábeis de diversos compostos bioativos com estrutura química única e, em sua maioria, com atividade antimicrobiana (GUNATILAKA, 2006). Atividade antibacteriana e antifúngica contra patógenos de plantas e também de importância médica, tem sido observada em vários isolados de fungos endofíticos de diferentes espécies de plantas medicinais, como *Orthosiphon stamineus* (chá de Java) (TONG et al., 2011), *Smallanthus sonchifolius* (yacón) (RAMOS et al., 2010), *Camptotheca acuminata* (árvore da vida) (DING et al, 2010). Diversos compostos químicos com estruturas únicas e diferentes tipos de atividade biológicas têm também sido identificados de microrganismos endofíticos, como pestacina e isopestacina (antimicrobiano e antioxidante) obtido *Pestalotiopsis microspora* (STROBEL et al., 2004), antibióticos derivados de policetídeo, pirrocidinas A e B obtidos de *Acremonium zeae* (WICKLOW et al., 2005; WICKLOW; POLING, 2009) entre outros.

Assim como os fungos, as bactérias endofíticas e também as rizosféricas tem grande potencial de produção de metabólitos secundários. As bactérias gram-positivas filamentosas (Actinobactérias) se destacam como um dos principais grupos produtores de antimicrobianos, em especial aquelas do gênero *Streptomyces spp.*, o qual é fonte de 80% dos antibióticos produzidos pelas actinobactérias (STROBEL et al., 2004). Estes microrganismos são habitantes comuns do solo; contudo vários estudos têm revelado uma grande diversidade de actinobactérias no habitat endofítico, em sua maioria com elevada atividade antimicrobiana (QIN et al., 2011). Bactérias do gênero *Streptomyces spp.* Entre outros compostos antimicrobianos descobertos estão os peptídeos munumbicinas e coranomicina que possuem potente atividade antimicrobiana e também antimalárica (CASTILLO; et al, 2002; EZRA et al, 2004).

Além das actinobactérias, outras bactérias como aquelas do gênero *Pseudomonas* e *Bacillus sp.* também se destacam na produção de metabólitos secundários. Membros do gênero *Pseudomonas sp.* são conhecidos pela grande

diversidade metabólica e pela produção de metabólitos secundários como os peptídeos antifúngicos pseudomicinas para controle do fungo fitopatogênico *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal da doença sigatoka negra em bananas (STROBEL et al., 2004). A produção de fengicina e surfactina por isolado de *B. amyloliquefaciens* tem sido também considerado na preservação de alimentos e no controle de doenças de plantas (SUN et al., 2006).

2.5 Antagonismo e produção de compostos antimicrobianos

No ambiente, os microrganismos convivem em condições de associação íntima com indivíduos de outras espécies e raramente as populações se desenvolvem independentemente. As interações entre os microrganismos podem assumir diferentes formas podendo ter efeitos benéficos ou deletérios (DRAKE et al., 2013). Os microrganismos podem possuir relações benéficas em que uma ou ambas as espécies são favorecidas sem ocorrer prejuízos para nenhuma das partes, como no comensalismo em que um dos organismos é beneficiado e não ocorre prejuízo para o outro microrganismo em associação com este. Na protocooperação um dos organismos proporciona o benefício a outro e cada qual se torna um complemento do ambiente de vida para o outro, não sendo obrigatória esta interação (ANDREWS; HARRIS, 2000). Outra forma de interação benéfica é o mutualismo, em que ocorre uma coexistência íntima entre espécies em que recebem os benefícios da associação (HARDOIM et al., 2008).

Por outro lado, os microrganismos também podem conviver em interações de antagonismo no ambiente, as quais alguns microrganismos criam condições desfavoráveis ao desenvolvimento de outros. No parasitismo, o organismo que se comporta como parasita sobrevive em detrimento do seu hospedeiro (HARDOIM, 2008). Outra interação que pode haver predação, semelhante ao parasitismo, no entanto, mais agressiva, pois é baseada na degradação enzimática, por exemplo, da parede celular fúngica (LUGTENBERG; KAMILOVA, 2009). A competição é outra interação entre os organismos, a qual dois organismos competem por um recurso indispensável tal como espaço, água, nutrientes, oxigênio, luz e ferro, fazendo valer então a produção de compostos que irão beneficiar o microrganismo e fazer com que este se sobressaia em relação ao outro como no caso da competição pelo ferro em que o organismo que possui a capacidade de produção de sideróforos

(moléculas quelantes de íons, principalmente o ferro) impedindo que outro organismo utilize este nutriente (LOON et al., 1998; HIBBING et al., 2010).

Por conta destas interações deletérias no ambiente em que os microrganismos compartilham, pode ocorrer outra interação chamada de antibiose em que um organismo produz um metabólito que será prejudicial sobre outro organismo. Estes microrganismos chamados de antagonistas terão mais chances de se estabelecer e perpetuar no ambiente em detrimento de outros influenciando, portanto, a comunidade microbiana (SINGH et al., 2011).

Estas interações estabelecidas entre os microrganismos de um determinado ambiente são governadas principalmente pela disponibilidade de nutrientes, sendo comum a escassez de nutrientes em diversos ambientes como no solo. Neste ambiente competitivo, para sobressair e se estabelecer no ambiente, muitos microrganismos produzem moléculas que interferem no crescimento e sobrevivência de outros organismos (BERG et al., 2005).

Dentre os mecanismos responsáveis pela atividade antagônica incluem: inibição pela produção de antibióticos, toxinas e compostos tensoativos como os biossurfactantes; competição pelo ferro através da produção de sideróforos; competição por locais de colonização e nutrientes fornecidos pelas raízes e sementes; indução de mecanismos de resistência à planta; e parasitismo que pode envolver enzimas de degradação da parede extracelular, tais como, quitinases e β -glucanases (WHIPPS, 2001; BERG et al., 2005).

Em adição a produção de enzimas líticas, mecanismos de parasitismo, como descrito acima, a produção de compostos antimicrobianos é um dos principais recursos utilizados pelos microrganismos antagonistas para se sobressair no ambiente reduzindo deste modo a competição por nutrientes muitas vezes escassos, como em habitats como o solo que possui uma grande diversidade de microrganismos. Um dos grupos microbianos mais eficientes na produção de substâncias antibióticas são as actinobactérias do gênero *Streptomyces sp.* (FIEDLER, 2010). Estes microrganismos possuem uma grande diversidade de vias de biossíntese de antibióticos e, por isso, são capazes de sintetizar uma grande variedade de antibióticos com estruturas únicas. Os microrganismos podem utilizar as diferentes vias, as quais podem ser expressas conforme as condições do ambiente, como em situações de estresse biótico e abiótico.

Diferentes classes de compostos antimicrobianos já comercializados são produzidas pelos microrganismos, tais como antibióticos beta-lactâmicos que inclui a classe das penicilinas (amoxicilina e oxacilina) que são produzidos por fungos do gênero *Penicillium sp.* (PASTRE et al., 2007), as cefalosporinas que são produzidas por espécies de fungo do gênero *Acremonium sp.* (WICKLOW; POLING, 2009). Além dos fungos as bactérias também representam uma fonte muito rica de compostos antimicrobianos principalmente bactérias do gênero *Streptomyces sp.* Este gênero produz antibióticos da classe dos glicopeptídeos, tetraciclinas como, por exemplo, a vancomicina (BASAVRAJ; DEEPAK, 2011), clortetraciclina, eritromicina, estreptomicina, ácido clavulânico, daptomicina, cloranfenicol, rifamicina B e os peptídeos muniticinas A-D (CASTILLO et al., 2017).

2.6 Sideróforos

O ferro é um elemento essencial para o crescimento dos microrganismos, pois atua em diversos processos celulares e participa como cofator de mais de 100 enzimas dos metabolismos primário e secundário (HANTKE, 2001). A sua deficiência pode causar inibição do crescimento celular, redução da síntese de RNA e DNA, inibição da esporulação em bactérias esporulantes e podendo até alterar a morfologia da célula (SOLANKI et al., 2014). O ferro também desempenha um papel importante na formação do biofilme microbiano, uma vez que regula a mobilidade superficial do microrganismo (DANHORN; FUQUA, 2007).

No entanto, ainda que o ferro seja o quarto elemento químico mais abundante na terra, o ferro ferroso (Fe^{2+}), a forma utilizada pelos organismos é pouco disponível na natureza. Isto ocorre, pois em condições aeróbicas, o Fe^{2+} livre é rapidamente oxidado a ferro férrico (Fe^{3+}) formando hidróxido de ferro que é insolúvel em pH fisiológico (NEILANDS, 1995).

Os microrganismos quando crescem em ambientes sob limitada disponibilidade de ferro produzem compostos de baixo peso molecular (~1kDa) com elevada afinidade ao ferro. Estas moléculas são chamadas de sideróforos, e possuem a capacidade de se ligarem fortemente a íons metálicos (NEILANDS, 1995). A principal função do sideróforo é captar o ferro do ambiente e torná-lo disponível para a célula microbiana. Os sideróforos são comumente liberados para o meio ambiente, aonde irão se ligar ao ferro e posteriormente serão absorvidos

novamente pela célula. Após a liberação do ferro na célula, este sideróforo pode ser secretado novamente para o ambiente (KUMAR et al., 2012).

Para o sistema de captação do ferro em gram-negativos existem três componentes que agem para o transporte do ferro para dentro da célula: (1) um sideróforo que atua como o quelante para o ferro férrico, (2) um receptor de membrana por onde o complexo ferro-sideróforo atravessa a membrana microbiana e (3) um sistema enzimático presente no interior da célula para liberar o ferro do sideróforo (MIETHKE; MARAHIEL, 2007; ALI; VIDHALE, 2013).

Dentre as suas utilidades para a célula bacteriana, os sideróforos são utilizados para solubilizar o ferro férrico insolúvel e transportá-lo para dentro da célula, bem como agir como moléculas antimicrobianas competindo pelo ferro disponível impedindo que patógenos utilize este ferro. Os sideróforos são produzidos em condições de baixos níveis de ferro dentro da célula, quando em ambientes deficientes de ferro e em condições que necessitam do sideróforo como agente antimicrobiano (ALI; VIDHALE, 2013).

Apesar da função primária dos sideróforos seja fornecer ferro solúvel para os microrganismos, a produção e liberação destas moléculas podem ter outras funções no ambiente em que são produzidas. Em consequência da captação de ferro do ambiente, os sideróforos indiretamente aumentam a competição por nutrientes minerais impedindo que microrganismos que não façam parte da comunidade microbiana se estabeleçam desta forma protegendo o ambiente que habitam (HIBBING et al., 2010; AHMED; HOLMSTROM, 2014). Da mesma forma, os sideróforos podem fazer a proteção de plantas contra fitopatógenos impedindo que o mesmo adquira o ferro, o que dificulta a proliferação e a colonização das raízes pelo fitopatógeno (SOLANKI et al., 2014). A presença de sideróforos eleva significativamente a biodisponibilidade de ferro para os microrganismos o que resulta na proliferação da população microbiana, acarretar em uma alteração na comunidade microbiana do solo (SULLIVAN et al., 2012).

Os sideróforos possuem diversas aplicações biotecnológicas podendo listar algumas como na agricultura aumentando a absorção de ferro pelas plantas, como controle de fitopatógenos (PERALTA, 2012) e remoção de metais pesados do solo (SAH; SINGH, 2015), na área de biossensor auxiliando na detecção de baixas concentrações de ferro (AHMED; HOLMSTROM, 2014), na área medicinal são utilizados para formar complexos com antibióticos aumentando a eficiência de

absorção do antibiótico pelo microrganismo patogênico resistente à antibiótico, também podem ser utilizados no tratamento de doenças nas quais a principal causa é o acúmulo de ferro no organismo, entre outras aplicações médicas já foram relatadas ações antimalárica e anticancerígena(SAHA et al., 2016).

Os sideróforos podem ser classificados em três diferentes tipos principais de acordo com o seu grupo funcional de ligação ao ferro (III), sendo eles, catecolato ou fenolato, hidroxamato e carboxilato, no entanto, alguns sideróforos podem ter diversas características químicas integrando dois tipos de sideróforos na mesma molécula e variações nas suas ligações geram maior diversidade de estruturas de sideróforos também conhecidos como sideróforos mistos (MIETHKE; MARAHIEL, 2007).

Os sideróforos são compostos bioativos produzidos pelo metabolismo secundário dos microrganismos. Os produtos do metabolismo secundário podem ser produzidos pela via ribossomal ou por dois tipos de complexos multienzimáticos chamados de peptídeo não-riossomal sintetase (NRPS) e policetídeos sintetases (PKS). Estes complexos multienzimáticos são formados por várias enzimas, cada enzima contém os módulos que por sua vez contém os domínios, nos quais, os peptídeos vão sofrendo reações catalíticas e passando de módulo a modulo até formar todo o composto. De modo geral e resumidamente, as enzimas são constituídas por três domínios enzimáticos: (1) domínio de adenilação, que seleciona o aminoácido que será ativado e depois transferido pela (2) proteína carreadora de peptídios para o domínio de condensação (C) que catalisa a formação da ligação peptídica (KLEINKAUF; DÖHREN, VON, 1996; ESMAEEL et al., 2016). O outro tipo de complexo multienzimático, as policetídeos sintetases (PKS) ao invés de selecionar aminoácidos para iniciar a síntese de metabólitos secundários, elas fazem a condensação de unidades acetila ou malonila (KLEINKAUF; DÖHREN, VON, 1996). Os metabólitos secundários também são produzidos por vias metabólicas híbridas e não apenas por uma via, assim como ocorre na montagem do sideróforo yersiniabactin que necessita de um sistema híbrido de peptídeo não-ribossômico/policetídeo (NRPS/PKS) para sua produção (MILLER et al., 2009; KOMAKI et al., 2014).

Algumas bactérias do gênero *Streptomyces* produzem moléculas de sideróforos acopladas a moléculas antibióticas como é o caso da Albomicina produzida por *Streptomyces griseus*, um metabólito secundário que como

característica da molécula é ter no N-terminal uma porção com um sideróforo semelhante ao ferricromo com um átomo de ferro. Esta molécula é captada por bactérias que possuem mecanismo de aquisição de ferro do ambiente. Uma vez dentro da célula, estas duas porções são hidrolisadas enzimaticamente e o C-terminal, um nucleosil dipeptídeo contendo serina, se comporta como seril-AMP (necessário para a síntese de RNA transportador do aminoácido serina) atua como antibiótico por inibição de seril-tRNA sintetase, uma enzima essencial envolvida na síntese de proteínas (BRAUN et al., 2009; KULKARNI et al., 2016). Estes conjugados de sideróforo-fármaco chamados de sideromicinas e utilizam como alvo o sistema de captação de ferro em bactérias e fungos, uma vez dentro da célula, o conjugado é hidrolisado e o fármaco é liberado para agir, esta técnica foi apelidada de "Cavalo de Tróia" pelo seu modo de ação. As sideromicinas representam um novo método de administração de antibióticos e fonte para o desenvolvimento de novos agentes antibacterianos sintéticos. A técnica limita o aparecimento de resistência bacteriana e aumentam a absorção do antibiótico pela célula (BRAUN et al., 2009; WENCEWICZ et al., 2009, 2013).

2.7 Biossurfactantes

Surfactante é a denominação atribuída aos compostos comumente encontrados em detergentes e sabões. Os organismos vivos podem produzir diversos compostos com propriedades tensoativas, como plantas que produzem as saponinas, microrganismos que produzem glicolipídios e também animais incluindo humanos, com a produção dos sais biliares (GAUTAM; TYAGI, 2006).

Os biossurfactantes foram identificados como compostos do metabolismo celular microbiano com finalidade de locomoção, defesa bacteriana e solubilização de substratos insolúveis em água, que pela diminuição da tensão superficial entre fases tornam o substrato mais disponível para utilização. Os biossurfactantes são encontrados em abundância em bactérias e o principal papel fisiológico dos biossurfactantes é permitir que os microrganismos cresçam em substratos que são insolúveis em água através de uma redução da tensão superficial entre as fases, tornando o substrato mais disponível para absorção e metabolismo de nutrientes, atuando como moléculas de comunicação em biofilmes, promovendo a absorção de

substratos pouco solúveis, fatores de virulência e compostos antimicrobianos (BANAT et al., 2010; RUFINO; SARRUBBO, 2014).

Os biossurfactantes são geralmente de origem microbiana, estes diminuem a tensão superficial e possuem alta capacidade emulsificante, e são provenientes de subprodutos de metabólitos de bactérias, fungos e leveduras.

No geral, os biossurfactantes possuem uma característica anfifílica que as permitem atuar entre duas interfaces de fluídos de diferentes polaridades tais como água/óleo e água/ar diminuir a tensão superficial e interfacial (GAUTAM; TYAGI, 2006; BANAT et al., 2010). No domínio hidrofóbico (apolar) se encontra um hidrocarboneto composto de um ou mais ácidos graxos que podem ser saturados, insaturados ou ramificados. Na porção hidrofílica (polar) existem três possibilidades de ligantes: não iônica, iônica (catiônica ou aniônica) ou anfotérica, ou seja, dependendo das condições de pH da solução, pode exibir característica aniônica ou catiônica. Na porção hidrofílica podem-se encontrar ácidos carboxílicos, carboidratos, aminoácidos ou peptídeos, fosfatos e álcool (RUFINO; SARRUBBO, 2014). A maior parte dos biossurfactantes são neutros, ou aniônicos variando de pequenos ácidos graxos a grandes polímeros (GUDIÑA et al., 2013).

Os líquidos assumem a melhor forma que diminua sua área de superfície como tentativa de manter moléculas com o maior número de vizinhos idênticos ou similares, isso faz com que as gotas de líquidos adotem a forma esférica, pois esta possui a menor razão superfície volume (HEWITT, 2002). As moléculas no interior de um líquido compartilham as forças coesivas entre elas, no entanto, as moléculas presentes na superfície de um líquido não possuem átomos semelhantes acima delas, por este motivo ocorre uma força atrativa mais forte sobre as vizinhas moléculas mais próximas na superfície. Este aumento das forças atrativas intermoleculares na superfície é chamado tensão superficial (HEWITT, 2002). A tensão superficial de um líquido pode aumentar ou diminuir com a adição de um soluto. Caso o soluto se concentre na interface, então a tensão superficial ou interfacial entre as fases diminui (FERREIRA, 2005).

Assim como surfactantes sintéticos, os biossurfactantes produzidos por microrganismos são compostos anfifílicos, tão efetivos quanto os surfactantes químicos. Os biossurfactantes possuem baixa toxicidade e capacidade de produção a partir de substratos ecológicos e possuem maior estabilidade em condições extremas, ao contrário disso, muitos surfactantes sintéticos apresentam baixa

biodegradabilidade, o que limita seu uso em diversas aplicações industriais e ambientais. Apesar dos benefícios dos biossurfactantes, eles não competem economicamente com surfactantes sintéticos. Vários surfactantes são produzidos quimicamente a partir do petróleo, o que leva a um processo de fabricação ambientalmente prejudicial (GAUTAM; TYAGI, 2006; SACHDEV; CAMEOTRA, 2013). A crescente preocupação com o meio ambiente entre os consumidores somada às legislações ambientais tem levado à busca por biossurfactantes como forma alternativa aos produtos sintéticos existentes.

O maior comércio para os biossurfactantes está na indústria petrolífera, por serem empregados na produção de petróleo ou aliados em formulações de óleos lubrificantes, bem como, na utilização na dispersão de surfactantes no derramamento de óleos, remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem, e a recuperação melhorada de petróleo. A redução da tensão interfacial torna estes compostos adequados para várias aplicações envolvendo: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade, espumante, molhabilidade, solubilização e dispersão de fases. São utilizados em aplicações ambientais como agentes na biorremediação (SHAH et al., 2016), no tratamento de resíduos e dispersão de derramamentos de óleo, onde os biossurfactantes são empregados na emulsificação direta aumentando a solubilidade de contaminantes hidrofóbicos no solo. Na agricultura são utilizados em formulações de herbicidas e pesticidas, pois os compostos ativos destas formulações na maioria das vezes são hidrofóbicos, sendo necessários emulsificantes para dispersá-los em soluções aquosas. Entre outras aplicações estão a utilização de biossurfactantes na mineração, recuperação melhorada do petróleo, em produtos de higiene e cosméticos, indústria de alimentos, indústria de tintas, indústria de papel, têxtil e cerâmica (BANAT, 2000).

Alguns biossurfactantes apresentam também importância na medicina como agente terapêutico com atividade antimicrobiana, antiviral, antitumoral, antiaderentes e adjuvantes em imunologia (CAMEOTRA et al., 2004). Um dos mais conhecidos biossurfactantes da área terapêutica é a surfactina, conhecida pela sua potência de inibição da formação de coágulos, formação de canais iônicos em membranas, atividade antibacteriana e antifúngica; atividade antiviral e antitumoral (CAI et al., 2015).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHTMAN, M.; WAGNER, M. Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. **Nature Reviews** , v. 6, n. June, 2008.
- AHMED, E.; HOLMSTROM, S. J. M. The effect of soil horizon and mineral type on the distribution of siderophores in soil. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 131, p. 184–195, 2014.
- AHMED, E.; HOLMSTROM, S. J. M. Siderophore production by microorganisms isolated from a podzol soil profile. **Geomicrobiology Journal**, October, 2014.
- AKTHAR, M. S.; DEGAGA, B.; AZAM, T. Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms : A review. **Biological Sciences and Pharmaceutical Research**, v. 2, n. 1, p. 1–7, 2014.
- ALI, S. S.; VIDHALE, N. N. Review Article Bacterial Siderophore and their Application : A review. **International journal of current microbiology and applied sciences**, v. 2, n. 12, p. 303–312, 2013.
- ALY, A. H.; DEBBAB, A.; KJER, J.; PROKSCH, P. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. **Fungal Diversity**, v. v. 41, , 2010.
- ANDREWS, J. H.; HARRIS, R. F. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces, **Annu. Rev. Phytopathol.** 2000. v-38, n. 145, 2000.
- BAIS, H. P.; WEIR, T. L.; PERRY, L. G.; GILROY, S.; VIVANCO, J. M. the Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions With Plants and Other Organisms. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, n. 1, p. 233–266, 2006.
- BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; VIDEIRA, S. S.; BODDEY, L. H.; BALDANI, V. L. D. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. **Plant and Soil**, v. 384, n. 1–2, p. 413–431, 2014.
- BANAT, I. M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 427–444, 2010.
- BANAT, M. I. M. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Appl Microbiol Biotechnol.** p. 495–508, 2000.
- BARROSO, G. M.; BUENO, O. L.; REIS, A.; IZA, O. B. Compostas: Subtribo: baccharidinae. **Herbário“ Barbosa Rodrigues,”** 2002.
- BASAVRAJ, N.; DEEPAK, V. Medical applications of siderophores. **European Journal of General Medicine**, v. 8, n. 3, p. 229–235, 2011.
- BERENDSEN, R. L. The rhizosphere microbiome and plant health. **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 8, 2012.
- BERG, G.; KRECHEL, A.; DITZ, M.; SIKORA, R. A.; et al. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 51, n. 2, p. 215–229, 2005.
- BHATTACHARJEE, R. B.; SINGH, A. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser

for non-legumes : prospects and challenges. **Appl Microbiol Biotechnol**, p. 199–209, 2008.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World J Microbiol Biotechnol**, p. 1327–1350, 2012.

BONA, C. M. DE; BIASI, L. A.; NAKASHIMA, T. Estaquia de três espécies de Baccharis Propagation of three species of Baccharis by cuttings. **Ciência Rural**, p. 223–226, 2005.

BORELLA, J. C.; FONTOURA, A. Avaliação do perfil cromatográfico e do teor de flavonóides em amostras de Baccharis trimera (Less.) DC. Asteraceae (carqueja) comercializadas em Ribeirão Preto, SP, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 2, p. 63–67, 2002.

BOSCO, A.; GOLSTEYN, R. Emerging Anti-Mitotic Activities and Other Bioactivities of Sesquiterpene Compounds upon Human Cells. **Molecules**, v. 22, n. 3, p. 459, 2017.

BRANDA, L. M.; TORRES, Ä.; THEREZA, M.; et al. Diterpene from Baccharis trimera with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle. **Phytochemistry**, v. 55, p. 617–619, 2000.

BRAUN, V.; PRAMANIK, A.; GWINNER, T.; BOHN, Æ. E. Sideromycins : tools and antibiotics. **Biometals**, p. 3–13, 2009.

BUDEL, J. M.; DUARTE, M. R.; SANTOS, C. A. M.; CUNHA, L. M. Macro and microscopical identification of four species of Baccharis from trimera group. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 2, p. 42–43, 2003.

BUDEL, J. M.; DUARTE, M. R.; SANTOS, C. A. M.; FARAGO, P. V.; MATZENBACHER, N. I. Divulgação O progresso da pesquisa sobre o gênero Baccharis , Asteraceae : I - Estudos botânicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 268–271, 2005.

BULGARELLI, D.; ROTT, M.; SCHLAEPPI, K.; et al. Revealing structure and assembly cues for Arabidopsis root-inhabiting bacterial microbiota. **Nature**, v. 488, n. 7409, p. 91–95, 2012. Nature Publishing Group.

BULGARELLI, D.; SCHLAEPPI, K.; SPAEPEN, S.; LOREN VAN THEMAAT, E. VER; SCHULZE-LEFERT, P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annual review of plant biology**, v. 64, p. 807–38, 2013.

CAI, Q.; ZHANG, B.; CHEN, B.; SONG, X. Screening of biosurfactant-producing bacteria from offshore oil and gas platforms in North Atlantic Canada. , 2015.

CAI, Y.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Sciences**, v. 74, n. 17, p. 2157–2184, 2004.

CAIEIRO, D. M.; MARCUCCI, M. C. Composição química e atividade antioxidante de formulações comerciais contendo Ginkgo biloba L. **Revista Fitos**, 2010. Brasil.

CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Curr Opin Microbiol**, p. 262–266, 2004.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 314–319, 2008.

- CASE, R. J.; BOUCHER, Y.; DAHLLO, I.; et al. Use of 16S rRNA and rpoB Genes as Molecular Markers for Microbial Ecology Studies. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, n. 1, p. 278–288, 2007.
- CASTILLO, U. F.; STROBEL, G. A.; FORD, E. J.; et al. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigricans*. **Microbiology**, v. 148, n. 9, p. 2675–2685, 2002.
- CASTILLO, U.; HARPER, J. K.; STROBEL, G. A.; et al. Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 224, p. 183–190, 2003.
- CHANDRA, S. Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules. **Appl Microbiol Biotechnol**, p. 47–59, 2012.
- COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 669–678, 2010.
- COMPANT, S.; REITER, B.; NOWAK, J.; et al. Endophytic Colonization of *Vitis vinifera* L. by Plant Growth-Promoting Bacterium *Burkholderia* sp. Strain PsJN. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 4, p. 1685–1693, 2005.
- DANHORN, T.; FUQUA, C. Biofilm Formation by Plant-Associated Bacteria. **Annu. Rev. Microbiol**, 2007.
- DENG, H. A review of diversity-stability relationship of soil microbial community: What do we not know, **Journal of Environmental Sciences**, v. 24, n. 6, p. 1027–1035, 2012. The Research Centre for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences.
- DING, T.; JIANG, T.; ZHOU, J.; XU, L.; GAO, Z. Evaluation of antimicrobial activity of endophytic fungi from *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae). **Genetics and Molecular Research**, v. 9, p.21, 2010.
- DRAKE, H. L.; KUSEL, K.; MATTHIES, C. **The prokaryotes**. 2013.
- ESMAEEL, Q.; CHEVALIER, M.; CHATAIGN, G.; et al. Nonribosomal peptide synthetase with a unique iterative-alternative-optional mechanism catalyzes amonabactin synthesis in *Aeromonas*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 1–11, 2016. Applied Microbiology and Biotechnology.
- EZRA, D.; CASTILLO, U.F.; STROBEL, G. A.; HESS, W. M.; PORTER, H.; JENSEN, J.B.; CONDRON, M.A.M.; TELOW, D.B.; SEARS, J.; MARANTA, M.; HUNTER, M.; WEBER, B.; YAVER, D. Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp. endophytic on *Monstera* sp. **Microbiology**, v. 150, , 2004.
- FERRACINI, V.; PARAIBA, L.; LEITÃO FILHO, H.; et al. Essential Oil of Seven Brazilian *Baccharis* Species. **J. Essent. Oil Res.** 7: 355-367, 1995.
- FERREIRA, J. P. M. **Tensão superficial - sua natureza e efeitos**. 2005.
- FIEDLER, M. G. H. A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. **Antonie van Leeuwenhoek**, p. 119–142, 2010.
- GAUTAM, K. K.; TYAGI, V. K. Microbial Surfactants: A Review. **Journal of Oleo Science**, v. 55, n. 4, p. 155–166, 2006.

- GLICK, B. R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Can. J. Microbiol.**, v. 117, p. 109–117, 1995.
- GONZÁLEZ, T. M. ; NAVARRETE, A.; REYES, B.; HONG, E. Some pharmacological effects of the ethanol extract of leaves of *Annona diversifolia* on the central nervous system in mice. **Phytother.Res.**, v. 12, n. May 2016, p. 600–602, 1998.
- GOSWAMI, D.; THAKKER, J. N.; DHANDHUKIA, P. C.; TEJADA MORAL, M. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. **Cogent Food & Agriculture**, v. 2, n. 1, p. 1127500, 2016.
- GRIFFITHS, B. S.; PHILIPPOT, L. Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community. **FEMS Microbiol Reviews**, v. 37, p. 112–129, 2013.
- GUDIÑA, E. J.; RANGARAJAN, V.; SEN, R.; RODRIGUES, L. R. Potential therapeutic applications of biosurfactants. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 34, n. 12, p. 667–675, 2013.
- GUNATILAKA, A. A. L. Natural Products from Plant-Associated Microorganisms : Distribution , Structural Diversity , Bioactivity , and Implications of Their Occurrence. **Journal of Natural Products**, p. 509–526, 2006.
- HALLMANN, J.; BERG, G. Spectrum and Population Dynamics of Bacterial Root Endophytes. **Soil Biology**, v. 9, 2006.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 10, p. 895–914, 1997.
- HARDOIM, P. R.; OVERBEEK, L. S. VAN; BERG, G.; et al. The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, n. 3, 2015.
- HARDOIM, P. R.; OVERBEEK, L. S. VAN; ELSAS, J. D. VAN. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 10, p. 463–471, 2008.
- HERBARIUM. Sene herbarium ®, 1998. Brasil.
- HERBARIUM. *CLEFEMIN Actaea racemosa.* , 2016. Brasil. HEWITT, P. G. **Física Conceitual.** 9ª ed. 2002.
- HIBBING, M. E.; FUQUA, C.; PARSEK, M. R.; PETERSON, S. B. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. **Nature reviews. Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 15–25, 2010.
- HUANG, Y.; WANG, J.; LI, G.; ZHENG, Z.; SU, W. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei* , *Cephalotaxus fortunei* and *Torreya grandis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 31, p. 5–9, 2001.
- JANUÁRIO, A. H.; SANTOS, S. L.; MARCUSSI, S.; et al. Neo-clerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteraceae): Anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties. **Chemico-Biological Interactions**, v. 150, n. 3, p. 243–251, 2004.
- JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. *Baccharis* in Flora do Brasil 2020 em

construção.

JOHNSEN, K.; JACOBSEN, C. S.; TORSVIK, V. Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils – a review. **Biol Fertil Soils**, p. 443–453, 2001.

KARAM, T. K.; DALPOSSO, L. M.; CASA, D. M.; FREITAS, G. B. L. DE. Carqueja (*Baccharis trimera*): Utilização terapêutica e biossíntese. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 2, p. 280–286, 2013.

KLEINKAUF, H.; DÖHREN, H. VON. A nonribosomal system of peptide biosynthesis. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 236, n. 2, p. 335–351, 1996.

KOMAKI, H.; ICHIKAWA, N.; HOSOYAMA, A.; et al. Genome based analysis of type-I polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase gene clusters in seven strains of five representative *Nocardia* species. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 323, 2014.

KULKARNI, A.; ZENG, Y.; ZHOU, W.; LANEN, S. VAN; ZHANG, W. A Branch Point of *Streptomyces Sulfur* Amino Acid Metabolism Controls the Production of Albomycin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 2, p. 467–477, 2016.

KUMAR, P.; KHARE, S.; DUBEY, R. C. Diversity of Bacilli from Disease Suppressive Soil and their Role in Plant Growth Promotion and Yield Enhancement. **New York Science Journal**, v. 5, n. 1, p. 90–111, 2012.

KUSARI, S., LAMSHÖFT, M., ZÜHLKE, S., & SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin. **Journal of Natural Products**, p. 71(2), 159-162., 2008.

LABORATÓRIO CATARINENSE. Catuama. , 2005. Brasil.

LABORATÓRIO CATARINENSE. Água Inglesa. , 2016. Brasil.

LEGRAND. *Panax ginseng*. **American Family Physician**, 2003. Brasil.

LEWINSOHN, T. Avaliação do estado do conhecimento da biodiversidade brasileira. **v. II. Vol. 15. Ministério do Meio Ambiente**, 2006.

LIGON, J. M.; HILL, D. S.; HAMMER, P. E.; et al. Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. **Pest Management Science**, v. 56, n. March, p. 688–695, 2000.

LOON, L. C. VAN; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic Resistance Induced. **Annu. Rev. Phytopathol**, 1998.

LUGTENBERG. **Principles of Plant-Microbe Interactions**. 2014.

LUGTENBERG, B. J. J.; CHIN-A-WOENG, T. F. C.; BLOEMBERG, G. V. Microbe – plant interactions : principles and mechanisms. **Antonie van Leeuwenhoek**, p. 373–383, 2002.

LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 541–556, 2009.

MATTICK, J. S. Type IV pili and twitching motility. **Annual review of microbiology**, v. 56, p. 289–314, 2002.

MEENA, M. L. D. V. D. Rhizosphere Effect on Nutrient Availability in Soil and Its Uptake by Plants : A Review. **Proceedings of the National Academy of Sciences**,

India Section B: Biological Sciences, v. 85, n. 1, p. 1–12, 2015.

MELOROSE, J.; PERROY, R.; CAREAS, S. **Bacteria in agrobiology**. 2015.

MIETHKE, M.; MARAHIEL, M. A. Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, n. 3, p. 413–451, 2007.

MILLER, M. J.; ZHU, H.; XU, Y.; et al. Utilization of microbial iron assimilation processes for the development of new antibiotics and inspiration for the design of new anticancer agents. **BioMetals**, v. 22, n. 1, p. 61–75, 2009.

MISHRA, J.; TEWARI, S.; SINGH, S. **Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets**. 2015.

MONTELLI, J.; BACCEGA, B.; MATA-SANTOS, T.; COSTA, P. Diversidade das plantas brasileiras com potencial anti-helmíntico. **Vitalle – Revista de Ciências da Saúde**, v. 28, p. 39–48, 2016.

MOUSA, W. K.; RAIZADA, M. N. The diversity of anti-microbial secondary metabolites produced by fungal endophytes : an interdisciplinary perspective. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. March, p. 1–18, 2013.

MUHIT, M. A.; IZUMIKAWA, M.; UMEHARA, K.; NOGUCHI, H. Phenolic constituents of the Bangladeshi medicinal plant *Pothos scandens* and their anti-estrogenic, hyaluronidase inhibition, and histamine release inhibitory activities. **Phytochemistry**, v. 121, p. 30–37, 2016. Elsevier Ltd.

NEILANDS, J. B. Siderophores : Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 45, p. 26723–26726, 1995.

NIE, Y.; DONG, X.; HE, Y.; et al. Medicinal plants of genus *Curculigo* : Traditional uses and a phytochemical and ethnopharmacological review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, n. 3, p. 547–563, 2013. Elsevier.

NYAMUKURU, A.; TABUTI, J. R. S.; LAMORDE, M.; et al. Medicinal plants and traditional treatment practices used in the management of HIV/AIDS clients in Mpigi District, Uganda. **Journal of Herbal Medicine**, v. 7, p. 51–58, 2017. Elsevier GmbH.

OLIVEIRA, R. N. DE; REHDER, V. L. G.; SANTOS OLIVEIRA, A. S.; et al. *Schistosoma mansoni*: In vitro schistosomicidal activity of essential oil of *Baccharis trimera* (less) DC. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 2, p. 135–143, 2012. Elsevier Inc.

PASTRE, R.; MARINHO, A. M. R.; RODRIGUES-FILHO, E.; SOUZA, A. Q. L.; PEREIRA, J. O. Diversidade de policetídeos produzidos por espécies de *Penicillium* isoladas de *Melia azedarach* e *Murraya paniculata*. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1867–1871, 2007.

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

PISARSKA, K. .; PIETR, S. J. Isolation and partial characterization of culturable endophytic *Arthrobacter* spp. from leaves of maize (*Zea mays* L.). **Communications in agricultural and applied biological sciences**, v. v. 77, , 2011.

- PROBER, S. M.; LEFF, J. W.; BATES, S. T.; et al. Plant diversity predicts beta but not alpha diversity of soil microbes across grasslands worldwide. **Ecology Letters**, v. 18, n. 1, p. 85–95, 2015.
- PURI, S. C.; NAZIR, A.; CHAWLA, R.; et al. The endophytic fungus *Trametes hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans. **Journal of Biotechnology**, v. 122, n. 4, p. 494–510, 2006.
- QI, X.; WANG, E.; XING, M.; ZHAO, W.; CHEN, X. Rhizosphere and non-rhizosphere bacterial community composition of the wild medicinal plant *Rumex patientia*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 2257–2265, 2012.
- QIN, S.; XING, K.; JIANG, J. H.; XU, L. H.; LI, W. J. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 3, p. 457–473, 2011.
- RABIEI, Z. Anticonvulsant effects of medicinal plants with emphasis on mechanisms of action. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 2, p. 166–172, 2017. Elsevier B.V.
- RAMAMOORTHY, V.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRAKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, v. 20, n. 1, p. 1–11, 2001.
- RAMOS, H.P.; BRAUN, G.H.; PUPO, M.T.; SAID, S. Antimicrobial Activity from Endophytic Fungi *Arthrinium* state of *Apiospora montagnei* Sacc. and *Papulaspora immerse*. **Brazilian archives of Biology and Technology**, v. v. 53, p.6, 2010.
- RASCHE, F.; VELVIS, H.; ZACHOW, C.; et al. Impact of transgenic potatoes expressing anti-bacterial agents on bacterial endophytes is comparable with the effects of plant genotype, soil type and pathogen infection. **Journal of Applied Ecology**, v. 43, n. 3, p. 555–566, 2006.
- REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Living inside plants: Bacterial endophytes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 14, n. 4, p. 435–443, 2011. Elsevier Ltd.
- REIS LÍVERO, F. A. DOS; SILVA, L. M. DA; FERREIRA, D. M.; et al. Hydroethanolic extract of *Baccharis trimera* promotes gastroprotection and healing of acute and chronic gastric ulcers induced by ethanol and acetic acid. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 389, n. 9, p. 985–998, 2016.
- RENVOISÉ, A.; BROSSIER, F.; SOUGAKOFF, W.; JARLIER, V.; AUBRY, A. Broad-range PCR : Past , present , or future of bacteriology. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 43, n. 8, p. 322–330, 2013. Elsevier Masson SAS.
- ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, v. 19, n. 8, p. 827–837, 2006.
- RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. Biosurfactants : Classification , Properties and Environmental Applications. **Biotechnology Vol. 11: Bioremediation**. January, 2014.
- SAAD, B.; ZAID, H.; SHANAK, S.; KADAN, S. **Anti-diabetes and Anti-obesity Medicinal Plants and Phytochemicals**. 2017.

- SACHDEV, D. P.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactants in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 3, p. 1005–1016, 2013.
- SACHDEVA, S. Rhizosphere : its structure , bacterial diversity and significance. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, p. 63–77, 2014.
- SAH, S.; SINGH, R. Siderophore: Structural And Functional Characterisation – A Comprehensive Review. **Agriculture (Polnohospodárstvo)**, v. 61, n. 3, p. 97–114, 2015.
- SAHA, M.; SARKAR, S.; SARKAR, B.; et al. Microbial siderophores and their potential applications: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 5, p. 3984–3999, 2016.
- SANTOYO, G.; MORENO-HAGELSIEB, G.; CARMEN OROZCO-MOSQUEDA, M. DEL; GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological Research**, v. 183, p. 92–99, 2016. Elsevier GmbH.
- SCHNEIDER, T.; KEIBLINGER, K. M.; SCHMID, E.; et al. Who is who in litter decomposition. Metaproteomics reveals major microbial players and their biogeochemical functions. **The ISME Journal**, v. 6, n. 9, p. 1749–1762, 2012.
- SESSITSCH, A.; HARDOIM, P.; DÖRING, J.; et al. Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, v. 25, n. 1, p. 28–36, 2012.
- SHAH, N.; NIKAM, R.; GAIKWAD, S.; SAPRE, V.; KAUR, J. Biosurfactant: Types, Detection Methods, Importance and Applications. **Indian Journal of Microbiology Research**, v. 3, n. 1, p. 5, 2016.
- SIMÕES-PIRES, C. A.; DEBENEDETTI, S.; SPEGAZZINI, E.; et al. Investigation of the essential oil from eight species of Baccharis belonging to sect. Caulopterae (Asteraceae, Astereae): A taxonomic approach. **Plant Systematics and Evolution**, v. 253, n. 1–4, p. 23–32, 2005.
- SINGH, B. K.; MUNRO, S.; POTTS, J. M.; MILLARD, P. Influence of grass species and soil type on rhizosphere microbial community structure in grassland soils. **Applied Soil Ecology**, v. 36, n. 2–3, p. 147–155, 2007.
- SINGH, J. S.; PANDEY, V. C.; SINGH, D. P. Agriculture , Ecosystems and Environment Efficient soil microorganisms : A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. **“Agriculture, Ecosystems and Environment,”** v. 140, n. 3–4, p. 339–353, 2011. Elsevier.
- SOLANKI, M. K.; SINGH, R. K.; SRIVASTAVA, S.; et al. Isolation and characterization of siderophore producing antagonistic rhizobacteria against *Rhizoctonia solani*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 585–596, 2014.
- SREEVIDYA, M.; GOPALAKRISHNAN, S.; KUDAPA, H.; VARSHNEY, R. K. Exploring plant growth-promotion actinomycetes from vermicompost and rhizosphere soil for yield enhancement in chickpea. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 390–392, 2016. Sociedade Brasileira de Microbiologia.
- STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**, v. v. 67, 1993.
- STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural Products from

Endophytic Microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 2, p. 257–268, 2004.

STROBEL, G.; DAISY, B.; STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 491–502, 2003.

SULLIVAN, T. S.; RAMKISSOON, S.; GARRISON, V. H.; RAMSUBHAG, A.; THIES, J. E. Siderophore production of African dust microorganisms over Trinidad and Tobago. **Aerobiologia**, v. 28, n. 3, p. 391–401, 2012.

SUN, L.; LU, Z.; BIE, X.; LU, F.; YANG, S. Isolation and characterization of a co-producer of fengycins and surfactins, endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2, from *Scutellaria baicalensis* Georgi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 12, p. 1259–1266, 2006.

SUZUKI, É. Y.; CANESCHI, C. A.; FOCHAT, R. C.; et al. Antimicrobial activity of essential oil from *Baccharis trimera* (Less.) DC. (carqueja-amarga). **Revista Cubana de Plantas Medicinales** 2016;21(3), 2016.

TAHIR, A. EL; EL-TAHIR, A.; SATTI, G. M. H.; KHALID, S. A. Antiplasmodial Activity of Selected Sudanese Medicinal Plants with Emphasis on *Acacia nilotica*. **Phytotherapy Research**. 1999.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural product reports**, v. 18, n. 1993, p. 448–459, 2001.

TONG, W. Y.; DARAH, I.; LATIFFAH, Z. Antimicrobial activities of endophytic fungal isolates from medicinal herb *Orthosiphon stamineus* Benth. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. v. 5, p. 8, 2011.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil : from genes to ecosystems. **Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems**, p. 240–245, 2002.

VELÁZQUEZ, E.; ROJAS, M.; LORITE, M. J.; et al. Genetic diversity of endophytic bacteria which could be find in the apoplastic sap of the medullary parenchym of the stem of healthy sugarcane plants. **Journal of Basic Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 118–124, 2008.

VIEIRA, M. L. A.; JOHANN, S.; HUGHES, F. M.; ROSA, C. A. R. L. H. The diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi associated with medicinal plant *Baccharis trimera* (Asteraceae) from the Brazilian savannah. **Can. J. Microbiol.**, p. 33, 2014.

WEIL, A. P. **Bioquímica Ilustrada de Harper. Síntese, processamento e modificação do RNA**. 2016.

WENCEWICZ, T. A.; LONG, T. E.; MÖLLMANN, U.; MILLER, M. J. Trihydroxamate siderophore-fluoroquinolone conjugates are selective sideromycin antibiotics that target *Staphylococcus aureus*. **Bioconjugate Chemistry**, v. 24, n. 3, p. 473–486, 2013.

WENCEWICZ, T. A.; MÖLLMANN, U.; LONG, T. E.; MILLER, M. J. Is drug release necessary for antimicrobial activity of siderophore-drug conjugates? Syntheses and biological studies of the naturally occurring salmycin “trojan Horse” antibiotics and

synthetic desferridanoxamine- antibiotic conjugates. **BioMetals**, v. 22, n. 4, p. 633–648, 2009.

WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. suppl 1, p. 487–511, 2001. WICKLOW, D. .; POLING, S. . Antimicrobial Activity of Pyrrocidines from *Acremonium zeae* Against Endophytes and Pathogens of Maize. **Biological Control**, v. v. 109, , 2009.

WICKLOW, D. T.; ROTH, S.; DEYRUP, S. T.; GLOER, J. B. A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. **Mycol. Res**, v. v. 109, , 2005.

WITZELL, J.; MARTÍN, J. A. **Advances in Endophytic Research**. 2014.

WÖLFLE, U.; HOFFMANN, J.; HAARHAUS, B.; RAO MITTAPALLI, V.; SCHEMPP, C. M. Anti-inflammatory and vasoconstrictive properties of *Potentilla erecta* – A traditional medicinal plant from the northern hemisphere. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 204, p. 86–94, 2017. Elsevier Ireland Ltd.

ZILLI, J. É.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; CRISTINA, M.; NEVES, P. Diversidade Microbiana com indicador de Qualidade do Solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**. , p. 391–411, 2003.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Este estudo teve como objetivo analisar a diversidade de bactérias cultiváveis associadas à planta medicinal *Baccharis trimera* e avaliar o potencial biotecnológico e antimicrobiano dos isolados pela análise da produção de sideróforo, surfactantes e da atividade antagônica.

3.2 Objetivos Específicos

- Isolar e preservar bactérias associadas à rizosfera e endorrizosfera de *B. trimera* e construção de uma coleção com elevada diversidade;
- Avaliar as características morfológicas das colônias;
- Posicionar taxonomicamente os isolados por meio da amplificação, sequenciamento e análise do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA;
- Caracterizar a morfologia dos isolados e seu potencial biotecnológico, quanto à produção de sideróforos, surfactantes e atividade antagonista dos isolados.

4. CAPÍTULO I

Artigo a ser submetido a revista *Research in Microbiology*

A planta medicinal *Baccharis trimera* apresenta alta diversidade de microrganismos associativos com elevado potencial biotecnológico

Ana Camila Munis Jardim^a; Jéssica Ellen de Oliveira^a; Giovana Oliveira Gutuzzo^a; Dorival Bião de Mello^a; Elisete Pains Rodrigues^{a*}.

^aLaboratório de Genética de Microrganismos, Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, PR-445, Km 380, Campus Universitário, PO Box 6001, CEP 86.051-970, Londrina, PR, Brazil.

*Correspondence and reprints

Email addresses:

Ana Camila Munis Jardim: acmjbiomed@gmail.com

Jéssica Ellen de Oliveira: jeh.ellen@hotmail.com

Giovana Oliveira Gutuzzo: gi.gutuzzo@gmail.com

Dorival Bião de Mello: dorivalbiao@uol.com.br

Elisete Pains Rodrigues: elisete@uel.br*

RESUMO

O uso de técnicas moleculares tem permitido a descoberta de uma ampla diversidade de microrganismos com potencial biotecnológico. As plantas medicinais podem abrigar uma grande diversidade de microrganismos desconhecidos e que apresentam potencial para produção de compostos bioativos, principalmente com atividades antimicrobianas. Neste sentido, a planta medicinal *Baccharis trimera* (Less DC Ateraceae) foi escolhida para investigar a composição de sua comunidade microbiana e caracterizar o potencial biotecnológico dos isolados. Para isto, foram coletadas amostras de *B. trimera* crescidas espontaneamente nas cidades de Ponta Grossa-PR e Ortigueira-PR. Inicialmente, foi realizada a contagem populacional da rizosfera e endorrizosfera nos meios de cultivo R2A e Ágar Batata. O posicionamento filogenético dos isolados foi realizado pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Posteriormente os isolados foram avaliados quanto a produção de compostos antimicrobianos por testes de antagonismo, produção de sideróforos e biossurfactantes. A população bacteriana variou de $1,25 \times 10^{10}$ a $1,03 \times 10^7$ no meio ágar batata e $6,25 \times 10^9$ a $8,08 \times 10^6$ em meio R₂A. A contagem populacional da rizosfera foi maior que a população bacteriana da endosfera independentemente da localidade de coleta ou do meio de cultivo analisado. Após a contagem, 182 isolados foram selecionados e criopreservados para compor uma coleção de bactérias. Foi realizado um agrupamento dos isolados através da técnica de ARDRA e a partir deste foram selecionados 129 isolados para sequenciamento. Foram identificados 38 gêneros bacterianos alocados nas seguintes classes bacterianas: Bacilli (30%), Actinobacteria (24%), α -Proteobacteria (22%), β -Proteobacteria (12%) e γ -Proteobacteria (12%). Os principais gêneros encontrados nas duas localidades foram *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Methylobacterium*, *Staphylococcus*, *Paenibacillus*, *Variovax*, *Burkholderia*, *Luteibacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus* e *Bradyrhizobium*. Dos 182 isolados, 112 apresentaram produções em diferentes níveis de antimicrobianos, sideróforos e biossurfactantes. Os resultados deste trabalho demonstram que a comunidade bacteriana da rizosfera e endorrizosfera associada à planta medicinal *B. trimera* é diversa e com alto potencial antimicrobiano.

Palavras-chave: Microrganismos associativos, planta medicinal, antagonismo, sideróforos, biossurfactantes, bioprospecção.

INTRODUÇÃO

O Brasil é um país privilegiado pela sua megabiodiversidade. Sua flora é a mais diversa do mundo, pois é composta por mais de 55 mil espécies de plantas superiores (LEWINSOHN, 2006). Nesta diversidade, encontram-se algumas plantas medicinais. Os estudos das comunidades microbianas associativas destas plantas ainda são incipientes. As plantas medicinais possuem uma comunidade microbiana distinta devido aos seus metabólitos secundários únicos e divergentes, e que podem estar relacionados com a especificidade da microbiota associada. Neste sentido, as plantas medicinais representam uma fonte muito rica em microrganismos com alto potencial biotecnológico, muitos dos quais são utilizados para aplicação em áreas como medicina moderna e agricultura (QI et al., 2012).

Segundo STROBEL (2003), o estudo da microbiota de plantas visando a obtenção de microrganismos com potencial bioativo é levado em consideração as propriedades farmacológicas e o uso popular destas plantas. As plantas medicinais foram reconhecidas como reservatórios de endófitos com grande potencial de produção de novos metabólitos de importância farmacêutica (CARVALHO et al., 2012).

Apesar do aumento dos estudos sobre comunidades microbianas associadas a plantas medicinais, muitos pontos ainda são pouco conhecidos tais como o conhecimento sobre a diversidade, a taxonomia microbiana, a composição da microbiota e potencial biotecnológico dos microrganismos associados a plantas medicinais. A planta medicinal *Baccharis trimera* é uma planta medicinal nativa do Brasil encontrada nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. É muito conhecida popularmente por seu sabor amargo e utilizada contra distúrbios hepáticos e digestivos.

A microbiota das plantas pode estar associada à praticamente todas as partes das plantas, como na rizosfera, filosfera e endosfera (BULGARELLI et al., 2013). Em todos estes locais os microrganismos mantêm diversas interações sejam elas benéficas, neutras ou deletérias (HARDOIM et al., 2008). Em ambientes competitivos como, por exemplo, a rizosfera, é comum encontrar microrganismos produzindo compostos antimicrobianos. Estes microrganismos antagonistas terão mais chances de se estabelecer e perpetuar no ambiente em detrimento de outros influenciando, portanto, a comunidade microbiana (SINGH et al., 2011). Os

microrganismos podem utilizar as diferentes estratégias para sua proteção e/ou do hospedeiro, pela produção de moléculas bioativas, as quais podem ser expressas conforme as condições do ambiente, como em situações de estresse biótico e abiótico. Para tanto os microrganismos podem produzir compostos para a aquisição de nutrientes tais como, os sideróforos e surfactantes.

A análise da diversidade microbiana é importante para compreender a função dos microrganismos nos seus habitats específicos, pois desta forma é possível o desenvolvimento de técnicas, processos e produtos ecologicamente corretos e substituir produtos poluentes que possuam melhor atividade biológica (GRIFFITHS; PHILIPPOT, 2013).

Portanto, os objetivos deste trabalho foram investigar a comunidade bacteriana cultivável da rizosfera e endorizosfera da planta medicinal *B. trimera*, bem como, investigar o potencial antagonista, produção de sideróforos e biosurfactantes dos isolados obtidos.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do Material Vegetal

As amostras de carqueja (*B. trimera* Less. DC) foram coletadas em dois locais de ocorrência natural da espécie no estado do Paraná, região sul do Brasil. A primeira coleta foi realizada em julho de 2015 nas proximidades da cidade de Ponta Grossa (25°05'42" S 50°09'43"W) e a segunda em setembro de 2015 na região de Ortigueira (24°12'30" S 50°56'58"W). Foram coletadas 12 plantas sem sintomas aparentes de dano ou doença. Posteriormente foram reunidas aleatoriamente para constituir três amostras compostas (A1, A2 e A3). As amostras foram armazenadas individualmente em sacos plásticos e transportadas sob refrigeração ao laboratório de Genética de Microrganismos (LAGEM). O processamento das amostras foi realizado no período de 24 h.

Foram coletadas 12 amostras do solo de cada localidade e foram analisadas conforme metodologia de SILVA (1999) para dosagem de carbono, pH do solo e acidez potencial, saturação de bases, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, alumínio e matéria orgânica.

Contagem e Isolamento de bactérias

Amostras de 2 gramas de raízes de cada amostra (A1, A2 e A3) foram transferidas para tubos falcon contendo 25mL de água peptonada tamponada (10 g/L de peptona, 5 g/L de NaCl, 3,5 g/L de Na₂HPO₄, 1,5 g/L de KH₂PO₄, pH 7,4) e, em seguida, homogeneizadas no vórtex por 30 seg e sonicadas por 30 seg no banho ultrassônico (Elma®) à frequência 80kHz e potência 50%, a 4 °C. Este procedimento foi repetido e as duas suspensões reunidas (50 mL), constituindo a suspensão da rizosfera-rizoplane de Ponta-Grossa (R-PG) e Ortigueira (R-OT). Após, as raízes foram tratadas com cloramina-T a 1% por 30 min e, em seguida, lavadas três vezes com água destilada estéril por 5 min cada lavagem. As raízes (2 g) foram maceradas com 50mL de água peptonada tamponada, constituindo a suspensão da endosfera (E-PG ou E-OT). A eficiência do tratamento com cloramina-T foi avaliada pelo plaqueamento em meio BDA (4 g/L de infusão de batata, 20 g/L de dextrose, 15 g/L de ágar) de 0,1mL da água da última lavagem das raízes, em triplicata (SCHULZ et al., 1993).

As suspensões obtidas foram diluídas em solução salina (1:9 mL v/v) até a diluição 10⁻⁷, para as suspensões da rizosfera-rizoplane, e até a diluição 10⁻⁵ para as suspensões da endosfera. Alíquotas de 100 µL das quatro últimas diluições das suspensões da rizosfera-rizoplane ou endosfera foram plaqueadas com alça de Drigalski em diferentes meios de cultivo sólido. Foram utilizados o meio caldo-ágar-batata (caldo de 200g de batata cozida, 15 gL⁻¹ de ágar, pH6,5) e o meio Reasoner's 2A (R2A) que continha (g/L) 0,5 de extrato de levedura, 0,5 de peptona, 0,5 de caseína ácida hidrolisada, 0,5 de glicose, 0,5 de amido solúvel, 0,3 de piruvato de sódio, 0,3 de K₂HPO₄, 0,05 de MgSO₄, 15 de ágar e pH 6,5 (REASONER, 1979). Os meios foram suplementados com 100 µg.mL⁻¹ do fungicida Benomyl.

As placas foram incubadas em BOD a 28°C e monitoradas semanalmente por até 30 dias. A contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) foram realizadas após 7, 15 e 30 dias de incubação. O número de colônias foi convertido em UFC.g⁻¹ de peso fresco e transformado em Log10 de UFC.g⁻¹. As colônias distintas morfológicamente que surgiram durante o período de incubação foram transferidas para o meio sólido R2A e repicadas até a obtenção de colônias puras dos isolados. Os isolados obtidos foram devidamente identificados e armazenados a -20°C em meio TSB com 50% de glicerol.

Amplificação do gene 16SrRNA

O DNA foi extraído por lise alcalina utilizando uma colônia fresca do isolado e 100 µL de NaOH (0,05M). Após incubação a 95 °C por 45 min, o lisado foi centrifugado por 5' a 12.000 rpm e o sobrenadante obtido foi utilizado nas reações de amplificação por PCR. A sequência inteira do gene 16S rRNA foi amplificada por PCR com os primers fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1 (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') resultando em uma sequência de ~1500 pb (WEISBURG et al., 1991). As reações de amplificação foram feitas em um volume de 25 µL contendo 12,5 µL de GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA), 1 µL do lisado celular e 10 pmol de cada primer fD1erD1. As amplificações foram feitas em um termociclador usando as condições de ciclagem de 2 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos de 45 s a 95 °C, 15 seg a 55 °C e 2 min a 72 °C, e uma etapa final de 10 min a 72 °C. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose (0,8%) com tampão TBE 0,5X a 4V/cm. O gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por 30 min, lavado com tampão TBE e, em seguida, fotografado sob luz ultravioleta usando o foto documentador L-Pix (Loccus Biotecnologia).

Análise de Restrição do DNA Ribossômico Amplificado (ARDRA)

Os amplicons do gene 16S rRNA foram digeridos separadamente com três enzimas de restrição de corte frequente, *HaeIII* (GG[^]CC), *MspI* (C[^]CGG) e *HindIII* (A[^]AGCTT). As restrições foram feitas em 10 µL de reação contendo 0,2U de enzima, 1 µL de tampão da enzima e 2 µL do produto de PCR. As reações foram incubadas por 3 horas à 37°C e, em seguida, os produtos da restrição foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TBE 0,5X a 4 V/cm. O gel foi corado e fotografado, como descrito acima. Foi utilizado o marcador molecular 1kb Plus Ladder (Invitrogen).

O padrão de bandas obtidos nos géis de restrição foram normalizados e analisados usando software BioNumerics (versão 6.6; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica), considerando na análise de agrupamento os fragmentos de restrição entre 100 e 1300 pb (pares de base). Um dendrograma combinado foi

construído com os dados das três enzimas utilizando o método de agrupamento UPGMA e o coeficiente de similaridade Dice, com tolerância e otimização de 2%.

Purificação e Sequenciamento do gene 16S rRNA

Para purificação, os produtos de PCR do gene 16S rRNA foram homogeneizados com 1 volume de acetato de amônia 7,5 M e 3 volumes de etanol absoluto e incubados a temperatura ambiente por 20 min. Após a centrifugação por 15 min a 12.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com etanol 70%. Posteriormente, foi realizada uma etapa de evaporação total do etanol 70% por banho seco a 37° C por 1 hora e o precipitado foi ressuspensão em 20 µL de água ultrapura. O DNA foi quantificado em gel de agarose 1% utilizando o *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen) como padrão de massa molecular.

O sequenciamento do gene 16S rRNA foi feito em um sequenciador automático ABI 3500XL (Applied Biosystems) utilizando o kit de reação de sequenciamento *ABI Prism BigDye Terminator Cycle sequencing Read Reaction*. As reações de sequenciamento foram feitas em um volume de 10 µL contendo 0,66 µL de BigDye, 2,34 µL do tampão para o BigDye, 10 µM do primer 338f (5' GCTGCCTCCCGTAGGAGT 3') (SUZUKI, 1996) e 40 ng de produto de PCR purificado. A reação de sequenciamento foi realizada em microplacas utilizando um termociclador com as seguintes condições de ciclagem: 2 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos de 45 segundos a 95 °C, 15 seg a 50 °C e 3 min a 60 °C, e uma etapa final de 10 min a 60 °C.

Após a amplificação, o DNA foi precipitado pela adição de 1 µL de EDTA (125 mM) e 30 µL etanol absoluto. Incubou-se por 15 min e posteriormente as amostras foram centrifugadas (4000 rpm, 45 min, 23°C) e o sobrenadante descartado. Após duas lavagens com 30 µL de etanol 70%, a placa foi seca a 37°C por 1 hora. O DNA precipitado foi ressuspensão em 10 µL de formamida (High-Di™, Thermo Fisher Scientific) desnaturado por 3 min a 95 °C e, em seguida, injetados no sequenciador ABI 3500XL.

Análise das Sequências

A qualidade das sequências obtidas foi verificada usando o programa BioEdit versão 7.2.6. As sequências parciais do 16S rRNA foram submetidas à

comparação com o coeficiente de similaridade do Ribosomal Database Project (RDP) (<http://www.rdp.cme.msu.edu>) através das ferramentas “*Classifier*” e “*SeqMatch*” (MAIDAK et al.1997). As sequências tipo foram recuperadas do NCBI (NCBI, 1988) de acordo com a similaridade apresentada ao submeter-se as sequencias parciais ao banco de dados RDP.O alinhamento de sequencias e a construção das árvores filogenéticas foram realizados no programa MEGA7 (KUMAR et al., 2015), levando em consideração o melhor modelo evolutivo, para isto foi realizado o teste de modelo para cada árvore construída.

Bioprospecção dos isolados para produção de compostos antimicrobianos

Atividade antagonista contra fitopatógenos

A atividade antagonista dos isolados foi avaliada pela técnica de cultura pareada contra os fungos e bactérias fitopatogênicas. Para os ensaios de atividade fúngica foram utilizados como microrganismos indicadores os fungos *Sclerotinia sclerotiorum* causador do mofo branco e o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* causador de antracnose. Para o ensaio, os fungos foram previamente cultivados em meio solido batata (BDA) com 1% de glicose por 7 dias. Os isolados bacterianos foram inoculados em quatro locais equidistantes próximos a borda da placa de petri e em seguida os discos de fungos de 7 mm foram depositados no centro da placa (2 cm de distância das bactérias). Como controle, discos dos fungos foram depositados no centro da placa, mas sem a presença das bactérias. As placas foram incubadas à 28°C por 7 dias para *S. sclerotiorum* e 10 dias para *C. gloeosporioides*. Após esse período, a zona de inibição do crescimento do fungo foi avaliada medindo a distância entre a colônia bacteriana e o fungo. Os isolados foram agrupados de acordo com o nível de inibição do crescimento, sendo classificado como baixa quando o raio era <5 mm (+), média de 6 a 14 mm (++) e alta >15 mm (+++).

Para a avaliação da atividade antibacteriana foram utilizadas como indicadoras as bactérias *Curtobacterium flaccumfaciens* e *Xanthomonas axonopodis*, fitopatogênicas causadoras da murcha e mancha bacteriana, respectivamente, em culturas agrícolas. As bactérias foram cultivadas em meio caldo batata com 1% de glicose a 28 °C sob agitação de 100 rpm. Após 24 horas, a densidade ótica (DO) foi avaliada por espectrofotometria a 600 nm, em seguida, a suspensão celular foi ajustada para DO_{600 nm} 0,2. Alíquotas de 100 µL desta suspensão foram espalhadas

na superfície do meio sólido ágar batata com 1% de glicose. Após, poços de 0,9 cm de diâmetro foram feitos na superfície do ágar, onde 100 µL do sobrenadante de cada isolado foi depositado. Os isolados foram cultivados previamente em caldo batata acrescido de 1% de glicose por 7 dias a 28 °C. Os índices obtidos pela razão entre o diâmetro do halo (DH) e o diâmetro do poço (DP) foram classificados como alta inibição (3,0 a 3,9), inibição mediana (2,0 a 2,9) e baixa inibição (1,2 a 1,9).

Produção de sideróforos

A produção de sideróforos foi avaliada por colorimetria com o reagente cromoazurol S (CAS), conforme procedimento descrito anteriormente (Schwyn & Neilands, 1987). Os isolados foram cultivados em placas *deep-well* de 24 poços contendo 3 mL/poço de meio líquido T (*tris-buffered medium*) pobre em ferro (em g/L, 5,8 de NaCl, 3,7 de KCl, 0,113 de CaCl₂.2H₂O, 0,1 de MgCl₂.6H₂O, 1,1 de NH₄Cl, 0,272 de KH₂PO₄, 0,142 de Na₂SO₄, 12,1 de Tris-base; pH7,4). As células foram cultivadas sob agitação à 120 rpm por 7 dias à 28°C e centrifugadas (3000 rpm, 30 min). O sobrenadante (100 µL) foi transferido para uma microplaca de 96 poços e, em seguida, homogeneizado com 100 µL do reagente CAS (7,5 mL de CAS 2 mM, 1,5 mL de FeCl₃ 1 mM, 25 mL de CTAB 2,4 Mm, 50 mL de tris-base 0,5 M e água ultrapura q.s.p. 100 mL). Após 4 horas de incubação no escuro em temperatura ambiente, a absorbância a 630 nm foi avaliada usando o espectrofotômetro PowerWave HT (Biotek). As análises foram realizadas em duplicatas e como controle negativo foi utilizado o meio T, seguindo o mesmo tratamento das amostras. Uma curva de calibração de EDTA (0-800 µM/mL) foi construída e a equação de regressão obtida foi utilizada para estimar a concentração de sideróforos no sobrenadante. Os isolados mais promissores foram selecionados.

Produção de surfactantes

Os testes de produção de biosurfactantes foram realizados segundo metodologia de colapso da gota conforme YOUSSEF et al, (2004). As bactérias foram cultivadas em placas *deep-well* de 24 poços contendo 3 mL/poço de meio líquido mínimo de Vogel 1X contendo 0,4% de glicose (pH6,5). A composição dos sais de Vogel 50X continha (em g/L) 130 de citrato-Na₃.2H₂O, 126 de KNO₃, 144 de (NH₄) H₂PO₄, 80 de KH₂PO₄, 10 de MgSO₄.7H₂O, 5 de CaCl₂.2H₂O e 5 mL de

elementos traço. A solução de elementos traço continha (em g/L) 50 de ácido cítrico, 50 de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 de $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$, 2,5 de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ e 0,5 de $MnSO_4 \cdot H_2O$. Após crescimento sob agitação de 120 rpm à 28°C por 7 dias, a cultura foi centrifugada e o sobrenadante obtido (20 μ L) foi depositado sobre a superfície da lâmina de óleo mineral previamente preparada na tampa da microplaca pelo espalhamento uniforme de 50 μ L de óleo. Após 2 min de estabilização, foi avaliado o espalhamento da gota que caracteriza a presença do surfactante. Os isolados foram classificados conforme o nível de espalhamento da gota em: produção elevada (+++), média (++) , baixa (+) e negativa (-). Os isolados mais promissores foram selecionados.

Análises Estatísticas

Os dados obtidos da contagem das coletas foram submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro empregando-se o programa estatístico SASM-AGRI (CANTERI, 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento e densidade populacional

A avaliação da densidade populacional foi realizada pela contagem das colônias que se desenvolveram nos meios R_2A e BDA durante o período de 30 dias de incubação e expressas em Unidades Formadoras de Colônia (UFC g^{-1} peso fresco). Para a análise estatística, os dados foram transformados em \log_{10} UFC g^{-1} de peso fresco.

A contagem populacional de bactérias associadas a rizosfera foi significativamente maior que a população bacteriana da endosfera independentemente da localidade de coleta (PG ou OR) ou do meio de cultivo utilizado (BDA ou R_2A) (Tabela 2).

No entanto, a população observada na rizosfera das amostras de Ponta Grossa foi 45 vezes maior que a da endosfera desta localidade, enquanto uma diferença ainda mais acentuada (145 vezes) foi observada entre a rizosfera e endosfera das amostras de Ortigueira. As contagens obtidas na rizosfera e endosfera estão de acordo com a reportada na literatura. A rizosfera pode abrigar

até 10^{11} células microbianas por grama de raiz com mais de 30.000 espécies procarióticas diferentes (BERENDSEN, 2012).

Tabela 2: Contagem populacional em Unidades Formadoras de Colônia (UFC g^{-1} de peso fresco) da rizosfera e endosfera de *B. trimera* coletadas na região de Ponta Grossa e Ortigueira, Paraná-Brasil. Dados são médias de três repetições biológicas (A1, A2, A3) e três replicatas técnicas. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de *Scott-Knott* a nível de 5% probabilidade ($P \leq 0,05$).

Habitat	Ponta Grossa (PG)			Ortigueira (OR)		
	BDA	R2A	Total	BDA	R2A	Total
Rizosfera	$1,25 \times 10^{10}$ a	$6,25 \times 10^9$ a	$1,87 \times 10^{10}$	$1,53 \times 10^9$ b	$1,13 \times 10^9$ b	$2,66 \times 10^9$
Endosfera	$2,83 \times 10^8$ c	$1,35 \times 10^8$ c	$4,18 \times 10^8$	$1,03 \times 10^7$ d	$8,08 \times 10^6$ d	$1,84 \times 10^7$
Total	$1,27 \times 10^{10}$	$6,38 \times 10^9$	$1,91 \times 10^{10}$	$1,54 \times 10^9$	$1,14 \times 10^9$	$2,68 \times 10^9$

A menor contagem observada na endosfera é coerente já que a rizosfera representa um microecossistema de maior diversidade e é uma das fontes principais de bactérias para colonização dos tecidos internos das plantas, a endosfera, o qual é um habitat onde apenas alguns filos bacterianos são capazes de se estabelecer (BULGARELLI et al., 2013).

De modo geral, a contagem populacional das amostras de Ponta Grossa foi significativamente maior que aquelas de Ortigueira, na rizosfera (7 vezes) e principalmente na endosfera (22 vezes). Em relação aos meios de cultivo, ambos apresentaram contagens populacionais similares quando se compara as mesmas amostras dentro da mesma localidade. Conforme reportado na literatura, o uso de meios de cultivos pobres nutricionalmente possibilita maiores contagens e a obtenção de maior diversidade de isolados. Neste estudo o preparo do meio de cultivo batata foi utilizado somente o caldo de batata cozida sem a adição de fonte de carbono (glicose) extra. O uso de fonte de carbono prontamente disponível e em dose elevadas (glicose; $5-10 \text{ g.L}^{-1}$) mostrou-se, em testes preliminares, inadequado tendo em vista que os microrganismos de crescimento rápido predominam e as colônias formadas se espalhavam sobre a placa. O meio R₂A é considerado um meio pobre nutricionalmente e tem sido utilizado com sucesso em estudos de isolamento principalmente, para a obtenção de actinobactérias de crescimento lento (HYVÄRINEN et al., 1991; MANDAL et al., 2013). De modo geral, ambos os meios propiciaram contagens elevadas de bactérias e uma grande diversidade de colônias.

Outro fator a ser considerado é o tempo de incubação. Neste estudo, as placas foram incubadas por até 30 dias, sendo o surgimento de colônias monitoradas semanalmente e as colônias morfologicamente distintas eram repicadas para purificação (Figura 4). A utilização de um período maior de incubação tem sido recomendada em diversos estudos de diversidade bacteriana cultivável, onde tem permitido a obtenção de isolados de crescimento lento que antes eram considerados incultiváveis (ROMEIRO, 2001; BULL, 2004; DAVIS et al., 2005).

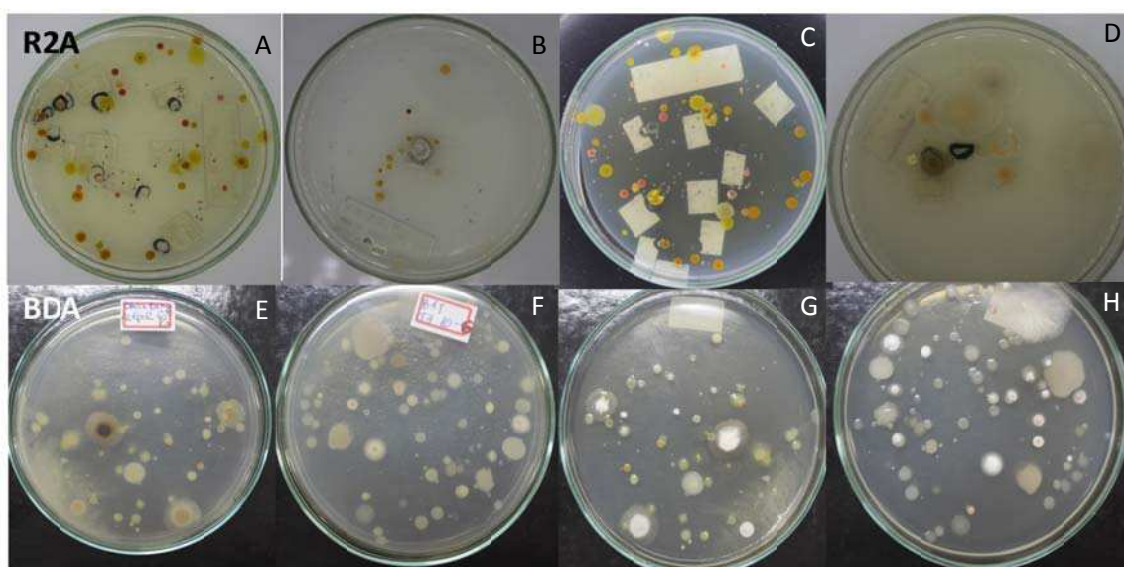


Figura 4: Placas de Isolamento. A e B adquiridas do isolamento da rizosfera e C e D endorrizosfera obtidas no meio de cultivo R₂A. E e F adquiridas do isolamento da rizosfera e G e H da endorrizosfera obtidas no meio de cultivo ágar caldo batata.

Um dos pré-requisitos para o isolamento de bactérias endofíticas é a esterilização da superfície radicular para eliminação de microrganismos da rizosfera e do rizoplano. Neste estudo, o processamento das amostras consistiu no tratamento sequencial com ultrassom (sonicador) e cloramina-T. O tratamento com ultrassom tem sido recomendado em alguns estudos para o isolamento de microrganismos aderidos à superfície inclusive de superfícies vegetais. Aqui, nós utilizamos este tratamento para desfazer microcolônias aderidas à superfície radicular e, portanto, a suspensão obtida após este tratamento contempla

microrganismos da rizosfera e do rizoplane. Em trabalhos anteriores tem sido reportado que o uso de ultrassom leva a dispersão de agregados de células aderidos à superfície das plantas, resultando em maior número de contagens de colônias. As condições utilizadas no ultrassom (dois ciclos de 30 s a frequência 80kHz e potência 50%, no gelo) foram estabelecidas em ensaios preliminares e com base na literatura (VERMA; GANGE, 2014). De acordo com HALLMANN (1997, 2006) o tratamento de esterilização superficial tem que ser adaptado ao tecido vegetal e aos microrganismos. O tratamento das raízes de *B. trimeracom* cloramina-T 1% pelo período de 30 min mostrou-se eficiente como processo de desinfestação da superfície radicular, não sendo observado colônias nos meios de cultivo inoculados com a última água do enxágue após tratamento de desinfestação mesmo após 30 dias de incubação (HALLMANN et al., 1997, 2006). O tratamento com cloramina-T 1% por 30 min utilizado no estudo foi estabelecido previamente em testes realizados com diferentes concentrações (1 e 2%) e tempo de tratamento (10, 15 e 30 min), onde foi possível observar que em concentrações maiores de cloramina-T ou de hipoclorito de sódio (NaClO) as plantas sofriam oxidação tornando-se escurecidas e, em tempo inferior a 30 min, algumas colônias ainda surgiam no meio de cultivo. Considerando a eficiência do processamento das amostras (ultrassom seguido de esterilização superficial com cloramina-T) pode-se considerar que a contagem populacional e os isolados obtidos das raízes maceradas são de bactérias endofíticas, conforme definição de Hallmann que definem bactéria endofítica aquela que pode ser isolada ou extraída de dentro do tecido vegetal esterilizado superficialmente e que não causa danos visíveis à planta hospedeira (HALMANN et al., 1997).

Análise química do solo

Na tabela 3 estão apresentadas as análises químicas do solo das regiões de Ponta Grossa e Ortigueira, Paraná-Brasil. De acordo com o levantamento de reconhecimento dos solos do estado do Paraná (EMBRAPA, 2006), o solo da região de coleta de Ponta Grossa pode ser classificado como Latossolo Vermelho Distrófico (LVD) e o solo da região de coleta de Ortigueira pode ser classificado Nitossolo Háplico Alumínico (NHA). Uma das características do LVD é sua baixa fertilidade e os altos teores de ferro ferroso. Já a o NHA tem como característica teores elevados de alumínio como foi observado na análise química do solo de Ortigueira

(EMBRAPA, 2009). SERRAT, KRIEGER e MOTTA, (2006), estabeleceram parâmetros gerais médios para a interpretação preliminar de resultados de análise da fertilidade do solo. As tabelas de referência destas variáveis encontram-se em anexo. Segundo estes autores os pH encontrados nos dois locais de coleta foram semelhantes podem ser classificados como muito baixos. A concentração de potássio foi média em PG e muito alta em OR. Já as concentrações de cálcio e alumínio foram baixas em PG e altas em OR. As concentrações de magnésio foram muito altas em ambas as localidades. As concentrações de fósforo foram Muito Baixa em PG e Média em OR. Ao se fazer uma comparação geral das variáveis nas duas localidades, pode-se observar que o solo da coleta de OR apresentou níveis mais elevados em relação à PG.

Tabela 3: Análise química dos solos de região de coleta de Ponta Grossa (PG) e Ortigueira (OR)

Variáveis Químicas Analisadas	Ponta Grossa	Ortigueira
<i>pH</i>	4,4 (MB)	4,3 (MB)
<i>Acidez Potencial (H+Al) (cmolc/dm³)</i>	8,36	13,06
<i>Potássio (cmolc/dm³)</i>	0,16 (M)	0,48 (MA)
<i>Cálcio (cmolc/dm³)</i>	1,17 (B)	5,52 (A)
<i>Magnésio (cmolc/dm³)</i>	1,31 (MA)	2,74 (MA)
<i>Alumínio (cmolc/dm³)</i>	0,35 (B)	3,2 (A)
<i>Saturação de bases (%)</i>	2,64	8,74
<i>Fósforo (mg/Kg)</i>	7,48 (MB)	25,73 (M)
<i>Matéria Orgânica (%) (C e N)</i>	3,38	3,02

Ponta Grossa-PR, Brasil (Lat 25°05'42" S Lon 50°09'43"W); Ortigueira-PR, Brasil (Lat 24°12'30" S Lon 50°56'58"W). As amostras do solo foram analisadas conforme metodologia de SILVA (1999). Concentrações das variáveis classificadas de acordo com Serrat, Krieger e Motta (2006) em Muito Baixo (MB), Baixo (B), Médio (M), Alto (A) e Muito Alto (MA).

Purificação e confecção da coleção BTM

Após purificação e caracterização morfológica, 182 isolados foram selecionados e criopreservados, compondo a coleção da rizosfera e endosfera de *B. trimera* (Coleção BTM), a qual se encontra disponível no Laboratório de Genética de

Microrganismos (LAGEM) da Universidade Estadual de Londrina. Deste total, 114 isolados foram obtidos de amostras coletadas em Ponta Grossa (PG) e 68 das amostras de Ortigueira (OR). Com relação a parte da planta analisada, 90 isolados foram obtidos da endosfera radicular (69 de Ponta Grossa e 21 de Ortigueira) e 92 da rizosfera, sendo 45 de Ponta Grossa e 47 de Ortigueira (Tabela 4).

Tabela 4: Número de Isolados da rizosfera e endosfera de *B. trimera* coletadas na região de Ponta Grossa e Ortigueira, Paraná-Brasil.

Habitat	Ponta Grossa (PG)		Ortigueira (OR)		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Endosfera	69	38	21	11	90	49
Rizosfera	45	25	47	26	92	51
Total	114	63	68	37	182	100

Análise da Diversidade Bacteriana da endosfera e rizosfera de *B. trimera* por ARDRA

Perfis de restrição do gene 16S RNAr de 202 isolados foram obtidos pela digestão do produto de amplificação com três enzimas de restrição de corte frequente (*HaeIII*, *MspI* e *HindIII*). Os perfis de restrição foram utilizados para análises de agrupamentos utilizando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Dice (BioNumerics), constituindo quatro dendrogramas (Anexo), sendo dois (Endosfera e Rizosfera) de Ponta Grossa e dois de Ortigueira (Endosfera e Rizosfera). Com base na análise de agrupamento e considerando 80% de similaridade, foram selecionados 129 isolados representativos dos grupos formados nos dendrogramas para sequenciamento do gene 16S RNAr visando o posicionamento filogenético dos isolados.

Análise filogenética da comunidade bacteriana cultivável de *B. trimer*

Para o posicionamento filogenético, inicialmente foi realizada uma análise comparativa das sequências parciais (regiões variáveis V3 a V5) do gene 16S rRNA de 129 isolados representativos da coleção BTM. Para isto, foi utilizado a classificação do banco de dados RDP II (Ribosomal Database Project II) através da ferramenta *Classifier* que permitiu a identificação de representantes de três filos do domínio Bacteria. Foram encontrados na rizosfera e endosfera das plantas coletadas em Ponta Grossa e Ortigueira, sendo 30% pertencente ao filo Firmicutes (Classe Bacilli), 24% ao filo Actinobacteria (Classe Actinobacteria) e uma maioria de 46% ao filo Proteobacteria, com representantes de três classes α (22%), β (12%) e γ (12%) (Tabela 5).

Tabela 5: Classes bacterianas encontradas após a identificação dos isolados

Filo	Classe	Ponta Grossa (PG)		Ortigueira (OR)		Total
		Endosfera	Rizosfera	Endosfera	Rizosfera	
Actinobacteria	Actinobacteria	9	14	1	6	30
Firmicutes	Bacilli	17	12	7	4	40
	α	13	6	4	4	27
Proteobacteria	β	3	3	-	10	16
	γ	4	2	4	6	16
Isolados (N°)		46	37	16	30	129

A análise da sequência parcial do 16S rRNA dos 129 isolados contra o banco de dados do RDP resultou na identificação de 38 gêneros bacterianos, evidenciando uma microbiota altamente diversa associada a plantas de *B. trimer*. Os resultados apresentados indicam o sucesso da estratégia de isolamento adotada neste trabalho com a utilização de dois meios de composição química diferentes, o ágar-caldo batata (sem glicose) e um meio pobre (R2A), e o tempo de incubação prolongado por até 30 dias. O meio batata é um meio complexo rico nutricionalmente que proporciona maior disponibilidade de nutrientes para microrganismos mais exigentes metabolicamente; no entanto, a exclusão da glicose de sua composição foi essencial, pois impediu que microrganismos de crescimento rápido dominassem o meio de cultivo como normalmente ocorre. Do mesmo modo, o meio R₂A com

composição química definida é considerado um meio pobre nutricionalmente favoreceu os microrganismos de crescimento lento ou tardio permitindo seu isolamento.

A microbiota associativa das plantas coletadas em Ponta Grossa diferiu daquelas coletadas em Ortigueira; contudo, 11 gêneros (*Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Methylobacterium*, *Staphylococcus*, *Paenibacillus*, *Variovax*, *Burkholderia*, *Luteibacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus* e *Bradyrhizobium*) foram encontrados colonizando tanto a rizosfera quanto a endosfera de *B. trimeria* obtidas de ambas as localidades, com exceção dos gêneros *Arthrobacter* e *Bacillus* que foram obtidos somente das plantas de Ponta Grossa e o gênero *Bradyrhizobium* isolados somente das plantas de Ortigueira. A ocorrência destes gêneros em ambas as localidades de coleta e nos dois habitats (endosfera e rizosfera), indicam que estes são representantes comuns da microbiota associativa de *B. trimeria*.

Outros gêneros, contudo, foram obtidos exclusivamente da endosfera (12 gêneros) ou da rizosfera (14 gêneros) como *Kitasatospora* que embora tenha sido encontrado em plantas das duas localidades, foi isolado somente da rizosfera de *B. trimeria*. Dos 38 gêneros identificados (Tabela 6), aqueles que tiveram uma preferência de sítio de colonização (endosfera ou rizosfera) tiveram também, em sua maioria, uma ocorrência mais restrita, sendo isolados de plantas de Ponta Grossa (*Arthrobacter*, *Bacillus*, *Serratia*, *Sphingomonas*, *Conexibacter*, *Rhodococcus*, *Leifsonia*, *Xanthomonas*, *Micrococcus*, *Nocardioides*, *Tardiphaga*, *Microbacterium* e *Bosea*) ou de Ortigueira (*Chromobacterium*, *Lysinibacillus*, *Dongia*, *Dunganella*, *Kluyvera*, *Thauera*, *Rhizobacter*, *Stenotrophomonas*, *Mycobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Caulobacter*, *Herbaspirillum*, *Pantoea* e *Sphingobium*). De acordo com esta análise, mais de 70% da microbiota associativa de *B. trimeria* foi exclusiva de plantas de alguma localidade (Ponta Grossa ou Ortigueira), evidenciando uma influência do solo destas localidades na composição da comunidade associativa de *B. trimeria*. A composição da comunidade microbiana da rizosfera é influenciada por fatores bióticos e abióticos (BHATTACHARYYA; JHA, 2012). O solo tem uma forte influência sobre a composição da comunidade bacteriana e micorrízica na rizosfera, pois as características físico-químicas dos solos afetam a fisiologia das plantas e os padrões de exsudatos radiculares (GRIFFITHS; PHILIPPOT, 2013).

Segundo PHILIPPOT, a composição da microbiota da rizosfera é resultado de uma hierarquia de eventos. Primeiro, o solo pode ser considerado como uma fonte de células microbianas e as propriedades físico-químicas juntamente com os processos biogeográficos estruturam esta comunidade. Sendo assim, o solo onde as plantas são cultivadas determina a qual biota as raízes das plantas serão expostas. Em seguida, as espécies de plantas e o genótipo determinam fortemente quais os membros deste reservatório podem crescer e prosperar na rizosfera (PHILIPPOT et al., 2013).

Tabela 6: Identificação taxonômica em nível de gêneros* dos isolados através do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA de bactérias identificadas em associação com a rizosfera e endosfera de *B. trimerica* obtidos em Ponta Grossa e Ortigueira.

Rizosfera				Endosfera			
Ponta Grossa	Nº	Ortigueira	Nº	Ponta Grossa	Nº	Ortigueira	Nº
<i>Arthrobacter</i> ^{PG}	2	<i>Bradyrhizobium</i> ^{OR}	1	<i>Arthrobacter</i> ^{PG}	1	<i>Bradyrhizobium</i> ^{OR}	1
<i>Bacillus</i> ^{PG}	11	<i>Burkholderia</i>	4	<i>Bacillus</i> ^{PG}	13	<i>Paenibacillus</i>	6
<i>Burkholderia</i>	3	<i>Luteibacter</i>	1	<i>Burkholderia</i>	2	<i>Pseudomonas</i>	1
<i>Methylobacterium</i>	4	<i>Methylobacterium</i>	2	<i>Luteibacter</i>	2	<i>Streptomyces</i>	1
<i>Pseudomonas</i>	1	<i>Paenibacillus</i>	3	<i>Methylobacterium</i>	3		
<i>Staphylococcus</i>	1	<i>Pseudomonas</i>	3	<i>Paenibacillus</i>	2		
<i>Streptomyces</i>	7	<i>Staphylococcus</i>	1	<i>Pseudomonas</i>	5		
		<i>Streptomyces</i>	4	<i>Staphylococcus</i>	2		
		<i>Variovorax</i>	2	<i>Streptomyces</i>	4		
				<i>Variovorax</i>	1		
<i>Serratia</i> ^{PG}	1	<i>Duganella</i> ^{OR}	1	<i>Xanthomonas</i> ^{PG}	1	<i>Caulobacter</i> ^{OR}	1
<i>Sphingomonas</i> ^{PG}	2	<i>Herbaspirillum</i> ^{OR}	1	<i>Microbacterium</i> ^{PG}	1	<i>Dongia</i> ^{OR}	1
<i>Conexibacter</i> ^{PG}	1	<i>Kluyvera</i> ^{OR}	1	<i>Micrococcus</i> ^{PG}	2	<i>Lysinibacillus</i> ^{OR}	1
<i>Kitasatospora</i>	1	<i>Mycobacterium</i> ^{OR}	1	<i>Nocardioides</i> ^{PG}	1	<i>Pantoea</i> ^{OR}	2
<i>Leifsonia</i> ^{PG}	1	<i>Sphingobium</i> ^{OR}	1	<i>Tardiphaga</i> ^{PG}	4	<i>Rhizobacter</i> ^{OR}	1
<i>Rhodococcus</i> ^{PG}	2	<i>Stenotrophomonas</i> ^{OR}	1	<i>Bosea</i> ^{PG}	1	<i>Rhizobium</i> ^{OR}	1
		<i>Thauera</i> ^{OR}	1	<i>Kocuria</i> ^{PG}	1		
		<i>Kitasatospora</i> ^{OR}	1				
		<i>Chromobacterium</i> ^{OR}	1				
Total de Isolados	37		30		46		16

*Gêneros identificados pela análise da sequência parcial do 16S rRNA dos 129 isolados contra o banco de dados do RDP. Parte inferior da tabela contempla os gêneros exclusivos da rizosfera ou endosfera. PG e OR representam os gêneros exclusivamente obtidos das amostras de Ponta Grossa ou Ortigueira, respectivamente.

Filo Actinobacteria

Os isolados do gênero *Arthrobacter*, BTM13, BTM16, e BTM393, foram obtidos tanto da rizosfera quanto da endosfera de *B. trimera* somente das plantas de Ponta Grossa. Os isolados BTM13 e BTM16 mostraram maior proximidade as espécies *A. pascens*, *A. ramosus* e *A. globiformis* que apresentaram 99 e 98% de similaridade, respectivamente. O isolado BTM393 apresentou 97% de similaridade com *A. siccitolerans* quando submetido ao banco de dados RDP II. O gênero *Arthrobacter* pertence à família Micrococaceae (Filo Actinobacteria, Ordem Actinomycetales) e compreende 89 espécies (PARTE, 2013). São habitantes comuns do solo e inclui algumas espécies isoladas da rizosfera e endosfera de diversas espécies vegetais, tais como milho (PISARSKA; PIETR, 2011), e plantas halófitas como *Salsola affinis* (WANG et al., 2015).

Os isolados do gênero *Streptomyces* (16 isolados) foram obtidos da rizosfera e endosfera de *B. trimera* das plantas de Ponta Grossa e também Ortigueira. Estes isolados mostraram proximidade a diferentes espécies tais como espécies *S. longwoodensis*, *S. mirabilis*, *S. nojiriensis*, *S. galbus* e *S. virginiae* entre outros com diferentes similaridades quando submetidos ao banco de dados RDP II como similaridade de 95% a 100%, como é o caso do isolado BTM 300 de apresentou similaridade de 95% com diversos isolados. O gênero *Streptomyces* pertence à família Streptomycetaceae (Ordem Actinomycetales, subordem Streptomycineae) e compreende 818 espécies e 38 subespécies (PARTE, 2013). Nesta mesma família temos ainda o gênero *Kitasatospora* que compreende 23 espécies (PARTE, 2013). Dois isolados (BTM417 e BTM447) foram encontrados na rizosfera de *B. trimera* tanto das plantas provenientes de Ponta Grossa como de Ortigueira e apresentaram alta similaridade (99%).

O gênero *Conexibacter* está representado pelo isolado BTM102 foi obtido da rizosfera de Ponta Grossa. Ao submeter sua sequência parcial do gene 16S (793 pb) mostrou similaridade com diversas espécies tipo do filo Actinobacteria, no entanto, as maiores similaridades observadas, ao submeter à ferramenta *Seq Match* deste banco de dados, foram com *Conexibacter arvalis* (81%), *Conexibacter woesei* (77%) apesar de ter apresentado similaridade de 95% à este gênero quando utilizado a ferramenta *Classifier*. O gênero *Conexibacter* pertence à Ordem Solirubrobacterales e compreende apenas 2 espécies (PARTE, 2013). Bactérias pertencentes ao gênero

Conexibacter são habitantes de diversos ambientes tais como o solo (PUKALL et al., 2010) e já foram reportados na rizosfera de *Triticum aestivum* (NAZ et al., 2014).

O isolado do gênero *Kocuria* (BTM438) foi obtido da endosfera de *B. trimera* somente das plantas de Ortigueira. Este isolado mostrou maior similaridade com a espécie tipo *Kocuria salsici* (99%). O gênero *Kocuria* pertence à família Micrococaceae (Filo Actinobacteria, Ordem Actinomycetales) e compreende 23 espécies (PARTE, 2013). Espécies do gênero *Kocuria* são descritas como endofíticas de várias espécies vegetais tais como, cana-de-açúcar (VELÁZQUEZ et al., 2008), *Prosopis laegivata* de locais contaminados com arsênio (ROMÁN-PONCE et al., 2016), planta medicinal *Combretum latifolium* (RAO et al., 2015) e *Dracaena cochinchinenses* (SALAM et al., 2017).

Filo Firmicutes

O isolado do gênero *Lysinibacillus* (BTM458) foi obtido da endosfera de *B. trimera* somente das plantas de Ortigueira. Este isolado mostrou maior similaridade com a espécie tipo *Lysinibacillus macroides* e *Lysinibacillus pakistanensis* (97%). O gênero *Lysinibacillus* pertence à família Planococcaceae (Filo Firmicutes, Ordem Bacillales) e compreende 23 espécies (PARTE, 2013). Espécies do gênero *Lysinibacillus* são descritas como endofíticas de várias espécies de plantas às plantas medicinais *Panax ginseng* (VENDAN et al., 2010), *Panax notoginseng* (MA et al., 2013) e *Polygonum cuspidatum* (SUN et al., 2013).

Os isolados do gênero *Staphylococcus*, BTM28, BTM82 e BTM117 foram obtidos tanto da rizosfera quanto da endosfera de *B. trimera* coletadas em Ponta Grossa e BTM503 foi obtida da rizosfera de plantas coletadas em Ortigueira. Os isolados BTM82 BTM17 e BTM 503 apresentaram alta similaridade com *S. capitis* (100, 100 e 99%, respectivamente) o isolado BTM28 apresentou similaridade com *S. pasteurii* (96%), quando colocados contra o banco de dados RDP II. O gênero *Staphylococcus* pertence à família Staphylococcaceae (Filo Firmicutes, Ordem Bacillales) e compreende 52 espécies (PARTE, 2013).

Filo Proteobacteria

O isolado BTM329 foi obtido da endosfera de raízes de *B. trimera*. Ao submeter sua sequência parcial do gene 16S (836 pb) mostrou similaridade com *Bosea robiniae* (99%). O gênero *Bosea* pertence à família Bradyrhizobiaceae (Classe Alphaproteobacteria, Ordem Rhizobiales) e compreende apenas 9 espécies (PARTE, 2013). Bactérias pertencentes ao gênero *Bosea* já foram relatados como endófitos de *Lespedeza sp.*(PALANIAPPAN et al., 2010)e *Curcuma zedoaria* (RATNA SULISTIYANI et al., 2014).

O isolado BTM495 foi obtido da endosfera de raízes de *B. trimera* e mostrou similaridade com *Caulobacter henricii*. O gênero *Caulobacter* pertence à Família Caulobacteraceae (Ordem Caulobacterales, Classe Alphaproteobacteria) e compreende 17 espécies (PARTE, 2013). Bactérias pertencentes ao gênero *Caulobacter* já foram reportadas como associadas à batata(RASCHE et al., 2006), em nódulos de plantas não leguminosas (MEYER, DE et al., 2015) e solos onde ocorre cultivo de arroz (HARDOIM et al., 2012).

Os isolados BTM343, BTM344, BTM401, BTM408 e BTM427 apresentaram similaridade com cinco gêneros da família Bradyrhizobiaceae, no entanto, com o gênero *Tardiphaga* apresentaram de 96 a 99% de similaridade. Estes isolados foram obtidos da endosfera de raízes de *B. trimera* somente das plantas de Ponta Grossa. O gênero *Arthrobacter* pertence à ordem Rhizobiales (classe Alphaproteobacteria, Filo Proteobacteria) e compreende apenas a espécie *T. robiniae* (PARTE, 2013). *Tardiphaga robiniae* foi isolada de nódulos da leguminosa *Vavilovia formosa* (SAFRONOVA et al., 2015).

O isolado BTM560 foi obtido da rizosfera de plantas coletadas em Ortigueira. Ao submeter sua sequência parcial do gene 16S (778 pb) mostrou similaridade com diversas espécies tipo da família Oxalobacteraceae, no entanto, as maiores similaridades observadas, ao submeter à ferramenta *SeqMatch* deste banco de dados, foram com *Duganella sacchari* (96%). O gênero *Duganella* pertence à Família Oxalobacteraceae (Ordem Burkholderiales, Classe β -Proteobacteria) e compreende apenas 6 espécies (PARTE, 2013).

O isolado BTM507 foi obtido da rizosfera de plantas de Ortigueira mostrou similaridade com diversas espécies tipo da Família Rhodocyclaceae, no entanto, as maiores similaridades observadas. As similaridades apresentadas foram com as

espécies *Thauera aminoaromatica* (81%) e *Thauera selenatis* (81%). O gênero *Thauera* pertence à Ordem Rhodocyclales (Classe β -Proteobacteria) e compreende 10 espécies (PARTE, 2013).

O isolado 562 foi obtido da endosfera de raízes da *B. trimera* coletada em Ortigueira. Ao submeter sua sequência parcial do gene 16S (660 pb) à ferramenta *Seq Match* do RDP II, o isolado apresentou baixa similaridade com 14 gêneros bacterianos da família Alcaligenaceae. As maiores similaridades encontradas foram com *Zhizhongheella caldifontis* (84%) e *Methylibium petroleiphilum*. Quando este isolado foi submetido à ferramenta *Classifier* do banco de dados RDP II o resultado foi 100% de similaridade com o Filo Proteobacteria e 58% de similaridade com a Classe Gamaproteobacteria.

Posicionamento Taxonômico (Gênero/Espécie) dos isolados

As sequências parciais do 16S rRNA dos 129 isolados foram submetidas ao banco de dados RDP utilizando a ferramenta *Classifier*, permitindo a identificação preliminar dos gêneros mais próximos a cada isolado. Foram realizados os posicionamentos filogenéticos dos principais gêneros encontrados associados à *B. trimera*.

Gênero *Rhizobium* sp.

Foi construída uma árvore filogenética a partir do alinhamento múltiplo da sequência parcial do 16S rRNA de 6 isolados de *B. trimera* (BTM45, BTM47, BTM385, BTM399, BTM403 e BTM405), previamente classificados como *Rhizobium*, com as sequências do 16S rRNA das espécies tipo mais próximas encontradas no banco de dados RDP II (Tabela 7).

Tabela 7: Análise de similaridade da sequência parcial do 16S rRNA de 6 isolados de *Rhizobium* sp. de *B. trimera* ao o banco de dados RDP II utilizando a ferramenta *Sequence Match*.

Grupo	Isolado	Pares de Base	SeqMatch (RDP)	% Similaridade (RDP)
I	<i>Rhizobium</i> sp. BTM45	641	<i>Agrobacterium rubi</i>	98
	<i>Rhizobium</i> sp. BTM385	788	<i>R. lusitanum</i>	
	<i>Rhizobium</i> sp. BTM47	720	<i>R. miluonense</i>	

			<i>R. mayense</i>	
II	<i>Rhizobium sp. BTM403</i>	824	<i>R. grahamii</i>	95
IV	<i>Rhizobium sp. BTM399</i>	791	<i>R. yanglingense</i>	91
			<i>R. loessense</i>	91
			<i>R. gallicum</i>	89
	<i>R. smilacinae</i>	89		
	<i>Rhizobium sp. BTM476</i>	883	<i>R. cellulosilyticum</i>	95

Dois grupos filogenéticos principais foram formados (Figura 5). No grupo I foram posicionados com 100% de identidade nucleotídica os isolados BTM45, BTM47 e BTM385 e as espécies *R. miluonense*, *R. mayense*, *R. lusitanum* e *Agrobacterium rubi*. A espécie tipo *A. rubi* foi recentemente reclassificada e adicionada à análise por apresentar identidade nucleotídica com isolado BTM45. O isolado BTM403 foi posicionado com 98% de bootstrap próximo as espécies *R. tibeticum*. Os isolados BTM399 e BTM476 foram posicionados no grupo II próximos as espécies *R. smilacinae*, *R. yangtingense* e *R. cellulosilyticum* com 92% de bootstrap, sendo o isolado BTM476 mais próximo de *R. cellulosilyticum*.

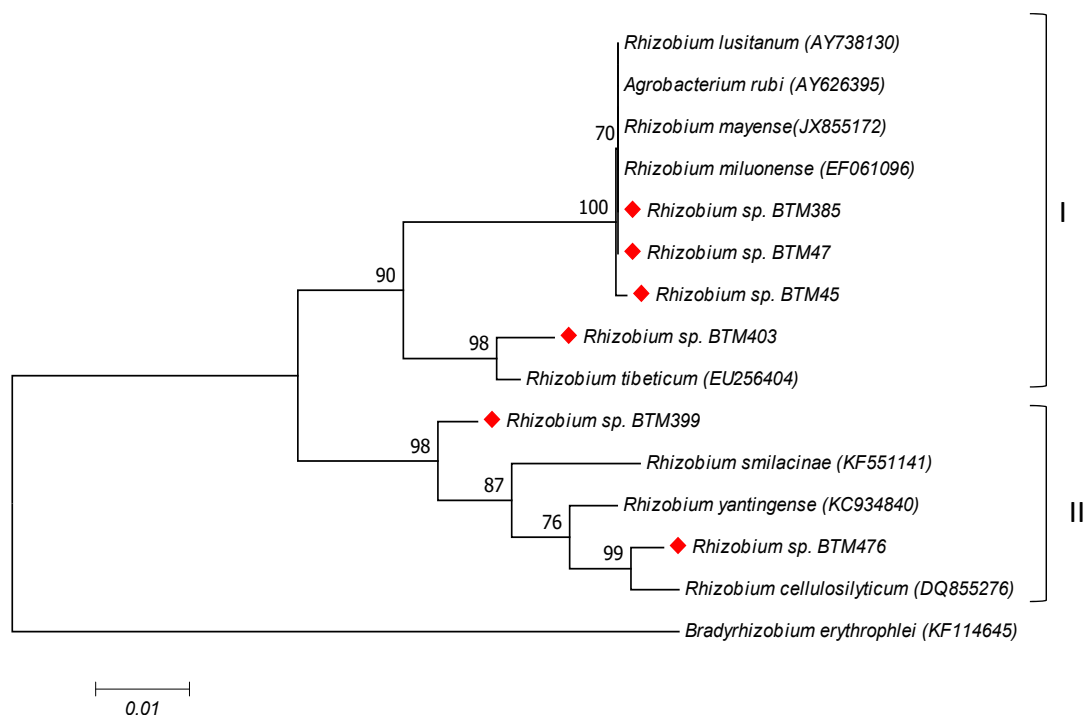


Figura 5: Relações evolutivas dos isolados do gênero *Rhizobium*. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A análise envolveu 15 sequências de nucleotídeos. A porcentagem de repetições em bootstrap (1000 repetições) são mostrados próximos dos ramos. As distâncias evolutivas respondem ao método Kimura 2-parâmetros. Havia um total de 708 pares de base no conjunto de dados final. Os isolados a fim de posicionar estão indicados na figura com marcação na cor vermelho.

Gênero *Streptomyces* sp.

Foi construída uma árvore filogenética a partir do alinhamento múltiplo das sequências parciais do gene 16S rRNA de 17 isolados de *B. trimera* (Tabela 8).

Ao nível de 95% de similaridade com relação ao *outgroup*, foram constituídos 5 grupos principais na árvore filogenética deste grupo (I-V) (Figura 6). No grupo I foram alocadas 5 sequências de isolados. As BTM281 e BTM290 apresentaram 100% de identidade nucleotídica com doze espécies tipo do gênero *Streptomyces*. Logo abaixo, o isolado BTM298 apresentou 100% de similaridade apenas com *S. graminifoli*. O isolado BTM166 apresentou 100% de identidade nucleotídica com as espécies *S. vietnamensis* e *S. litmocidini*. O isolado BTM36 apresentou 100% de identidade nucleotídica com *S. recifenses*.

Tabela 8: Análise de similaridade da sequência parcial do 16S rRNA de 17 isolados de *Streptomyces* sp. de *B. trimera* ao banco de dados RDP II utilizando a ferramenta *Sequence Match*.

Grupo	Isolado	Pares de Base	% Similaridade	Seq Match (RDP)
IA	<i>Streptomyces</i> sp. BTM360	740	98	<i>S. galbus</i>
	<i>Streptomyces</i> sp. BTM362	760		<i>S. longwoodensis</i>
IB	<i>Streptomyces</i> sp. BTM446	885	98	<i>S. kasugaensis</i>
	<i>Streptomyces</i> sp. BTM450	836	100	<i>S. libani</i>
			100	<i>S. hygrosopicus</i>
	<i>Streptomyces</i> sp. BTM453	664	98	<i>S. graminisoli</i>
IC	<i>Streptomyces</i> sp. BTM550	748	96	<i>S. mirabilis</i>
	<i>Streptomyces</i> sp. BTM449	874	97	
	<i>Streptomyces</i> sp. BTM291	849	96	<i>S. longisporus</i>
	<i>Streptomyces</i> sp. BTM380	701	98	
ID	<i>Streptomyces</i> sp. BTM300	698	95	<i>S. lavendofoliae</i>
				<i>S. polyantibioticus</i>
				<i>S. michiganensis</i>
				<i>S. melanogenes</i>

			<i>S. noboritoensis</i>
			<i>S. mauvecolor</i>
	<i>Streptomyces sp. BTM417</i>	835	<i>S. purpeofuscus</i>
	<i>Streptomyces sp. BTM447</i>	807	99 <i>Kitasatospora atroaurantiaca</i>
			<i>Kitasatospora kifunensis</i>
II	<i>Streptomyces sp. BTM166</i>	842	99 <i>S. litmocidini</i>
	<i>Streptomyces sp. BTM298</i>	781	<i>S. graminifolii</i>
	<i>Streptomyces sp. BTM281</i>	810	<i>S. nojiriensis</i>
III	<i>Streptomyces sp. BTM290</i>	665	98 e 100, respectivamente <i>S. spororaveus</i>
			<i>S. cirratus</i>
			<i>S. flavotricini</i>
			<i>S. virginiae</i>
			<i>S. polychromogenes</i>
IV	<i>Streptomyces sp. BTM36</i>	724	99 <i>S. recifensis</i>

O item Grupo representa a qual grupo os isolados foram alocados no posicionamento filogenético neste trabalho.

No grupo II, os isolados BTM362 e BTM360 foram posicionados próximos às espécies *S. herbaceus* e *S. incanus*. Já o isolado BTM453 foi posicionado próximo às espécies *S. gramineus*, *S. graminisoli* e *S. rhizophilus*. O isolado BTM380 se posicionou próximo às espécies *S. longisporus* e *S. flavidoriens*. Já os isolados BTM291, BTM449 e BTM550 apresentaram 95% de similaridade com as espécies *S. cyaneus* e *S. mirabilis*.

No grupo III, o isolado BTM300 apresentou 98% de identidade nucleotídica com *S. melanogenes*, *S. noboritoensis*, *S. mauvecolor*, *S. xanthochromogenes* e *S. michiganensis*.

No grupo IV, os isolados BTM417 e BTM447 apresentaram 99% identidade nucleotídica com *S. purpeofuscus*, *Kitasatospora kufinensis* e *Kitasatospora atroaurantiaca*. E no grupo V, o isolado BTM450, apresentou 100% de identidade nucleotídica com *S. decoyicus*, *S. libani* e *S. platensis*.

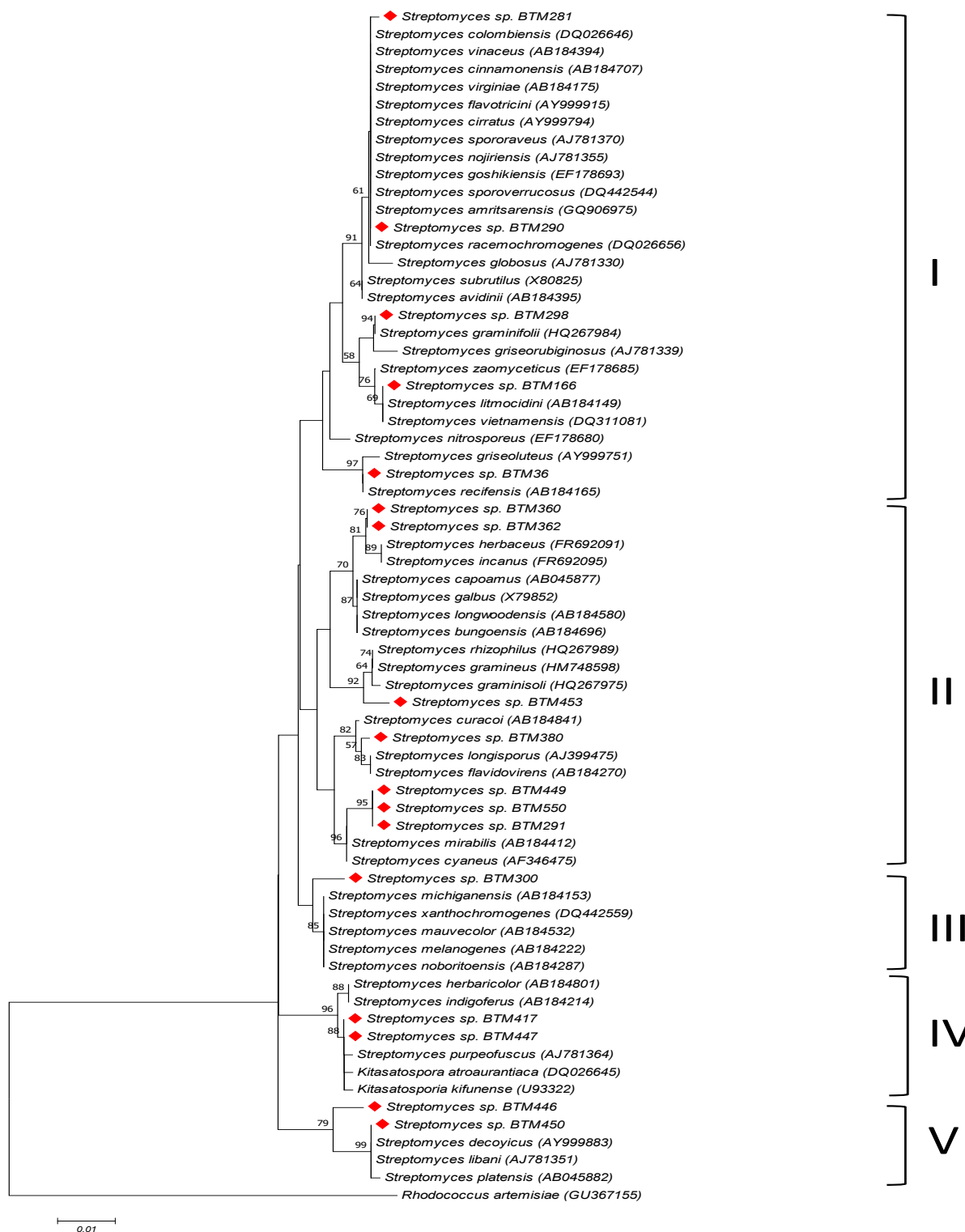


Figura 6: Relações evolutivas do isolados do gênero *Streptomyces*. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A análise envolveu 68 sequências de nucleotídeos. A porcentagem de repetições dos taxa associados agruparam em bootstraps (1000 repetições) são mostrados próximos dos ramos. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Kimura-2 parâmetros. Houve o total de 669 pares de base utilizado no alinhamento.

Gênero *Burkholderia* sp.

Foi construída uma árvore filogenética a partir do alinhamento múltiplo da sequência parcial do 16S rRNA de 8 isolados de *B. trimera*, previamente classificados como *Burkholderia*, com as sequências do 16S rRNA das espécies tipo mais próximas encontradas no banco de dados RDP II (Tabela 9).

Tabela 9: Análise de similaridade da sequência parcial do 16S rRNA de 8 isolados de *Burkholderia* sp. de *B. trimera* ao o banco de dados RDP II utilizando a ferramenta *Sequence Match*.

Grupo	Isolado	Pares de Base	%	Seq Match (RDP)
I	<i>Burkholderia</i> sp. BTM 27	700	98	<i>B. diffusa</i>
	<i>Burkholderia</i> sp. BTM43	499	94	<i>B. diffusa</i>
			93	<i>B. plantarii</i>
	<i>Burkholderia</i> sp. BTM131	798	96	<i>B. diffusa</i>
			96	<i>B. contaminans</i>
II	<i>Burkholderia</i> sp. BTM317	602	99	<i>B. terrae</i>
			95	<i>B. caribensis</i>
	<i>Burkholderia</i> sp. BTM485	561	99	
	<i>Burkholderia</i> sp. BTM486	919	97	<i>B. phytofirmans</i>
	<i>Burkholderia</i> sp. BTM561	888	98	
	<i>Burkholderia</i> sp. BTM559	934	92	<i>B. graminis</i>
			92	<i>B. terricola</i>
			92	<i>B. phenoliruptrix</i>

Ao nível de 98% de similaridade foram formados 2 grupos principais (I e II) (Figura 7). No grupo I, o isolado BTM131 apresentou 99% de identidade nucleotídica com *B. metallica*. O isolados BTM27 apresentou 99% de identidade nucleotídica com *B. diffusa* e BTM43 apresentou 98% de identidade nucleotídica com *B. contaminans*.

No grupo II, o isolado BTM317 apresentou 99% de identidade nucleotídica com *B. caribensis* e BTM559 apresentou 98% de identidade com *B. graminis*. Ainda no grupo II, os isolados BTM485, BTM486 e BTM561 se posicionaram em um ramo isolado apresentando 100% de identidade nucleotídica com *B. phytofirmans*.

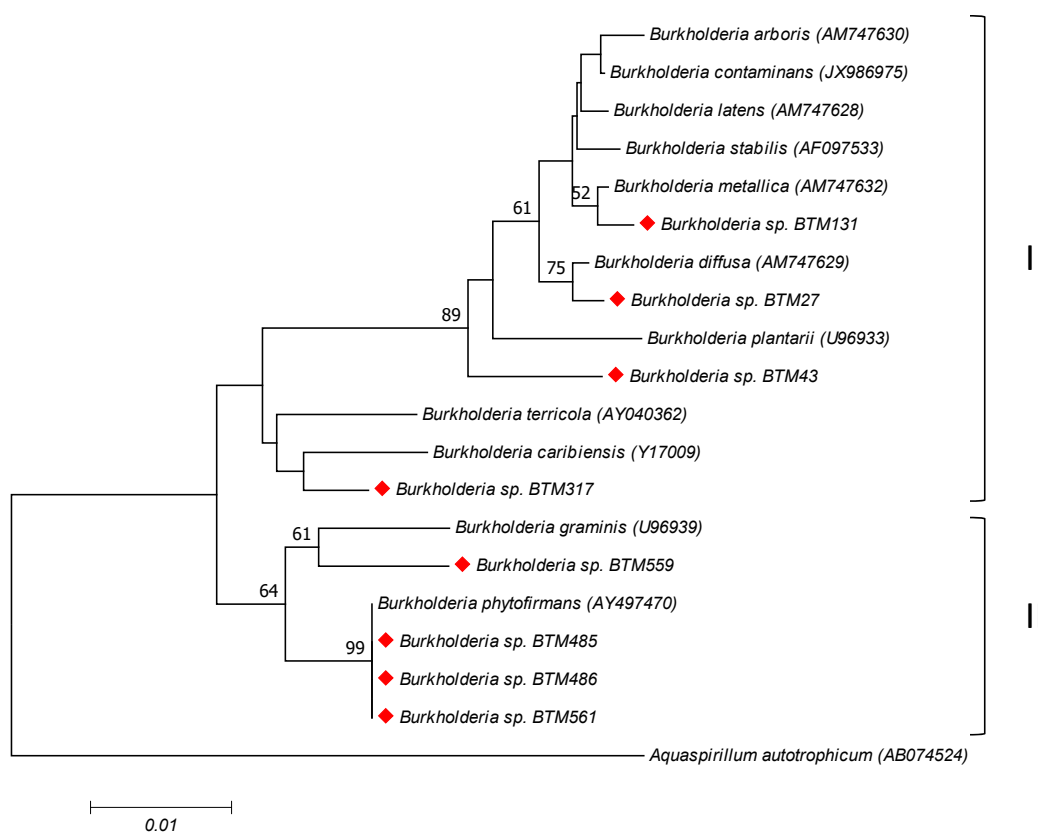


Figura 7: Relações evolutivas do isolados do gênero *Burkholderia*. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A análise envolveu 20 sequências de nucleotídeos. A porcentagem de repetições dos taxa associados agruparam em bootstrap (1000 repetições) são mostrados próximos dos ramos. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Kimura-2 parâmetros e estão nas unidades do número de substituições de base por site. Houve um total de 613 pares de base no conjunto de dados final.

Gênero *Bacillus* sp.

Foi construída uma árvore filogenética a partir do alinhamento múltiplo das sequências parciais gene do 16S rRNA de 22 isolados de *B. trimera* previamente classificados como *Bacillus* de acordo com o banco de dados RDP II (Tabela 10).

Ao nível de 97% de similaridade foram constituídos 3 grupos principais no posicionamento filogenético (Figura 8). O grupo I é composto pelos isolados BTM366, BTM 346, BTM26 e BTM23 e apresentaram 100% de identidade nucleotídica com seis espécies tipo (*B. toyonensis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. weihentephanensis*, *B. anthracis* e *B. thuringiensis*).

Tabela 10: Análise de similaridade da sequência parcial do 16S rRNA de 22 isolados de *Bacillus* sp. de *B. trimera* ao o banco de dados RDP II utilizando a ferramenta *Sequence Match*.

Grupo	Isolado	Pares de base	% de Similadridez (RDP)	Seq Match (RDP)
IA	<i>Bacillus</i> sp. BTM23	801	99 e 100, respectivamente	<i>B. toyonensis</i>
	<i>Bacillus</i> sp. BTM26	850		<i>B. thuringiensis</i>

				<i>B. cereus</i>
	<i>Bacillus sp. BTM183</i>	518	90	<i>B. simplex</i>
			89	<i>B. muralis</i>
				<i>B. huizhouensis</i>
	<i>Bacillus sp. BTM346</i>	746		<i>B. toyonensis</i>
	<i>Bacillus sp. BTM366</i>	764	100	<i>B. thuringiensis</i>
				<i>B. cereus</i>
				<i>B. toyonensis</i>
				<i>B. cereus</i>
	<i>Bacillus sp. BTM210</i>	547	99	<i>B. drentensis</i>
	<i>Bacillus sp. BTM375</i>	767		<i>B. vireti</i>
IB			98	<i>B. Bataviensis</i>
				<i>B. mesonae</i>
				<i>B. niacini</i>
			97	<i>B. ginsengisoli</i>
				<i>B. bataviensis</i>
	<i>Bacillus sp. BTM219</i>	665	100	<i>B. flexus</i>
			98	<i>B. megaterium</i>
				<i>B. aryabhatai</i>
	<i>Bacillus sp. BTM331</i>	645	100	<i>B. flexus</i>
				<i>B. megaterium</i>
IC	<i>Bacillus sp. BTM332</i>	757		<i>B. flexus</i>
	<i>Bacillus sp. BTM418</i>	734	100	<i>B. megaterium</i>
				<i>B. flexus</i>
				<i>B. megaterium</i>
			98	<i>B. aryabhatai</i>
				<i>B. invictae</i>
ID	<i>Bacillus sp. BTM264</i>	670	96	<i>B. sporothermodurans</i>
			90	<i>B. shackletonii</i>
	<i>Bacillus sp. BTM116</i>	670		<i>B. safensis</i>
	<i>Bacillus sp. BTM340</i>	972		<i>B. pumilus</i>
	<i>Bacillus sp. BTM388</i>	719	99	<i>B. invictae</i>
				<i>B. altitudinis</i>
	<i>Bacillus sp. BTM145</i>	582	100	<i>B. safensis</i>
				<i>B. pumilus</i>
				<i>B. invictae</i>
	<i>Bacillus sp. BTM146</i>	581	100	<i>B. safensis</i>
				<i>B. pumilus</i>
				<i>B. invictae</i>
II			98	<i>B. stratosphericus</i>
	<i>Bacillus sp. BTM148</i>	755	99	<i>B. invictae</i>
				<i>B. pumilus</i>
	<i>Bacillus sp. BTM182</i>	814	99	<i>B. pumilus</i>
	<i>Bacillus sp. BTM02</i>	768		<i>B. safensis</i>
	<i>Bacillus sp. BTM63</i>	768		<i>B. invictae</i>
				<i>B. invictae</i>
			98	<i>B. pumilus</i>
				<i>B. safensis</i>
				<i>B. invictae</i>
				<i>B. pumilus</i>
				<i>B. safensis</i>
III	<i>Bacillus sp. BTM50</i>	636	95	<i>B. acidiceler</i>
			96	<i>B. luciferensis</i>
			81	<i>B. simplex</i>

Neste grupo também está alocado o isolado BTM183 que apresentou 99% de identidade nucleotídica com *B. muralis* e *B. simplex*. Já o isolado BTM50 apresentou 99% de identidade nucleotídica com *B. acidiceler* e *B. luciferensis*.

O grupo II é composto por quatro isolados (BTM418, BTM332, BTM331 e BTM219). O isolado BTM264 apresentou 100% de identidade nucleotídica apenas com *Bacillus sporothermodurans*. O isolado BTM375 foi posicionado próximo à *B. fumarioli* com 99,8% de identidade nucleotídica. E o isolado BTM210 apresentou 100% de identidade nucleotídica com *B. vireti* e *B. drentensis*.

No grupo III, os isolados BTM63, BTM116, BTM145, BTM146, BTM148, BTM182, BTM340 e BTM388 foram posicionados no mesmo ramo com as espécies tipo *B. safensis*, *B. pumilus*, *B. invictae*.

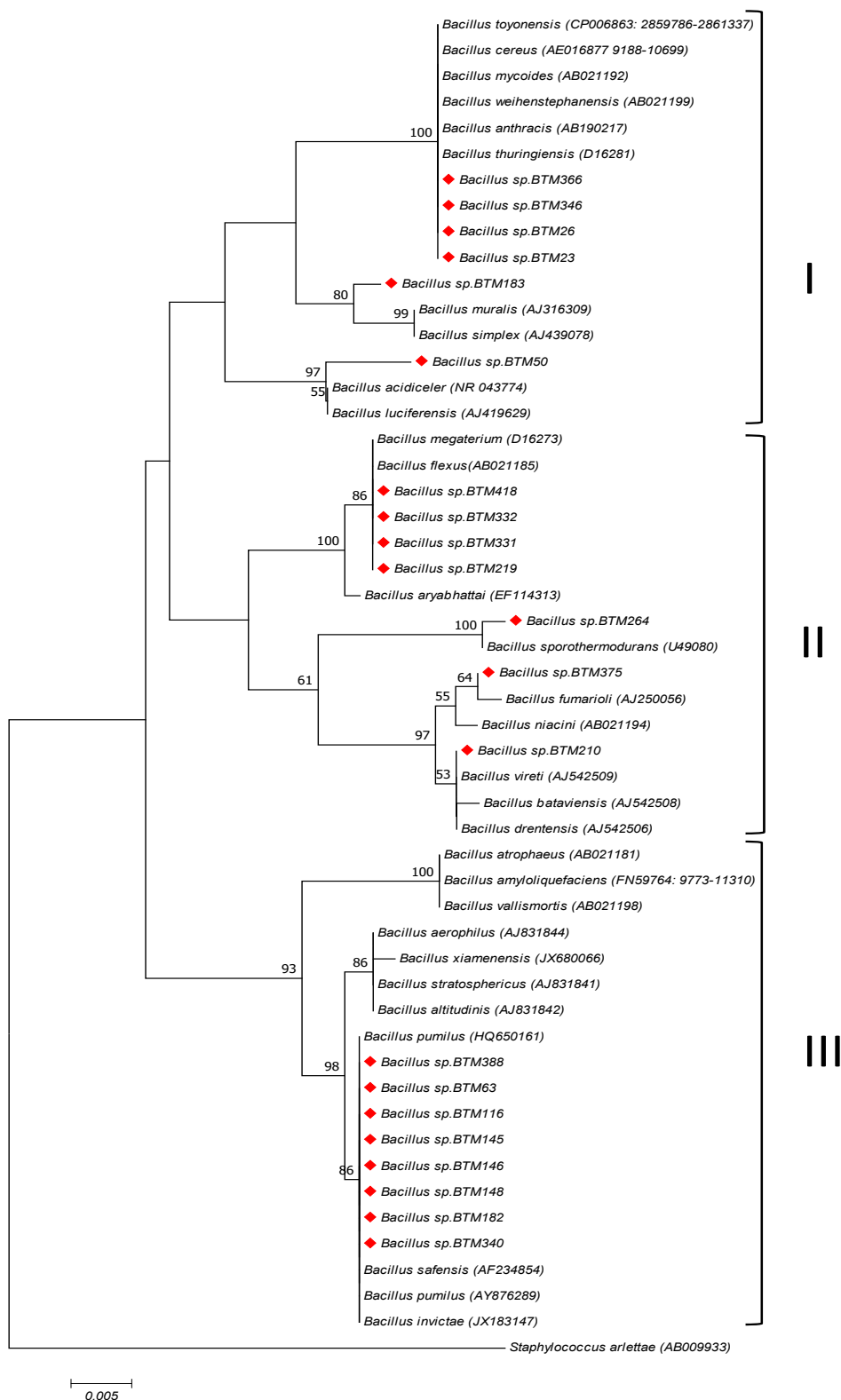


Figura 8: Relações evolutivas do isolados do gênero *Bacillus*. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A análise envolveu 53 sequências de nucleotídeos. A porcentagem de repetições dos taxa associados agruparam em bootstrap (1000 repetições) são mostrados próximos dos ramos. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Kimura-2 parâmetros e estão nas unidades do número de substituições de base por site. Houve um total de 527 pares de base no conjunto de dados final.

Gênero *Methylobacterium*

Foi construída uma árvore filogenética a partir do alinhamento múltiplo da sequência parcial do 16S rRNA de 9 isolados de *B. trimera* previamente classificados como *Methylobacterium*, com as sequências do 16S rRNA das espécies tipo mais próximas encontradas no banco de dados RDP II (Tabela 11).

Tabela 11: Análise de similaridade da sequência parcial do 16S rRNA de 9 isolados de *Methylobacterium* sp. de *B. trimera* ao o banco de dados RDP II utilizando a ferramenta *Sequence Match*.

Grupo	Isolado	Pares de Base	% de Similaridade (RDP)	Seq Match (RDP)
IA	<i>Methylobacterium</i> sp. BTM62	578	99	<i>M. radiotolerans</i>
				<i>M. oryzae</i>
				<i>M. tardum</i>
IB	<i>Methylobacterium</i> sp. BTM75	653	99	<i>M. phyllostachyos</i>
			96	<i>M. oryzae</i>
			96	<i>M. longum</i>
IC	<i>Methylobacterium</i> sp. BTM177	650	98	<i>M. brachiatum</i>
			98	<i>M. phyllosphaerae</i>
II	<i>Methylobacterium</i> sp. BTM144	756	95	<i>M. komagatae</i>
			90	<i>M. persicinum</i>
II	<i>Methylobacterium</i> sp. BTM157	661	95	<i>M. aerolatum</i>
II	<i>Methylobacterium</i> sp. BTM541	746	91	<i>M. fujisawaense</i>
II	<i>Methylobacterium</i> sp. BTM101	746	95	<i>M. komagatae</i>
			90	<i>M. persicinum</i>
II	<i>Methylobacterium</i> sp. BTM535	873	93	<i>M. aquaticum</i>
			93	<i>M. platani</i>
II	<i>Methylobacterium</i> sp. BTM78	689	99	<i>M. aquaticum</i>
			97	<i>M. tarhaniae</i>

Ao nível de 93% de similaridade foram constituídos 3 grupos principais (Figura 9). No grupo I foram posicionados os isolados BTM62, BTM177, BTM75 e BTM157. O isolado BTM62 apresentou 100% de identidade nucleotídica com as espécies *M. oryzae*, *M. tardum* e *M. radiotolerans*. O isolado BTM177 apresentou 100% de identidade apenas com *M. brachiatum*. O isolado BTM75 apresentou 100% de identidade com *M. phyllostachyos* e *M. longum* e o isolado BTM157 foi posicionado próximo à *M. aerolatum* com 99% de identidade nucleotídica.

No grupo II os isolados BTM101 e BTM144 (99% de identidade nucleotídica) e BTM541 (100% de identidade) foram posicionados próximos à *M. komagatae*. No grupo III o isolado BTM535 apresentou 99% de identidade com *M. plantani* e o isolado BTM78 foi identificado como *M. aquaticum* com 100% de identidade nucleotídica.

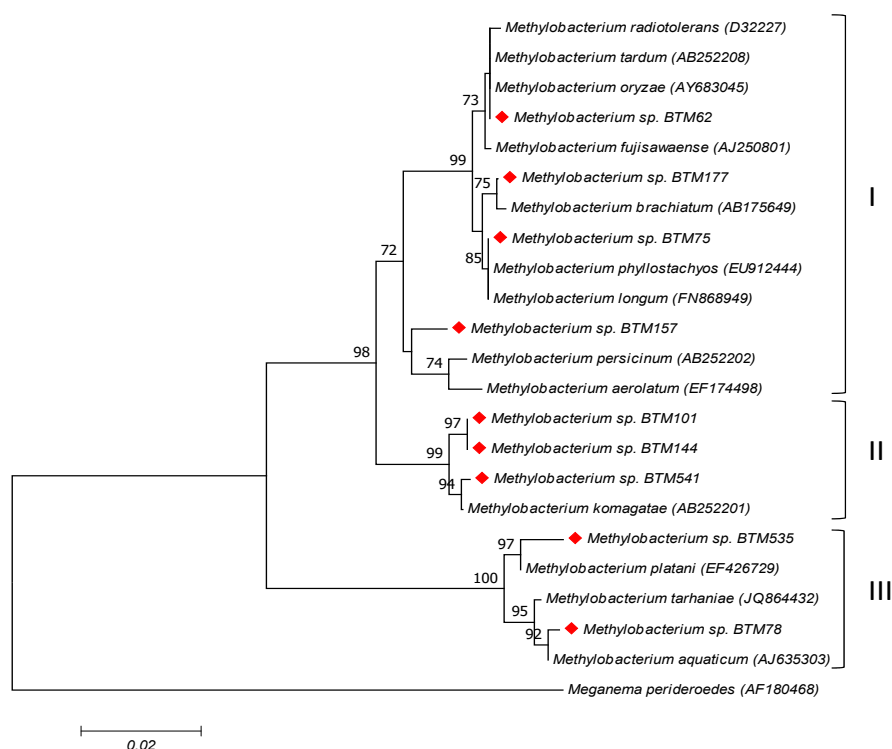


Figura 9: Relações evolutivas dos isolados do gênero *Methylobacterium*. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A análise envolveu 23 sequências de nucleotídeos. A porcentagem de repetições dos taxa associados agruparam em bootstrap (1000 repetições) são mostrados próximos dos ramos. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Jukes-Cantor e estão nas unidades do número de substituições de base por site. Houve um total de 589 pares de base no conjunto de dados final.

Gênero *Pseudomonas*

Foi construída uma árvore filogenética a partir do alinhamento do gene 16S RNAr de 6 sequências de isolados da coleção BTM, previamente classificados como *Pseudomonas* a partir do banco de dados RDP II, em conjunto com suas sequências tipo mais proximamente relacionadas (Tabela 12). As sequências dos isolados foram separados em dois principais grupos filogenéticos a 93% de similaridade (Figura 10).

No grupo I o isolado BTM213 foi identificado como *P. granadensis* e BTM519 como *P. vancouverensis*. Já BTM497 apresentou 99% de identidade nucleotídica com *P. migulae* e *P. umsongensis*. O isolado BTM484 apresentou 99% de similaridade com *P. corrugata* e *P. kilonensis*.

Tabela 12: Análise de similaridade da sequência parcial do 16S rRNA de 6 isolados de *Pseudomonas* sp. de *B. trimera* ao o banco de dados RDP II utilizando a ferramenta *Sequence Match*.

Grupo	Isolado	Pares de Base	% de Similaridade (RDP)	Seq Match (RDP)
I	<i>Pseudomonas</i> sp. BTM213	687	<i>P. granadensis</i>	97
	<i>Pseudomonas</i> sp. BTM497	703	<i>P. migulae</i>	99

	<i>Pseudomonas sp. BTM519</i>	824	<i>P. vancouverensis</i>	100
			<i>P. reinekei</i>	99
			<i>P. granadensis</i>	97
II	<i>Pseudomonas sp. BTM336</i>	662	<i>P. graminis</i>	94
III	<i>Pseudomonas sp. BTM484</i>	957	<i>P. corrugata</i>	97
			<i>P. kilonensis</i>	97
IV	<i>Pseudomonas sp. BTM481</i>	692	<i>P. aeruginosa</i>	94

O isolado BTM519 foi identificado como *Pseudomonas vancouverensis*, assim como BTM213 foi identificada como *Pseudomonas granadensis* e o isolado BTM336 apresentou 99% de identidade nucleotídica com *P. graminis*. No grupo II está o isolado BTM481 que apresentou 99,2% de identidade nucleotídica com *Pseudomonas aeruginosa*.

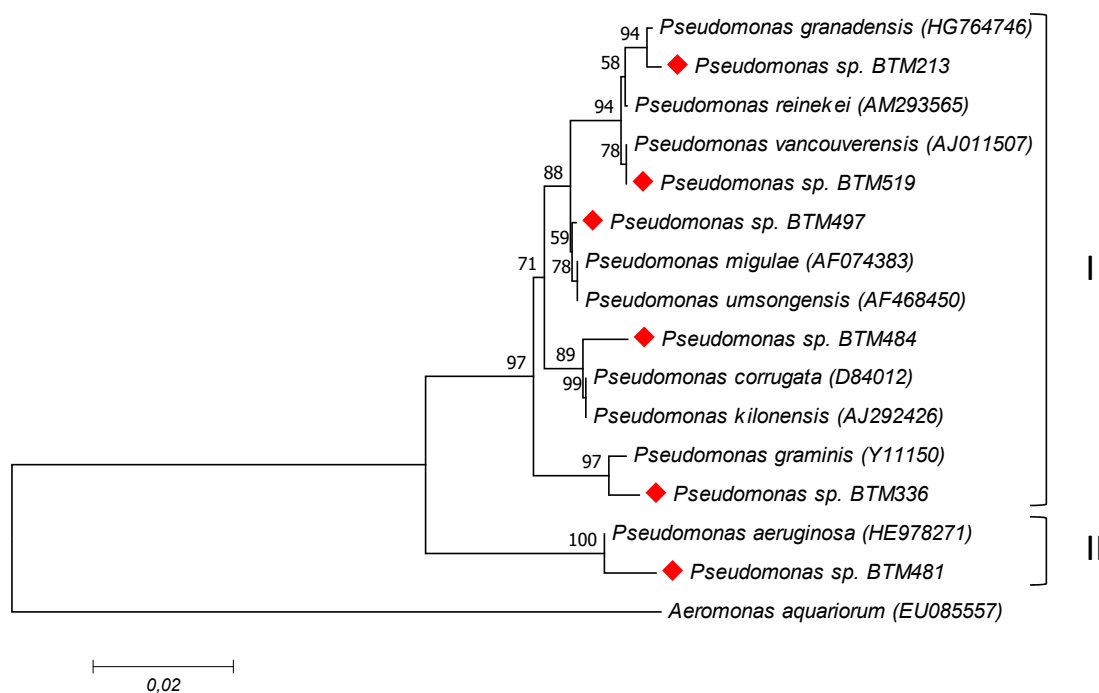


Figura 10: Relações evolutivas dos isolados do gênero *Pseudomonas*. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A análise envolveu 24 sequências de nucleotídeos. A porcentagem de repetições das taxas associadas agrupadas em bootstrap (1000 repetições) são mostradas próximas dos ramos. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Kimura-2 parâmetros e estão nas unidades do número de substituições de base por site. Houve um total de 747 pares de base no conjunto de dados final.

O sequenciamento parcial do gene 16S foi suficiente neste trabalho para identificação dos isolados à nível de gênero. Mesmo com o posicionamento filogenético através da construção das árvores filogenéticas e levando em consideração o melhor modelo evolutivo para esta análise, não foi possível fazer a especiação de vários isolados.

Embora o sequenciamento do gene 16S seja altamente útil na classificação bacteriana, ele possui baixo poder filogenético para discriminação a nível de espécie e um poder discriminatório fraco para alguns gêneros. Como exemplo pode-se citar o gênero *Bacillus*, as espécies tipo *B. globisporus* e *B. psychrophilus* possuem similaridade acima de 99,5% dos seus genes 16S rRNA não sendo possível a identificação destas espécies (JANDA; ABBOTT, 2007).

Bioprospecção dos isolados de B. trimera

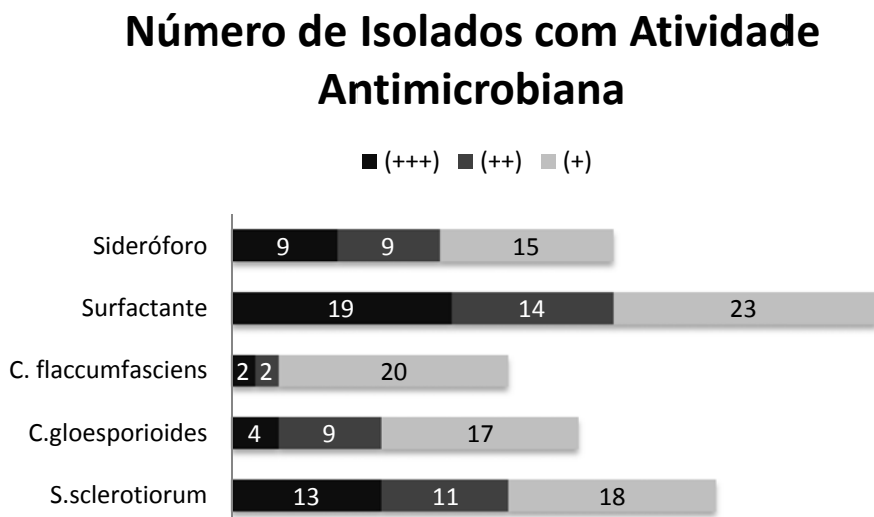
Os 182 isolados da coleção BTM foram triados quanto a atividade antagonista e pela capacidade de produção de sideróforos e surfactantes, substâncias com potencial para atividade antimicrobiana.

Com relação a partes da planta, as quantidades de isolados encontrados foram semelhantes entre elas, 57 isolados positivos na rizosfera e 56 isolados na endosfera (tabela 13) que apresentaram alta, média e baixa produção dos testes realizados. O número de isolados e o nível de produção de antimicrobianos estão representados na figura 11.

Tabela 13: Número de isolados positivos em diferentes níveis por parte da planta analisada.

	Sideróforo	Surfactante	<i>S.sclerotiorum</i>	<i>C.gloesporioides</i>	<i>C.flaccumfaciens</i>
Endosfera	16	24	20	14	16
Rizosfera	17	32	22	16	8
Total	33	56	42	30	24

Figura 11: Número de isolados representados para cada nível de produção dos diferentes testes bioquímicos (Sideróforo, surfactante e antagonismo). Antagonismo apresentado foi realizado contra *C. flaccumfasciens*, *C. gloesporioides* e *S. sclerotiorum*. O antagonismo realizado contra *X. axonopodis* somente o isolado BTM417 foi positivo (índice de 3,1 / +++) e não está representado no gráfico.



Atividade Antagonista

Os 182 isolados da rizosfera e endosfera de *B. trimera* foram avaliados quanto a atividade antagonista contra dois fungos fitopatógenos (*S. sclerotiorum* e *C. gloesporioides*) e contra duas bactérias fitopatogênicas (*C. flaccumfasciens* e *X. axonopodis*). Estes fitopatógenos são responsáveis por causar danos a culturas agrícolas de importância econômico. Para a identificação de isolados antagonistas contra fungos foi realizado o ensaio de cultura pareada, sendo a inibição do fungo classificada como índice de inibição alto, médio e baixo. A inibição da bactéria foi avaliada pela presença de um halo de inibição, sendo também considerada alta (>3,0), média (>2) e baixa (>1).

No teste de antagonismo com *S. sclerotiorum*, 42 isolados inibiram o crescimento do fitopatógeno sendo que, 31% apresentaram alta inibição (+++), 24% inibição mediana (++) e 43% baixa inibição (+). No teste contra *C. gloesporioides*, 29 isolados inibiram o crescimento do fitopatógeno, e destes 13% apresentaram alta inibição (+++), 31% inibição mediana e 55% baixa inibição (+).

No teste de antagonismo contra a bactéria fitopatogênica *C. flaccumfasciens*, 23 isolados inibiram o crescimento da bactéria. Os isolados BTM77 e BTM182 apresentaram alta inibição (3,1 e 3,0, respectivamente). Os isolados BTM45 e BTM529 apresentaram inibição mediana (2,1 e 2,0, respectivamente) e 82% do total

de isolados positivos apresentaram baixa inibição. No teste de antagonismo contra *X. axonopodis* apenas o isolado BTM417 apresentou inibição (3,11) da bactéria fitopatogênica.

Sideróforos

A produção de sideróforos foi avaliada por colorimetria, sendo o nível de produção considerado alto (>500 μM), médio (>100 μM) e baixo (até 100 μM), conforme a curva de calibração de EDTA (Anexo). Entre os 182 isolados testados, 33 produziram sideróforos e destes, 27% apresentaram alta, 27% média e 45% baixa produção (Tabela 14).

Tabela 14: Principais isolados que apresentaram maior produção de Sideróforos. N.C: Não classificado. Todos os isolados com todos os níveis de produção de sideróforos estão emanexo.

Isolado	Gênero	Sideróforo [$\mu\text{M}/\text{mL}$]	Isolado	Gênero	Sideróforo [$\mu\text{M}/\text{mL}$]
211	N. C	752	291	<i>Streptomyces</i>	553
327	<i>Xanthomonas</i>	730	47	<i>Rhizobium</i>	517
323	<i>Variovorax</i>	723	553	N. C	484
317	<i>Burkholderia</i>	654	109	<i>Bacillus</i>	439
340	<i>Bacillus</i>	623	549	N. C	430
343	<i>Tardiphaga</i>	623	120	N. C	398
287	N. C	590	336	<i>Pseudomonas</i>	392
210	<i>Bacillus</i>	565	260	<i>Luteibacter</i>	304

Os isolados identificados mais produtores foram BTM327 (730 μM), BTM323 (723 μM) e BTM317 (654 μM). Foi realizado o posicionamento filogenético destes isolados e inferiu que os isolados são dos gêneros *Xanthomonas* (BTM327) e *Variovax* (BTM323) e *Burkholderia* (BTM317) com 100% de possibilidade de identificação do gênero de acordo com o banco de dados RDP. Contudo, os demais isolados também apresentaram elevada produção de sideróforos. Dentre os 16 isolados mais produtores, 14 foram isolados da coleta de Ponta Grossa. Ainda dentre estes 16 isolados mais produtores, 11 foram classificados e foram identificados como pertencentes a 10 gêneros, indicando que dentro desta comunidade não foi identificado nenhum gênero predominante produzindo sideróforos.

A produção de sideróforos é um mecanismo indireto importante na promoção do crescimento vegetal de plantas (AHMED; HOLMSTRÖM, 2014). Diversos gêneros bacterianos são relatados como bons produtores de sideróforos. Estes quelantes de íons são produzidos por microrganismos em baixa concentrações principalmente do íon ferro. Estas moléculas atuam indiretamente na promoção do crescimento vegetal controlando a disponibilidade e privando os patógenos do micronutriente ferro (NEILANDS, 1995). Em um trabalho desenvolvido por Tortora *et al*, (2011), demonstram que, sob condições de limitação de ferro, diferentes estirpes de *Azospirillum brasilense* produziram sideróforos e que estas moléculas mostraram atividade antifúngica *in vitro* contra *C. acutatum*, através da redução dos sintomas de antracnose em plantas de morango (TORTORA et al., 2011).

Biossurfactante

Os biossurfactantes desempenham um papel importante em diversas áreas industriais. Considera-se que os biossurfactantes sejam uma alternativa aos surfactantes químicos devido às suas propriedades biodegradáveis e alta especificidade. Para a triagem quanto a produção de surfactantes, 54 isolados apresentaram diferentes níveis de produção de surfactantes. Dentre os positivos, 18 isolados apresentaram alta produção (Tabela 15), 13 isolados apresentaram produção mediana e 23 isolados apresentaram baixa produção.

Os gêneros encontrados produzindo altos níveis surfactantes foram *Bacillus* (3), *Paenibacillus* (4), *Streptomyces* (2), *Burkholderia* (1), *Rhizobium* (1) e *Methylobacterium* (1). É possível encontrar inúmeros trabalhos com estes gêneros bacterianos produzindo biossurfactantes os principais são os gêneros *Bacillus* e *Streptomyces*.

Tabela 15: Principais isolados que apresentaram alta produção (+++) de biossurfactantes. N.C: Não classificado. Os demais isolados com diferentes níveis de produção estão em anexo.

Isolado	Gênero	Surfactante	Isolado	Gênero	Biossurfactante
2	<i>Burkholderia</i>	+++	300	N.C	+++
47	<i>Rhizobium</i>	+++	450	<i>Streptomyces</i>	+++
109	<i>Bacillus</i>	+++	454	<i>Paenibacillus</i>	+++
116	<i>Bacillus</i>	+++	523	<i>Paenibacillus</i>	+++
119	<i>Paenibacillus</i>	+++	530	N.C	+++

120	<i>N.C</i>	+++	535	<i>Methylobacterium</i>	+++
210	<i>Bacillus</i>	+++	540	<i>Paenibacillus</i>	+++
211	<i>N.C</i>	+++	543	<i>N.C</i>	+++
299	<i>N.C</i>	+++	550	<i>Streptomyces</i>	+++

Com a finalidade de identificar os bons isolados com alto potencial biotecnológico, estes foram classificados de acordo com seu potencial biotecnológico através de uma somatória das notas atribuídas aos isolados para cada atividade antimicrobiana analisada (Tabela 16). 129 isolados sequenciados, 14 isolados apresentaram alto potencial biotecnológico (somatória de 6 a 9) representado por bactérias dos gêneros *Streptomyces* (4), *Bacillus* (3), *Burkholderia* (2), *Rhizobium* (2), *Rhodococcus* (1), *Paenibacillus* (1) e *Kitasatospora* (1). Estes isolados apresentaram pelo menos 3 das 6 características analisadas. 17 isolados apresentaram potencial biotecnológico classificado como médio (somatória 4 e 5) e 15 isolados apresentaram potencial biotecnológico classificado como baixo (somatória 3).

Tabela 16: Somatória das notas atribuídas à cada atividade de acordo com o potencial biotecnológico dos isolados.

	Isolado	Gênero	Surfactante	Sideróforo	Atividade Antagônica				Somatória	Potencial Biotecnológico
					<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>Colletotrichum gloesporioides</i>	<i>Xanthomonas axonopodis</i>	<i>Curtobacterium flacunfaciens</i>		
Endofíticos	291	<i>Streptomyces</i>	0	3	3	2	0	0	8	Alto
	529	<i>Paenibacillus</i>	2	0	2	1	0	2	7	
	2	<i>Bacillus</i>	3	0	2	1	0	0	6	
	43	<i>Burkholderia</i>	0	0	3	3	0	0	6	
	47	<i>Rhizobium</i>	3	3	0	0	0	0	6	
	146	<i>Bacillus</i>	2	0	3	0	0	1	6	
	476	<i>Rhizobium</i>	0	0	3	3	0	0	6	
	109	<i>Bacillus</i>	3	2	0	0	0	0	5	Médio
	120	<i>Streptomyces</i>	3	0	1	1	0	0	5	
	148	<i>Bacillus</i>	0	0	3	1	0	1	5	
	119	<i>Bacillus</i>	3	1	0	0	0	0	4	
	323	<i>Variovorax</i>	0	3	0	0	0	1	4	
	327	<i>Xanthomonas</i>	0	3	1	0	0	0	4	
	385	<i>Rhizobium</i>	2	1	0	0	0	1	4	
	15	<i>Streptomyces</i>	0	1	1	1	0	0	3	Baixo
	77	<i>Micrococcus</i>	0	0	0	0	0	3	3	
	116	<i>Bacillus</i>	3	0	0	0	0	0	3	
	336	<i>Pseudomonas</i>	0	2	0	0	0	1	3	
	340	<i>Bacillus</i>	0	3	0	0	0	0	3	
453	<i>Streptomyces</i>	0	0	2	1	0	0	3		
454	<i>Paenibacillus</i>	3	0	0	0	0	0	3		

Continua...

Tabela 16: Continuação

Esféri	299	<i>Streptomyces</i>	3	1	3	2	0	0	9	Alto
	27	<i>Burkholderia</i>	1	1	3	3	0	0	8	

300	<i>Streptomyces</i>	3	0	3	2	0	0	8	
210	<i>Bacillus</i>	3	3	0	0	0	0	6	
287	<i>Streptomyces</i>	1	3	1	1	0	0	6	
307	<i>Rhodococcus</i>	0	0	3	3	0	0	6	
417	<i>Kitasatospora</i>	0	1	1	1	3	0	6	
182	<i>Bacillus</i>	2	0	0	0	0	3	5	Médio
131	<i>Burkholderia</i>	0	0	2	1	0	1	4	
288	<i>Streptomyces</i>	0	0	2	2	0	0	4	
380	<i>Streptomyces</i>	2	1	0	0	0	1	4	
447	<i>Kitasatospora</i>	0	0	2	2	0	0	4	
449	<i>Streptomyces</i>	0	0	2	2	0	0	4	
450	<i>Streptomyces</i>	3	0	0	1	0	0	4	
483	<i>Chromobacterium</i>	1	0	3	0	0	0	4	
530	<i>Streptomyces</i>	3	0	1	0	0	0	4	
535	<i>Methylobacterium</i>	3	0	0	1	0	0	4	
311	<i>Rhodococcus</i>	0	0	3	0	0	0	3	Baixo
317	<i>Burkholderia</i>	0	3	0	0	0	0	3	
393	<i>Arthrobacter</i>	2	1	0	0	0	0	3	
512	<i>Luteibacter</i>	2	0	1	0	0	0	3	
523	<i>Paenibacillus</i>	3	0	0	0	0	0	3	
540	<i>Paenibacillus</i>	3	0	0	0	0	0	3	
550	<i>Streptomyces</i>	3	0	0	0	0	0	3	
553	<i>Streptomyces</i>	0	2	1	0	0	0	3	

Atividades classificadas como alta (+++) foi atribuído nota 3, classificados como médio (++) foi atribuído nota 2 e baixo (+) foi atribuído nota 1 para cada atividade analisada

CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho demonstram que a comunidade bacteriana da rizosfera e endorrizosfera associada à planta medicinal *B. trimera* é diversa tendo em vista os 38 gêneros bacterianos encontrados e os resultados da avaliação do potencial biotecnológico isolados sugerem que esta comunidade possui alto potencial antimicrobiano com possíveis aplicações biotecnológicas.

Diversos fatores podem influenciar na composição da comunidade microbiana associadas a plantas, inclusive a espécie vegetal, no entanto, neste trabalho dos 38 gêneros encontrados em ambas as localidades, apenas 28% gêneros foram encontrados nas duas localidades, indicando que os fatores ambientais exercem forte influência na comunidade microbiana.

Os gêneros encontrados em maior abundância foram *Bacillus*, *Streptomyces*, *Methylobacterium*, *Burkholderia* e *Pseudomonas*, em diversos destes isolados foi constatado elevada produção de compostos com potencial biotecnológico para produção de sideróforos, biossurfactantes e agentes antimicrobianos.

A elevada diversidade de bactérias encontradas em associação com *B. trimera* indica que as plantas medicinais brasileiras utilizadas na medicina popular podem abrigar uma rica biodiversidade de bactérias e estas plantas são fontes únicas de novas espécies com potencial promissor para produção de compostos biologicamente ativos. Adicionalmente, não foram encontrados estudos reportando a composição bacteriana associada à planta medicinal *B. trimera*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, E.; HOLMSTRÖM, S. J. M. Siderophores in environmental research: Roles and applications. **Microbial Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 196–208, 2014.
- BERENDSEN, R. L. The rhizosphere microbiome and plant health. **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 8, 2012.
- BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World J Microbiol Biotechnol**, p. 1327–1350, 2012.
- SUZUKI, M. T.; STEPHEN J. G. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. **Applied and environmental microbiology**, 62.2: 625-630, 1996.
- BULGARELLI, D.; SCHLAEPPI, K.; SPAEPEN, S.; LOREN VAN THEMAAT, E. VER; SCHULZE-LEFERT, P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annual review of plant biology**, v. 64, p. 807–38, 2013.
- BULL, A. ET AL. **Microbial diversity and bioprospecting**. 2004.
- CARVALHO, C. R.; GONÇALVES, V. N.; PEREIRA, C. B.; et al. The diversity, antimicrobial and anticancer activity of endophytic fungi associated with the medicinal plant *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae) from the Brazilian savannah. **Symbiosis**, v. 57, n. 2, p. 95–107, 2012.
- DAVIS, K. E. R.; JOSEPH, S. J.; PETER, H.; JANSSEN, P. H. Effects of Growth Medium , Inoculum Size , and Incubation Time on Culturability and Isolation of Soil Bacteria Effects of Growth Medium , Inoculum Size , and Incubation Time on Culturability and Isolation of Soil Bacteria. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 2, p. 826–834, 2005.
- EMBRAPA. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. **Embrapa Informação Tecnológica**, p. 370, 2009.
- CANTERI, M. G; FILHO, J. S. V.; VIEIRA C. G.G UNIVERSIDADE, C.; GROSSA, P. SASM - Agri : Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scoft - Knott , Tukey e ... , **Revista Brasileira de Agrocomputação**, n. February 2016.
- GRIFFITHS, B. S.; PHILIPPOT, L. Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community. **FEMS Microbiol Reviews**, v. 37, p. 112–129, 2013.
- HALLMANN, J.; BERG, G.; SCHULZ, B. Isolation Procedures for Endophytic Microorganisms. **Soil Biology**, v. 9, p. 299–319, 2006.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 10, p. 895–914, 1997.
- HARDOIM, P. R.; HARDOIM, C. C. P.; OVERBEEK, L. S. VAN; ELSAS, J. D. VAN. Dynamics of Seed-Borne Rice Endophytes on Early Plant Growth Stages. **Plos One**, v. 7, n. 2, 2012.
- HARDOIM, P. R.; OVERBEEK, L. S. VAN; ELSAS, J. D. VAN. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 10, p. 463–471, 2008.

- HYVÄRINEN, A. M.; MARTIKAINEN, P. J.; NEVALAINEN, A. I. Suitability of poor medium in counting total viable airborne bacteria. **Grana**, v. 30, n. 2, p. 414–417, 1991.
- JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p. 2761–2764, 2007.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. *Molecular Biology and Evolution*. 2015.
- LEWINSOHN, T. Avaliação do estado do conhecimento da biodiversidade brasileira. **v. II. Vol. 15. Ministério do Meio Ambiente**, 2006.
- MA, L.; CAO, Y. H.; CHENG, M. H.; et al. Phylogenetic diversity of bacterial endophytes of *Panax notoginseng* with antagonistic characteristics towards pathogens of root-rot disease complex. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 103, n. 2, p. 299–312, 2013.
- MANDAL, A. K.; YADAV, K. K.; SEN, I. K.; et al. Partial characterization and flocculating behavior of an exopolysaccharide produced in nutrient-poor medium by a facultative oligotroph *Klebsiella* sp. PB12. **Seibutsu-kogaku Kaishi**, v. 115, n. 1, p. 76–81, 2013. Elsevier Ltd.
- MEYER, S. E. DE; BEUF, K. DE; VEKEMAN, B.; WILLEMS, A. A large diversity of non-rhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 83, n. January, p. 1–11, 2015.
- NAZ, I.; MIRZA, M.; BANO, A. Molecular Characterization of Rhizosphere Bacterial Communities Associated With Wheat (*Triticum Aestivum* L.) Cultivars At. **JAPS, Journal of Animal and Plant**, v. 24, n. 4, p. 1123–1134, 2014.
- NCBI, N. C. FOR B. I. (NCBI). B. National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information.
- NEILANDS, J. B. Siderophores : Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds Siderophores : Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 45, p. 26723–26726, 1995.
- PALANIAPPAN, P.; CHAUHAN, P. S.; SARAVANAN, V. S.; ANANDHAM, R.; SA, T. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacterial isolates from root nodule of *Lespedeza* sp. **Biology and Fertility of Soils**, v. 46, n. 8, p. 807–816, 2010.
- PARTE, A. C. LPSN—list of prokaryotic names with standing in nomenclature. 2013.
- PHILIPPOT, L.; RAAIJMAKERS, J. M.; LEMANCEAU, P.; PUTTEN, W. H. VAN DER. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 11, p. 789–799, 2013. Nature Publishing Group.
- PISARSKA, K. .; PIETR, S. J. Isolation and partial characterization of culturable endophytic *Arthrobacter* spp. from leaves of maize (*Zea mays* L.). **Communications in agricultural and applied biological sciences**, v. v. 77, , 2011.
- PUKALL, R.; LAPIDUS, A.; GLAVINA DEL RIO, T.; et al. Complete genome sequence of *Conexibacter woesei* type strain (ID131577T). **Standards in Genomic**

Sciences, v. 2, n. 2, p. 212–219, 2010.

QI, X.; WANG, E.; XING, M.; ZHAO, W.; CHEN, X. Rhizosphere and non-rhizosphere bacterial community composition of the wild medicinal plant *Rumex patientia*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 2257–2265, 2012.

RAO, H. C. Y.; RAKSHITH, D.; SATISH, S. Antimicrobial properties of endophytic actinomycetes isolated from *Combretum latifolium* Blume, a medicinal shrub from Western Ghats of India. **Frontiers in Biology**, v. 10, n. 6, p. 528–536, 2015.

RASCHE, F.; VELVIS, H.; ZACHOW, C.; et al. Impact of transgenic potatoes expressing anti-bacterial agents on bacterial endophytes is comparable with the effects of plant genotype, soil type and pathogen infection. **Journal of Applied Ecology**, v. 43, n. 3, p. 555–566, 2006.

RATNA SULISTIYANI, T.; LISDIYANTI, P.; LESTARI, Y. Population and Diversity of Endophytic Bacteria Associated with Medicinal Plant *Curcuma zedoaria*. **Microbiology Indonesia**, v. 8, n. 2, p. 65–72, 2014.

REASONER, D. J.; BLANNON, J. C.; GELDREICH, E. E. Rapid seven-hour fecal coliform test. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 229–236, 1979.

ROMÁN-PONCE, B.; WANG, D.; SOLEDAD VÁSQUEZ-MURRIETA, M.; et al. *Kocuria arsenatis* sp. Nov., An arsenic-resistant endophytic actinobacterium associated with *Prosopis laegivata* grown on high-arsenic-polluted mine tailing. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 1027–1033, 2016.

ROMEIRO, R. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa, UFV, 2001.

SAFRONOVA, V. I.; KUZNETSOVA, I. G.; SAZANOVA, A. L.; et al. Extra-slow-growing *Tardiphaga* strains isolated from nodules of *Vavilovia formosa* (Stev.) Fed. **Archives of Microbiology**, v. 197, n. 7, p. 889–898, 2015. Springer Berlin Heidelberg.

SALAM, N.; KHIEU, T.-N.; LIU, M.-J.; et al. Endophytic Actinobacteria Associated with *Dracaena cochinchinensis* Lour.: Isolation, Diversity, and Their Cytotoxic Activities. **BioMed research international**, v. 2017, p. 1308563, 2017.

SCHULZ, B.; WANKE, U.; DRAEGER, S.; AUST, H. J. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. **Mycological Research**, v. 97, n. 12, p. 1447–1450, 1993. British Mycological Society.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, v. 160, n. 1, p. 47–56, 1987.

SERRAT, B. M.; KRIEGER, K. L.; MOTTA, A. C. V. **Considerações sobre interpretação de análise de solos**. 2006.

SILVA, F. C. D. S. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. **Embrapa Informação Tecnológica**, v. Rio de Jan, 1999.

SINGH, J. S.; PANDEY, V. C.; SINGH, D. P. Agriculture , Ecosystems and Environment Efficient soil microorganisms : A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. **“Agriculture, Ecosystems and**

Environment,” v. 140, n. 3–4, p. 339–353, 2011. Elsevier B.V.

STROBEL, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 6, p. 535–544, 2003.

SUN, H.; HE, Y.; XIAO, Q.; YE, R.; TIAN, Y. Isolation, characterization, and antimicrobial activity of endophytic bacteria from *Polygonum cuspidatum*. **African Journal of Microbiology Research**, p. 1496–1504, 2013.

TORTORA, M. L.; DÍAZ-RICCI, J. C.; PEDRAZA, R. O. *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. **Archives of Microbiology**, v. 193, n. 4, p. 275–286, 2011.

VELÁZQUEZ, E.; ROJAS, M.; LORITE, M. J.; et al. Genetic diversity of endophytic bacteria which could be find in the apoplastic sap of the medullary parenchym of the stem of healthy sugarcane plants. **Journal of Basic Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 118–124, 2008.

VENDAN, R. T.; YU, Y. J.; LEE, S. H.; RHEE, Y. H. Diversity of endophytic bacteria in ginseng and their potential for plant growth promotion. **Journal of Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 559–565, 2010.

WANG, H. F.; LI, L.; ZHANG, Y. G.; et al. *Arthrobacter endophyticus* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from root of *Salsola affinis* C. A. Mey. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 2154–2160, 2015.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETTIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697–703, 1991.

WITZELL, J.; MARTÍN, J. A. *Advances in Endophytic Research*. 2014.

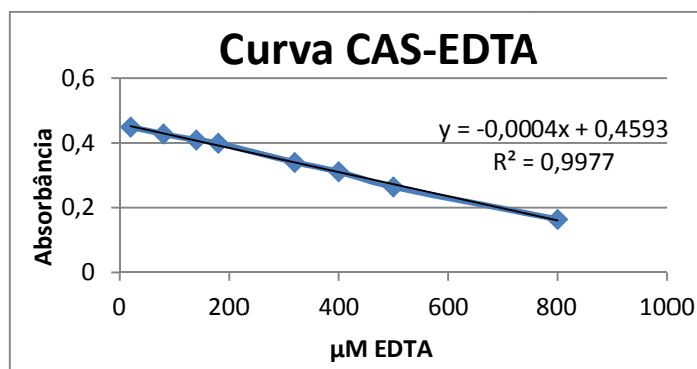
YOUSSEF, N. H.; DUNCAN, K. E.; NAGLE, D. P.; et al. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, n. 3, p. 339–347, 2004.

ANEXOS

Anexo 1: Sugestão de parâmetros gerais médios para a interpretação preliminar de resultados de análises dos solos.

NÍVEIS NO SOLO	DETERMINAÇÕES							
	pH em CaCl ₂	pH SMP	Cátions trocáveis					C
			Al ⁺³	Ca ⁺²	Mg ⁺²	K ⁺	T	
			cmol _c /dm ³					
Muito baixo	< 5,0	< 5,5	< 0,3	< 1	< 0,3	< 0,10	-	< 4
Baixo	5,0-5,4	5,5-6,0	0,3-0,5	1 - 2	0,3-0,4	0,10-0,15	< 5	4 - 8
Médio	5,4-5,8	6,0-6,5	0,5-1,0	2 - 4	0,4-0,8	0,15-0,30	5 - 10	8 - 14
Alto	5,8-6,2	6,5-7,0	> 1,0	4 - 6	0,8-1,0	0,30-0,40	10 - 15	14 - 20
Muito alto	> 6,2	> 7,0	-	> 6	> 1,0	> 0,40	> 15	> 20

Fonte: (SERRAT et al., 2006)



Anexo 2: Curva de calibração realizada com diferentes concentrações de EDTA para a estimativa da quantidade de sideróforos. A curva foi realizada nas mesmas condições que os isolados foram avaliados. Eixo X: Concentração de EDTA em μM . Eixo Y: Absorbância medida a 630 nm.

Anexo 3: Tabela representando os 182 isolados avaliados juntamente com a identificação dos 129 isolados sequenciados.

Isolado	Local	Parte da Planta	Gênero	Sideróforo	Surfactante	Antagonismo		
						<i>S.sclerotiorum</i>	<i>C.gloesporioides</i>	<i>C. flaccumfaciens</i>
2	PG	Endosfera	<i>Burkholderia</i>	0	+++	++	+	0
3	PG	Endosfera	<i>N.C</i>	0	0	+	0	0
5	PG	Endosfera	<i>N.C</i>	0	0	0	0	0
6	PG	Endosfera	<i>N.C</i>	0	0	+	0	0
13	PG	Endosfera	<i>Arthrobacter</i>	13,25	0	0	0	1,20
15	PG	Endosfera	<i>Streptomyces</i>	17	0	+	+	0
16	PG	Rizosfera	<i>Arthrobacter</i>	0	0	0	0	0
17	PG	Rizosfera	<i>N.C</i>	0	0	0	0	0
21	PG	Rizosfera	<i>N.C</i>	0	++	0	0	0
23	PG	Rizosfera	<i>Bacillus</i>	10,75	0	0	0	0
26	PG	Rizosfera	<i>Bacillus</i>	23,25	0	0	0	0
27	PG	Rizosfera	<i>Burkholderia</i>	62	+	+++	+++	0
28	PG	Rizosfera	<i>Staphylococcus</i>	90,75	0	0	0	0
36	PG	Rizosfera	<i>Streptomyces</i>	0	0	+	0	0
43	PG	Endosfera	<i>Burkholderia</i>	0	0	+++	+++	0
44	PG	Endosfera	<i>N.C</i>	0	0	0	0	0
45	PG	Endosfera	<i>Rhizobium</i>	0	0	0	0	2,1
47	PG	Endosfera	<i>Rhizobium</i>	517	+++	0	0	0
49	PG	Endosfera	<i>N.C</i>	0	0	0	0	0
50	PG	Endosfera	<i>Bacillus</i>	0	0	0	0	0
57	PG	Endosfera	<i>Micrococcus</i>	0	0	0	0	0
62	PG	Rizosfera	<i>Methylobacterium</i>	0	0	0	0	1,67
63	PG	Rizosfera	<i>Bacillus</i>	0	0	0	0	0
75	PG	Endosfera	<i>Methylobacterium</i>	0	0	0	0	1,56
76	PG	Endosfera	<i>N.C</i>	0	0	0	0	0
77	PG	Endosfera	<i>Micrococcus</i>	0	0	0	0	3,11
78	PG	Endosfera	<i>Methylobacterium</i>	0	+	0	0	0
82	PG	Endosfera	<i>Staphylococcus</i>	0	0	0	0	0
101	PG	Rizosfera	<i>Methylobacterium</i>	0	0	0	0	0
102	PG	Rizosfera	<i>Conexibacter</i>	0	0	0	+	1,33
104	PG	Rizosfera	<i>Bacillus</i>	0	0	0	0	0
105	PG	Rizosfera	<i>Sphingomonas</i>	0	0	0	0	0
106	PG	Rizosfera	<i>Sphingomonas</i>	0	0	0	0	1,56

109	PG	Endosfera	<i>Bacillus</i>	439,5	+++	0	0	0
116	PG	Endosfera	<i>Bacillus</i>	0	+++	0	0	0
117	PG	Endosfera	<i>Staphylococcus</i>	0	0	0	0	0
118	PG	Endosfera	<i>N.C</i>	0	++	++	0	0
119	PG	Endosfera	<i>Paenibacillus</i>	130,75	+++	0	0	0
120	PG	Endosfera	<i>N.C</i>	0	+++	+	+	0
131	PG	Rizosfera	<i>Burkholderia</i>	0	0	++	+	1,67
144	PG	Rizosfera	<i>Methylobacterium</i>	0	0	0	0	0
145	PG	Endosfera	<i>Bacillus</i>	0	0	0	0	1,89
146	PG	Endosfera	<i>Bacillus</i>	0	++	+++	0	1,44
148	PG	Endosfera	<i>Bacillus</i>	0	0	+++	+	1,78
149	PG	Endosfera	<i>N.C</i>	0	0	0	0	0
156	PG	Endosfera	<i>Luteibacter</i>	0	+	0	+	0
157	PG	Endosfera	<i>Methylobacterium</i>	0	0	0	++	0
159	PG	Endosfera	<i>N.C</i>	0	+++	0	+	1,5
161	PG	Endosfera	<i>N.C</i>	0	0	0	0	0
166	PG	Endosfera	<i>Streptomyces</i>	0	0	0	0	0
177	PG	Endosfera	<i>Methylobacterium</i>	0	0	0	0	0
178	PG	Rizosfera	<i>N.C</i>	0	0	0	0	0
179	PG	Rizosfera	<i>N.C</i>	0	0	+	0	0
182	PG	Rizosfera	<i>Bacillus</i>	0	++	0	0	3
183	PG	Rizosfera	<i>Bacillus</i>	0	0	0	0	0
195	PG	Endosfera	<i>Methylobacterium</i>	0	0	0	0	0
210	PG	Rizosfera	<i>Bacillus</i>	565,75	+++	0	0	0
211	PG	Rizosfera	<i>N.C</i>	752	+++	+	0	0
213	PG	Rizosfera	<i>Pseudomonas</i>	0	0	0	0	0
215	PG	Rizosfera	<i>Serratia</i>	0	0	0	0	1,78
219	PG	Rizosfera	<i>Bacillus</i>	0	0	0	0	1,22
241	PG	Endosfera	<i>N.C</i>	0	0	++	0	0
260	PG	Endosfera	<i>Luteibacter</i>	304	0	0	0	0
263	PG	Endosfera	<i>N.C</i>	0	+	0	0	0
264	PG	Rizosfera	<i>Bacillus</i>	0	0	0	0	0
265	PG	Rizosfera	<i>Leifsonia</i>	187	0	0	0	0
269	PG	Endosfera	<i>N.C</i>	0	0	0	0	0
281	PG	Rizosfera	<i>Streptomyces</i>	0	+	+	0	0
287	PG	Rizosfera	<i>N.C</i>	590	+	+	+	0

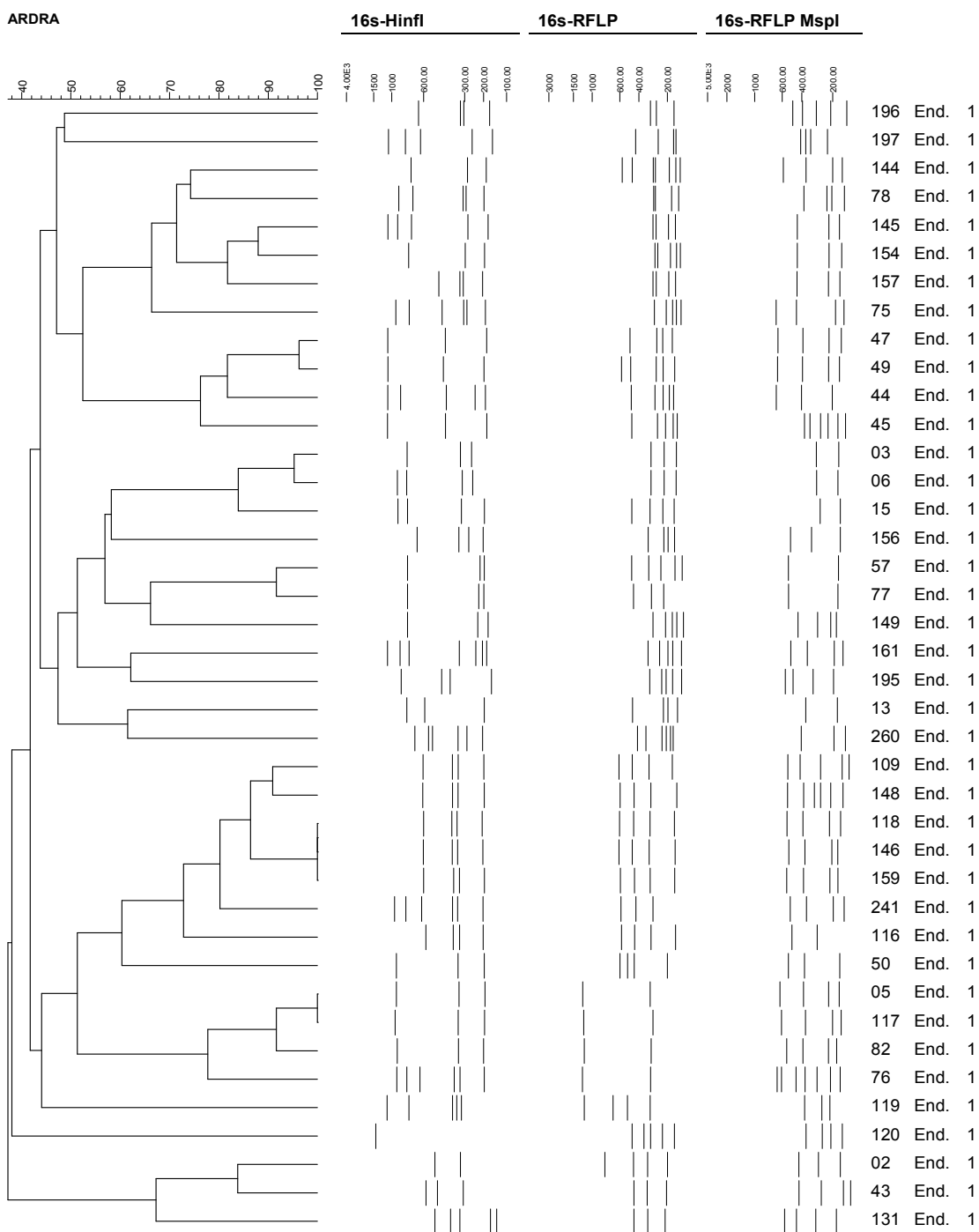
288	PG	Rizosfera	<i>N.C</i>	0	0	++	++	0
290	PG	Endosfera	<i>Streptomyces</i>	159,5	0	0	0	0
291	PG	Endosfera	<i>Streptomyces</i>	553,25	0	+++	++	0
298	PG	Rizosfera	<i>Streptomyces</i>	0	0	++	++	0
299	PG	Rizosfera	<i>N.C</i>	25,7	+++	+++	++	0
300	PG	Rizosfera	<i>Streptomyces</i>	0	+++	+++	++	0
307	PG	Rizosfera	<i>Rhodococcus</i>	0	0	+++	+++	0
311	PG	Rizosfera	<i>Rhodococcus</i>	0	0	+++	0	0
317	PG	Rizosfera	<i>Burkholderia</i>	654,5	0	0	0	0
323	PG	Endosfera	<i>Variovorax</i>	723,25	0	0	0	1,67
327	PG	Endosfera	<i>Xanthomonas</i>	730	0	+	0	0
329	PG	Endosfera	<i>Bosea</i>	0	0	0	0	0
331	PG	Endosfera	<i>Bacillus</i>	0	+	0	0	0
332	PG	Endosfera	<i>Bacillus</i>	0	0	0	0	0
333	PG	Endosfera	<i>N.C</i>	0	0	0	0	0
336	PG	Endosfera	<i>Pseudomonas</i>	392	0	0	0	1,67
340	PG	Endosfera	<i>Bacillus</i>	623,25	0	0	0	0
343	PG	Endosfera	<i>Tardiphaga</i>	0	0	0	0	1,67
344	PG	Endosfera	<i>Tardiphaga</i>	0	+	0	0	0
346	PG	Endosfera	<i>Bacillus</i>	93,25	+	0	0	0
350	PG	Endosfera	<i>N.C</i>	0	0	0	0	0
356	PG	Endosfera	<i>N.C</i>	0	0	0	0	0
358	PG	Endosfera	<i>Paenibacillus</i>	0	+	0	0	0
360	PG	Endosfera	<i>Streptomyces</i>	0	0	0	0	1,33
362	PG	Rizosfera	<i>Streptomyces</i>	0	0	0	0	0
364	PG	Endosfera	<i>Nocardioides</i>	0	0	0	0	0
366	PG	Endosfera	<i>Bacillus</i>	103,26	0	0	0	1,78
369	PG	Endosfera	<i>N.C</i>	0	0	0	0	0
375	PG	Rizosfera	<i>Bacillus</i>	0	+	0	0	0
380	PG	Rizosfera	<i>Streptomyces</i>	5,75	++	0	0	1,67
383	PG	Rizosfera	<i>N.C</i>	0	0	0	0	0
385	PG	Endosfera	<i>Rhizobium</i>	9,5	++	0	0	1,78
388	PG	Endosfera	<i>Bacillus</i>	80,75	0	0	0	1,44
389	PG	Endosfera	<i>N.C</i>	0	0	0	0	0
393	PG	Rizosfera	<i>Arthrobacter</i>	80,75	++	0	0	0
399	PG	Endosfera	<i>Rhizobium</i>	97	0	0	0	0

401	PG	Endosfera	<i>N.C</i>	0	0	0	0	0
402	PG	Endosfera	<i>Tardiphaga</i>	97	0	0	0	0
403	PG	Endosfera	<i>Rhizobium</i>	0	++	0	0	0
408	PG	Endosfera	<i>Tardiphaga</i>	0	0	0	0	0
417	PG	Rizosfera	<i>Kitasatospora</i>	25,75	0	+	+	0
418	PG	Endosfera	<i>Bacillus</i>	0	0	++	0	0
427	PG	Endosfera	<i>Tardiphaga</i>	0	0	0	0	0
429	PG	Endosfera	<i>N.C</i>	0	0	+	0	0
438	PG	Endosfera	<i>Kocuria</i>	0	0	+	0	0
443	PG	Rizosfera	<i>N.C</i>	0	+	0	0	0
445	PG	Rizosfera	<i>N.C</i>	0	+	+++	+	0
446	OR	Rizosfera	<i>Streptomyces</i>	0	0	0	0	0
447	OR	Rizosfera	<i>Kitasatospora</i>	0	0	++	++	0
449	OR	Rizosfera	<i>Streptomyces</i>	0	0	++	++	0
450	OR	Rizosfera	<i>Streptomyces</i>	0	+++	0	+	0
451	OR	Rizosfera	<i>N.C</i>	0	0	+	0	0
453	OR	Endosfera	<i>Streptomyces</i>	0	0	++	+	0
454	OR	Endosfera	<i>Paenibacillus</i>	0	+++	0	0	0
456	OR	Endosfera	<i>N.C</i>	0	+	+++	++	0
457	OR	Endosfera	<i>N.C</i>	0	0	++	++	0
458	OR	Endosfera	<i>Lysinibacillus</i>	0	+	0	0	0
459	OR	Endosfera	<i>N.C</i>	0	0	0	0	0
476	OR	Endosfera	<i>Rhizobium</i>	0	0	+++	+++	0
479	OR	Endosfera	<i>Paenibacillus</i>	0	0	0	0	0
481	OR	Rizosfera	<i>Pseudomonas</i>	0	0	0	+	0
483	OR	Rizosfera	<i>Chromobacterium</i>	0	+	+++	0	0
484	OR	Rizosfera	<i>Pseudomonas</i>	125,75	0	0	0	0
485	OR	Rizosfera	<i>Burkholderia</i>	0	0	0	0	0
486	OR	Rizosfera	<i>Burkholderia</i>	0	+	0	0	0
487	OR	Rizosfera	<i>Herbaspirillum</i>	0	0	0	0	0
495	OR	Endosfera	<i>Caulobacter</i>	0	0	0	+	0
496	OR	Endosfera	<i>Dongia</i>	0	0	+	0	0
497	OR	Endosfera	<i>Pseudomonas</i>	0	0	0	0	0
498	OR	Endosfera	<i>Pantoea</i>	0	0	0	0	0
499	OR	Endosfera	<i>Bradyrhizobium</i>	0	0	0	0	0
500	OR	Endosfera	<i>Pantoea</i>	0	0	0	0	0

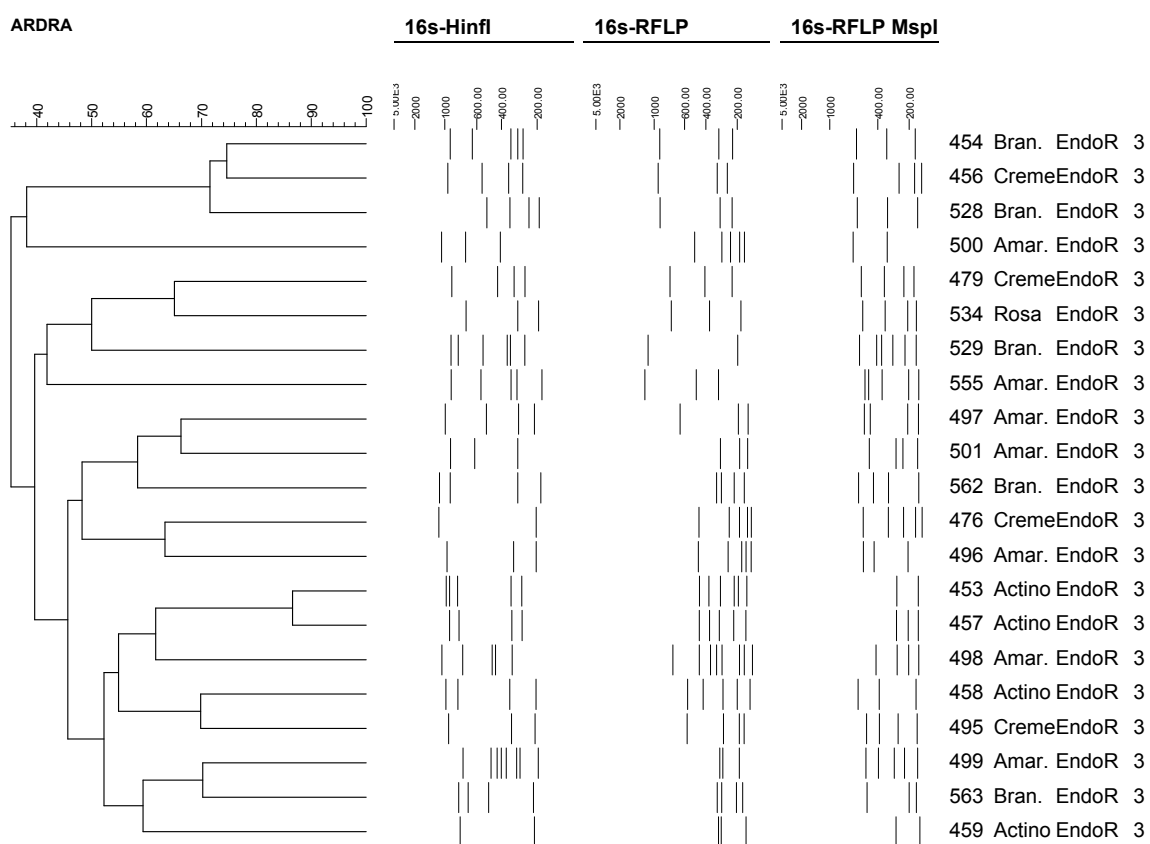
501	OR	Endosfera	<i>N.C</i>	0	++	0	0	0
503	OR	Rizosfera	<i>Staphylococcus</i>	0	+	0	0	0
504	OR	Rizosfera	<i>Variovorax</i>	0	0	0	0	0
505	OR	Rizosfera	<i>N.C</i>	0	0	0	0	0
506	OR	Rizosfera	<i>Sphingobium</i>	0	0	0	0	0
507	OR	Rizosfera	<i>Thauera</i>	0	+	0	0	0
508	OR	Rizosfera	<i>N.C</i>	0	+	0	0	0
509	OR	Rizosfera	<i>N.C</i>	214,5	++	0	0	0
510	OR	Rizosfera	<i>Variovorax</i>	0	0	0	0	0
511	OR	Rizosfera	<i>N.C</i>	0	0	0	0	0
512	OR	Rizosfera	<i>Luteibacter</i>	0	++	+	0	0
514	OR	Rizosfera	<i>Kluyvera</i>	0	+	0	0	0
515	OR	Rizosfera	<i>N.C</i>	0	0	0	0	0
519	OR	Rizosfera	<i>Pseudomonas</i>	0	0	0	0	0
523	OR	Rizosfera	<i>Paenibacillus</i>	0	+++	0	0	0
527	OR	Rizosfera	<i>Stenotrophomonas</i>	0	++	0	0	0
528	OR	Endosfera	<i>Paenibacillus</i>	0	+	0	0	0
529	OR	Endosfera	<i>Paenibacillus</i>	0	++	++	+	2
530	OR	Rizosfera	<i>N.C</i>	0	+++	+	0	0
531	OR	Rizosfera	<i>N.C</i>	0	0	0	0	0
534	OR	Endosfera	<i>Paenibacillus</i>	0	0	0	0	0
535	OR	Rizosfera	<i>Methylobacterium</i>	0	+++	0	+	0
536	OR	Rizosfera	<i>N.C</i>	0	0	0	0	0
539	OR	Rizosfera	<i>N.C</i>	0	0	0	0	0
540	OR	Rizosfera	<i>Paenibacillus</i>	0	+++	0	0	0
541	OR	Rizosfera	<i>Methylobacterium</i>	0	0	0	0	0
542	OR	Rizosfera	<i>N.C</i>	0	+	0	0	0
543	OR	Rizosfera	<i>N.C</i>	0	+++	0	0	0
545	OR	Rizosfera	<i>Mycobacterium</i>	0	0	0	0	0
548	OR	Rizosfera	<i>N.C</i>	0	++	0	0	0
549	OR	Rizosfera	<i>N.C</i>	430,75	0	0	0	0
550	OR	Rizosfera	<i>Streptomyces</i>	0	+++	0	0	0
551	OR	Rizosfera	<i>N.C</i>	0	0	0	0	0
552	OR	Rizosfera	<i>N.C</i>	0	0	0	0	0
553	OR	Rizosfera	<i>N.C</i>	487	0	+	0	0
555	OR	Rizosfera	<i>N.C</i>	0	0	0	0	0

559	OR	Rizosfera	<i>Burkholderia</i>	0	0	0	0	0
560	OR	Rizosfera	<i>Duganella</i>	0	0	0	0	0
561	OR	Endosfera	<i>Burkholderia</i>	0	0	0	0	0
562	OR	Endosfera	<i>Rhizobacter</i>	0	0	0	0	0
563	OR	Rizosfera	<i>N.C</i>	0	0	0	0	0
564	OR	Rizosfera	<i>Bradyrhizobium</i>	0	0	0	0	0
569	OR	Rizosfera	<i>Paenibacillus</i>	0	0	0	0	0

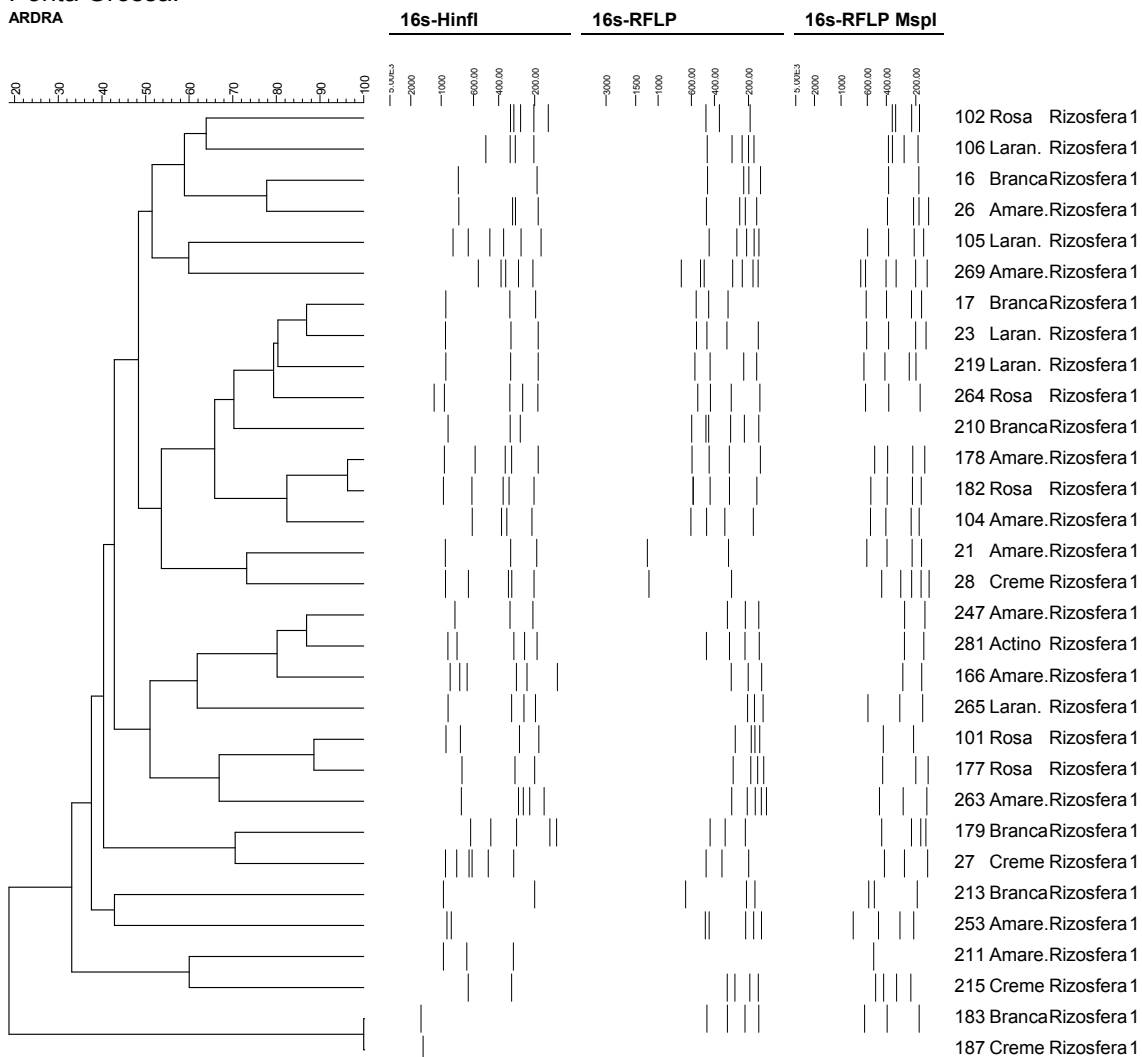
Anexo 4: Dendograma gerado a partir da digestão do gene 16S dos isolados da endorrisosfera da coleta de Ponta Grossa.



Anexo 5: Dendograma gerado a partir da digestão do gene 16S dos isolados da endorrisosfera da coleta de Ortigueira.



Anexo 6: Dendograma gerado a partir da digestão do gene 16S dos isolados da rizosfera da coleta de Ponta Grossa.



Anexo 7: Dendograma gerado a partir da digestão do gene 16S dos isolados da rizosfera da coleta de Ortigueira.

