



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DOUGLAS CUNHA VENANCIO

**“DIVERSIDADE E PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES
DE BACTÉRIAS ASSOCIATIVAS DE *Baccharis
dracunculifolia* DC”**

Londrina
2018

DOUGLAS CUNHA VENANCIO

**“DIVERSIDADE E PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES
DE BACTÉRIAS ASSOCIATIVAS DE *Baccharis
dracunculifolia* DC”**

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

Orientador: Prof. Dr. Fernando Gomes Barcellos.

Coorientadora: Profa. Dra. Elisete Pains Rodrigues.

Londrina
2018

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

Venancio, Douglas Cunha.

Diversidade e Produção de Biossurfactantes de Bactérias Associativas de *Baccharis dracunculifolia* DC / Douglas Cunha Venancio. - Londrina, 2018.
101 f. : il.

Orientador: Fernando Gomes Barcellos.

Coorientador: Elisete Pains Rodrigues.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, , 2018.

Inclui bibliografia.

1. rizobactéria - Tese. 2. endófitos - Tese. 3. surfactantes - Tese. 4. alecrim-do-campo - Tese. I. Gomes Barcellos, Fernando. II. Pains Rodrigues, Elisete. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. . IV. Título.

DOUGLAS CUNHA VENANCIO

**“DIVERSIDADE E PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES DE
BACTÉRIAS ASSOCIATIVAS DE *Baccharis dracunculifolia* DC”**

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

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Fernando Gomes Barcellos
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Gislayne Trindade Vilas-Bôas
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Daniele Sartori
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 27 de julho de 2018.

Dedico este trabalho a minha família, que através do carinho, apoio e incentivo me ajudaram a chegar até esta etapa da minha vida. Dedico também a todos os meus amigos pela amizade e companheirismo.

*“O papel dos infinitamente pequenos na natureza é
infinitamente grande”.*

Louis Pasteur

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Estadual de Londrina (UEL) pelo seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram a minha formação.

Aos professores e demais membros do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular que contribuíram para a minha formação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro do projeto e concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Gomes Barcellos por ter me aceitado como aluno de mestrado e pela confiança no meu trabalho.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Elisete Pains Rodrigues pela atenção, ajuda, orientação e dedicação.

À Profa. Dra. Claudete de Fátima Ruas por permitir utilizar os equipamentos do Laboratório de Marcadores Moleculares e Citogenética de Plantas.

Às mestrandas Ana Camila Jardim e Luana Moura, pela grande ajuda nas técnicas de biologia molecular.

Aos colegas do Laboratório de Genética de Microrganismos (LAGEM) Ana Camila Jardim, Dorival Bião, Gilberto Pereira, Giovana Gutuzzo e Jéssica Oliveira pela ajuda na coleta de material e no processamento de amostras.

Ao técnico Ideval Souza, do Laboratório de Genética em Microrganismo (LAGEM) pela colaboração.

À minha família, principalmente ao meu pai Mauro Venancio e a minha mãe Deisy Cunha Venancio pelo amor, carinho, incentivo e compreensão.

Obrigado a todos!

VENANCIO, Douglas C. **Diversidade e Produção de Biossurfactantes de Bactérias Associativas de *Baccharis dracunculifolia* DC.** 2018. 101f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2018.

RESUMO

A microbiota associativa e endofítica de plantas medicinais nativas pode representar uma fonte de novos compostos, relevantes na interação com a planta e com diversas aplicações biotecnológicas, como é o caso dos biossurfactantes. Um dos gêneros de plantas que se destaca pelo seu potencial medicinal no Brasil é o gênero *Baccharis* sp. pertencente a família Asteraceae. Entre as espécies deste gênero, a espécie *Baccharis dracunculifolia* DC vem se tornado alvo de estudos devido ao potencial terapêutico que apresenta e por ser a fonte de matéria prima da própolis verde. As bactérias associativas podem produzir compostos bioativos como os biossurfactantes e que podem ter aplicações no antagonismo de fitopatógenos e biorremediação de ambientes contaminados por hidrocarbonetos. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi isolar, identificar bactérias associadas a *B. dracunculifolia* e avaliar a produção de biossurfactantes por estas bactérias. Amostras de solo e de raízes de plantas saudáveis de alecrim-do-campo (*B. dracunculifolia*) foram coletadas em local de ocorrência natural. As amostras foram processadas, plaqueadas em diferentes meios de cultivo (BA, YCED e R2A) e incubadas por até 30 dias a 28 °C. Durante o período de incubação foi realizada a contagem populacional estimada em Unidades Formadoras de Colônias. O isolamento de bactérias distintas teve como base as diferenças morfológicas. Os isolados obtidos foram identificados ao nível de gênero pela amplificação e sequenciamento do gene *16S rRNA*. Os isolados também foram avaliados quanto a capacidade de produzir biossurfactantes pelos ensaios de colapso da gota, espalhamento de óleo e pelo índice de emulsão. Ao final do isolamento, foram obtidos 76 isolados, 63% de solo, 8% da rizosfera e 29% foram obtidos da endosfera. A análise das sequências do gene *16S rDNA* permitiu identificar o gênero de 48 isolados distribuídos em 14 gêneros bacterianos, sendo os mais abundantes *Bacillus* (19 isolados), *Pseudomonas* (7 isolados) e *Staphylococcus* (6 isolados). A produção de biossurfactantes foi observada em 27 isolados, enquanto que, 12 isolados formaram halos no ensaio de espalhamento de óleo e 18 conseguiram produzir emulsões. Entre os isolados analisados, os mais promissores foram o isolado 48 (com halo de solubilização de óleo de 74 mm e um índice de emulsão de 72%) e o isolado 130 (com halo de solubilização de óleo de 52 mm e um índice de emulsão de 62%) provenientes do solo e do interior de raízes, respectivamente. Os isolados 48 e 130 foram identificados como representantes dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus*, respectivamente. Em conclusão, *B. dracunculifolia* DC apresenta uma microbiota bacteriana diversa com presença de bactérias capazes de produzir compostos biossurfactantes.

Palavras-chave: rizobactéria, endófitos, tensoativos, surfactantes, alecrim-do-campo

VENANCIO, Douglas C. **Diversidade e Produção de Biossurfactantes de Bactérias Associativas de *Baccharis dracunculifolia* DC.** 2018. 101pp. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2018.

ABSTRACT

The associative and endophytic microbiota of native medicinal plants may represent a source of new compounds, relevant in the interaction with the plant and with several biotechnological applications, such as biosurfactants. One of the genera of plants that stands out for its medicinal potential in Brazil is the genus *Baccharis* sp. belonging to the family Asteraceae. Among the species of this genus, the species *Baccharis dracunculifolia* DC has become the target of studies due to the therapeutic potential that it presents and for being the source of raw material of the green propolis. Associative bacteria may produce bioactive compounds such as biosurfactants and may have applications in phytopathogen antagonism and bioremediation of hydrocarbon contaminated environments. Thus, the objective of this work was to isolate, to identify bacteria associated to *B. dracunculifolia* and to evaluate the production of biosurfactants by these bacteria. Soil and root samples of healthy plants of field rosemary (*B. dracunculifolia*) were collected at a natural occurrence site. Samples were processed, plated in different culture media (BA, YCED and R2A) and incubated for up to 30 days at 28 ° C. During the incubation period, the population count was estimated in Colony Forming Units. Isolation of distinct bacteria was based on morphological differences. The isolates obtained were identified at the genus level by amplification and sequencing of the 16S rRNA gene. The isolates were also evaluated for their ability to produce biosurfactants by drop collapse, oil spreading and emulsion index tests. At the end of the isolation, 76 isolates were obtained, 63% soil, 8% rhizosphere and 29% were obtained from the endosphere. The analysis of 16S rDNA gene sequences allowed us to identify the genus of 48 isolates distributed in 14 bacterial genera, the most abundant being *Bacillus* (19 isolates), *Pseudomonas* (7 isolates) and *Staphylococcus* (6 isolates). The production of biosurfactants was observed in 27 isolates, whereas, 12 isolates formed halos in the oil spreading test and 18 were able to produce emulsions. Among the isolates analyzed, the most promising were isolate 48 (with oil solubilization halo of 74 mm and emulsion index of 72%) and isolate 130 (with oil solubilization halo of 52 mm and an emulsion index of 62%) from the soil and the interior of roots, respectively. Isolates 48 and 130 were identified as the representatives of the genera *Pseudomonas* and *Bacillus*, respectively. In conclusion, *B. dracunculifolia* DC presents a diverse bacterial microbiota with presence of bacteria capable of producing biosurfactant compounds.

Key words: rhizobacteria, endophytes, surfactants, surfactants, alecrim-do-campo

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1** - No microbioma da rizosfera estão presentes bactérias e fungos, recrutados a partir do solo e colonizam a superfície da raiz. O microbioma endofítico inclui microrganismos que se infiltram no córtex da raiz, alguns endófitos ainda podem colonizar as sementes (HIRSCH & MAUCLINE, 2012).
- Figura 2** - A rizosfera: é uma zona estreita de solo (de alguns milímetros de largura) que envolve e é influenciada pelas raízes das plantas. O esquema mostra imagens ampliadas da rizosfera, contendo bactérias e fungos saprófitas e simbióticas, incluindo fungos micorrízicos arbusculares (FMA) (PHILIPPOT et al., 2013).
- Figura 3** - Tipos de endófitos e seu processo de colonização radicular. Bactérias endófitas passageiras (células vermelhas) são frequentemente restritas ao tecido do córtex da raiz. Endófitos oportunistas (células azuis) apresentam características particulares de colonização das raízes. Endófitos competentes (células amarelas) são propostos para ter todas as propriedades de endófitos oportunistas e, além disso, estão bem adaptados ao ambiente da planta (HARDOIM; VAN OVERBEEK; VAN ELSAS, 2008).
- Figura 4** - Indivíduos pertencentes à espécie *Baccharis dracunculifolia*. A esquerda há uma planta do sexo masculino e a direita uma planta do sexo feminino.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO

- Figura 1** - Densidade populacional de bactérias associativas de *B. dracunculifolia* no período de 5-20 dias de incubação. Dados são medias de três repetições biológicas (A1, A2 e A3) \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,01$).
- Figura 2** - Densidade populacional de isolados associativos de *B. dracunculifolia* após 20 dias de crescimento para cada meio de cultivo utilizado. Dados são medias de três repetições biológicas (A1, A2 e A3) \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,01$).
- Figura 3** - Porcentagens de bactérias isoladas do solo, rizosfera e endosfera de *B. dracunculifolia*.
- Figura 4** - Produção de biossurfactantes por bactérias isoladas de *B. dracunculifolia* no ensaio de colapso da gota. Os isolados foram categorizados em níveis de produção: negativo (-), baixo (+), médio (++) e alto (+++).
- Figura 5** - Gráfico de formação de halo pelos isolados selecionados no ensaio de espalhamento de óleo. Dados do gráfico são médias de duas repetições com \pm desvio padrão.
- Figura 6** - Gráfico de formação de emulsões pelos isolados selecionados para o índice de emulsão 24h (IE₂₄). Dados do gráfico são médias de duas repetições com \pm desvio padrão.
- Figura 7** - Porcentagem de gêneros bacterianos entre os isolados obtidos utilizando a ferramenta RDP-Classifer.
- Figura 8** - Porcentagem de gêneros bacterianos presentes em cada tratamento. (a) Tratamento Rizosfera; (b) Tratamento Endofítico; (c) Tratamento Solo.
- Figura 9** - Árvore filogenética do isolado pertencente ao gênero *Acinetobacter* foi construída baseada na similaridade da sequência parcial do gene *16S rRNA* e utilizando a espécie *Moraxella lacunata* ATCC 17967^(T) como grupo externo. A relação evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A árvore ideal com a soma do comprimento do ramo = 0,30984476 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas em que os *taxa* associados e agrupados no ensaio de bootstrap (1000 réplicas) são mostradas próximas às ramificações. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Kimura de 2 parâmetros. A variação da *taxa* entre os nodos foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 0,2583). A análise envolveu 10 sequências nucleotídicas. Todas as posições com menos de 95% de cobertura do site foram eliminadas. Ou seja, menos de 5% de intervalos de alinhamento, dados ausentes e bases ambíguas foram permitidos em qualquer posição. Houve um total de 833 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas no MEGA7. Valores de bootstrap

abaixo de 70% não foram mostrados. Nome de espécie precedido de símbolo (T) indicam espécie tipo.

Figura 10 - Árvore filogenética do isolado pertencente ao gênero *Arthrobacter* foi construída baseada na similaridade da sequência parcial do gene *16S rRNA* e utilizando a espécie *Kocuria arsenatis* CM1E1^(T) como grupo externo. A relação evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A árvore ideal com a soma do comprimento do ramo = 0,29508967 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas em que os *taxa* associados e agrupados no ensaio de bootstrap (1000 réplicas) são mostradas próximas às ramificações. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Tamura-Nei. A variação da *taxa* entre os nodos foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 0,05). A análise envolveu 10 sequências nucleotídicas. Todas as posições com menos de 95% de cobertura do site foram eliminadas. Ou seja, menos de 5% de intervalos de alinhamento, dados ausentes e bases ambíguas foram permitidos em qualquer posição. Houve um total de 961 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas no MEGA7. Valores de bootstrap abaixo de 70% não foram mostrados. Nome de espécie precedido de símbolo (T) indicam espécie tipo.

Figura 11 - Árvore filogenética do isolado pertencente ao gênero *Bacillus* foi construída baseada na similaridade da sequência parcial do gene *16S rRNA* e utilizando a espécie *Allycyclobacillus acidoterrestris* GD3B^(T) como grupo externo. A relação evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A árvore ideal com a soma do comprimento do ramo = 0.78839840 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas em que os *taxa* associados e agrupados no ensaio de bootstrap (1000 réplicas) são mostradas próximas às ramificações. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Tamura-Nei. A variação da *taxa* entre os nodos foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 0,2106). A análise envolveu 40 sequências nucleotídicas. Todas as posições com menos de 95% de cobertura do site foram eliminadas. Ou seja, menos de 5% de intervalos de alinhamento, dados ausentes e bases ambíguas foram permitidos em qualquer posição. Houve um total de 766 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas no MEGA7. Valores de bootstrap abaixo de 70% não foram mostrados. Nome de espécie precedido de símbolo (T) indicam espécie tipo.

Figura 12 - Árvore filogenética do isolado pertencente ao gênero *Burkholderia* foi construída baseada na similaridade da sequência parcial do gene *16S rRNA* e utilizando a espécie *Mycoavidus cysteinexigens* B1-EB^(T) como grupo externo. A relação evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A árvore ideal com a soma do comprimento do ramo = 0.26319230 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas em que os *taxa* associados e agrupados no ensaio de bootstrap (1000 réplicas) são mostradas próximas às ramificações. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Tamura-Nei. A variação da *taxa* entre os nodos foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 0,0538). A análise envolveu 10 sequências nucleotídicas. Todas as posições com menos de 95% de cobertura do site foram eliminadas. Ou seja, menos de 5% de intervalos de alinhamento, dados ausentes e bases ambíguas foram permitidos em qualquer posição. Houve um total de 837 posições no conjunto de dados

final. Análises evolutivas foram conduzidas no MEGA7. Valores de bootstrap abaixo de 70% não foram mostrados. Nome de espécie precedido de símbolo (T) indicam espécie tipo.

Figura 13 – Árvore filogenética do isolado pertencente ao gênero *Cellulomonas* foi construída baseada na similaridade da sequência parcial do gene *16S rRNA* e utilizando a espécie *Oerskovia turbata* NCIMB 10587^(T) como grupo externo. A relação evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A árvore ideal com a soma do comprimento do ramo = 0.19960422 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas em que os *taxa* associados e agrupados no ensaio de bootstrap (1000 réplicas) são mostradas próximas às ramificações. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de 3 parâmetros de Tamura. A variação da *taxa* entre os nodos foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 0,05). A análise envolveu 10 sequências nucleotídicas. Todas as posições com menos de 95% de cobertura do site foram eliminadas. Ou seja, menos de 5% de intervalos de alinhamento, dados ausentes e bases ambíguas foram permitidos em qualquer posição. Houve um total de 925 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas no MEGA7. Valores de bootstrap abaixo de 70% não foram mostrados. Nome de espécie precedido de símbolo (T) indicam espécie tipo.

Figura 14 – Árvore filogenética do isolado pertencente ao gênero *Cupriavidus* foi construída baseada na similaridade da sequência parcial do gene *16S rRNA* e utilizando a espécie *Limnobacter humi* UCM-39^(T) como grupo externo. A relação evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A árvore ideal com a soma do comprimento do ramo = 0,33805780 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas em que os *taxa* associados e agrupados no ensaio de bootstrap (1000 réplicas) são mostradas próximas às ramificações. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Tamura-Nei. A variação da *taxa* entre os nodos foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 0,1168). A análise envolveu 10 sequências nucleotídicas. Todas as posições com menos de 95% de cobertura do site foram eliminadas. Ou seja, menos de 5% de intervalos de alinhamento, dados ausentes e bases ambíguas foram permitidos em qualquer posição. Houve um total de 805 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas no MEGA7. Valores de bootstrap abaixo de 70% não foram mostrados. Nome de espécie precedido de símbolo (T) indicam espécie tipo.

Figura 15 – Árvore filogenética do isolado pertencente ao gênero *Microbacterium* foi construída baseada na similaridade da sequência parcial do gene *16S rRNA* e utilizando a espécie *Okibacterium endophyticum* EGI 650022^(T) como grupo externo. A relação evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A árvore ideal com a soma do comprimento do ramo = 0,24772256 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas em que os *taxa* associados e agrupados no ensaio de bootstrap (1000 réplicas) são mostradas próximas às ramificações. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Tamura-Nei. A variação da *taxa* entre os nodos foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 0,05). A análise envolveu 10 sequências nucleotídicas. Todas as posições com menos de 95% de cobertura do site foram eliminadas. Ou seja, menos de 5% de intervalos de alinhamento, dados ausentes e bases ambíguas

foram permitidos em qualquer posição. Houve um total de 831 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas no MEGA7. Valores de bootstrap abaixo de 70% não foram mostrados. Nome de espécie precedido de símbolo (T) indicam espécie tipo.

Figura 16 – Árvore filogenética do isolado pertencente ao gênero *Micrococcus* foi construída baseada na similaridade da sequência parcial do gene *16S rRNA* e utilizando a espécie *Auritidibacter ignavus* IMMIB L-1656^(T) como grupo externo. A relação evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A árvore ideal com a soma do comprimento do ramo = 0,16386447 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas em que os *taxa* associados e agrupados no ensaio de bootstrap (1000 réplicas) são mostradas próximas às ramificações. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Tamura-Nei. A variação da *taxa* entre os nodos foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 0,1759). A análise envolveu 10 sequências nucleotídicas. Todas as posições com menos de 95% de cobertura do site foram eliminadas. Ou seja, menos de 5% de intervalos de alinhamento, dados ausentes e bases ambíguas foram permitidos em qualquer posição. Houve um total de 733 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas no MEGA7. Valores de bootstrap abaixo de 70% não foram mostrados. Nome de espécie precedido de símbolo (T) indicam espécie tipo.

Figura 17 – Árvore filogenética do isolado pertencente ao gênero *Mycobacterium* foi construída baseada na similaridade da sequência parcial do gene *16S rRNA* e utilizando a espécie *Mycolicibacillus trivialis* TMC 1453^(T) como grupo externo. A relação evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A árvore ideal com a soma do comprimento do ramo = 0,14623234 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas em que os *taxa* associados e agrupados no ensaio de bootstrap (1000 réplicas) são mostradas próximas às ramificações. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de 3 parâmetros de Tamura. A variação da *taxa* entre os nodos foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 0,05). A análise envolveu 10 sequências nucleotídicas. Todas as posições com menos de 95% de cobertura do site foram eliminadas. Ou seja, menos de 5% de intervalos de alinhamento, dados ausentes e bases ambíguas foram permitidos em qualquer posição. Houve um total de 783 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas no MEGA7. Valores de bootstrap abaixo de 70% não foram mostrados. Nome de espécie precedido de símbolo (T) indicam espécie tipo.

Figura 18 - Árvore filogenética do isolado pertencente ao gênero *Pseudomonas* foi construída baseada na similaridade da sequência parcial do gene *16S rRNA* e utilizando a espécie *Azotobacter salinestris* 184^(T) como grupo externo. A relação evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A árvore ideal com a soma do comprimento do ramo = 0,38547799 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas em que os *taxa* associados e agrupados no ensaio de bootstrap (1000 réplicas) são mostradas próximas às ramificações. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Kimura de 2 parâmetros. A variação da *taxa* entre os nodos foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 0,05). A análise envolveu 20 sequências nucleotídicas. Todas as posições com menos de 95% de cobertura do site foram eliminadas. Ou seja, menos de 5% de

intervalos de alinhamento, dados ausentes e bases ambíguas foram permitidos em qualquer posição. Houve um total de 848 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas em MEGA7. Valores de bootstrap abaixo de 70% não foram mostrados. Nome de espécie precedido de símbolo (T) indicam espécie tipo.

Figura 19 – Árvore filogenética do isolado pertencente ao gênero *Ralstonia* foi construída baseada na similaridade da sequência parcial do gene *16S rRNA* e utilizando a espécie *Caballeronia terrestres* LGM 22937^(T) como grupo externo. A relação evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A árvore ideal com a soma do comprimento do ramo = 0,55711164 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas em que os *taxa* associados e agrupados no ensaio de bootstrap (1000 réplicas) são mostradas próximas às ramificações. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Tamura-Nei. A variação da *taxa* entre os nodos foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 0,05). A análise envolveu 10 sequências nucleotídicas. Todas as posições com menos de 95% de cobertura do site foram eliminadas. Ou seja, menos de 5% de intervalos de alinhamento, dados ausentes e bases ambíguas foram permitidos em qualquer posição. Houve um total de 880 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas no MEGA7. Valores de bootstrap abaixo de 70% não foram mostrados. Nome de espécie precedido de símbolo (T) indicam espécie tipo.

Figura 20 - Árvore filogenética do isolado pertencente ao gênero *Staphylococcus* foi construída baseada na similaridade da sequência parcial do gene *16S rRNA* e utilizando a espécie *Jeotgalicoccus halotolerans* YKJ-101^(T) como grupo externo. A relação evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A árvore ideal com a soma do comprimento do ramo = 0,61598425 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas em que os *taxa* associados e agrupados no ensaio de bootstrap (1000 réplicas) são mostradas próximas às ramificações. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Kimura de 2 parâmetros. A variação da *taxa* entre os nodos foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 0,1723). A análise envolveu 18 sequências nucleotídicas. Todas as posições com menos de 95% de cobertura do site foram eliminadas. Ou seja, menos de 5% de intervalos de alinhamento, dados ausentes e bases ambíguas foram permitidos em qualquer posição. Houve um total de 469 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas no MEGA7. Valores de bootstrap abaixo de 70% não foram mostrados. Nome de espécie precedido de símbolo (T) indicam espécie tipo.

Figura 21 - Árvore filogenética do isolado pertencente ao gênero *Streptomyces* foi construída baseada na similaridade da sequência parcial do gene *16S rRNA* e utilizando a espécie *Kitasatospora arboriphila* HKI 0189^(T) como grupo externo. A relação evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A árvore ideal com a soma do comprimento do ramo = 0,11061310 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas em que os *taxa* associados e agrupados no ensaio de bootstrap (1000 réplicas) são mostradas próximas às ramificações. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de 3 parâmetros de Tamura. A variação da *taxa* entre os nodos foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 0,05). A análise envolveu 10 sequências nucleotídicas. Todas as

posições com menos de 95% de cobertura do site foram eliminadas. Ou seja, menos de 5% de intervalos de alinhamento, dados ausentes e bases ambíguas foram permitidos em qualquer posição. Houve um total de 950 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas no MEGA7. Valores de bootstrap abaixo de 70% não foram mostrados. Nome de espécie precedido de símbolo (T) indicam espécie tipo.

Figura 22 – Árvore filogenética do isolado pertencente ao gênero *Terrabacter* foi construída baseada na similaridade da sequência parcial do gene *16S rRNA* e utilizando a espécie *Aquipuribacter nitratireducens* AMV4T^(T) como grupo externo. A relação evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A árvore ideal com a soma do comprimento do ramo = 0,28688372 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas em que os *taxa* associados e agrupados no ensaio de bootstrap (1000 réplicas) são mostradas próximas às ramificações. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de 3 parâmetros de Tamura. A variação da *taxa* entre os nodos foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 0,0732). A análise envolveu 11 sequências nucleotídicas. Todas as posições com menos de 95% de cobertura do site foram eliminadas. Ou seja, menos de 5% de intervalos de alinhamento, dados ausentes e bases ambíguas foram permitidos em qualquer posição. Houve um total de 863 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas no MEGA7. Valores de bootstrap abaixo de 70% não foram mostrados. Nome de espécie precedido de símbolo (T) indicam espécie tipo.

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Tabela 1 - Tabela de isolados produtores de biossurfactantes no ensaio de colapso da gota (Produção de biossurfactante: baixa (+); média (++); alta (+++). Origem dos isolados: solo (tratamento solo); rizosfera e rizoplano (tratamento rizosfera); endofítico (tratamento endofítico).

Tabela 2 - Tabela com todos os isolados identificados a nível de gênero, identificação tendo como base o banco de dados RDP-Classifer.

LISTA DE ANEXOS

ARTIGO

- Anexo 1** - Curva padrão de dodecil sulfato de sódio (SDS), com linha de tendência e com R^2 (seu valor está entre 0 e 1, quanto maior o valor mais explicativo é o modelo).
- Anexo 2** - Tabela com todos os isolados identificados com a classificação até o nível de gênero, identificação baseada no banco de dados RDP-Classifer (com a porcentagem de similaridade com o domínio Bacteria).
- Anexo 3** - Tabela com todos os isolados identificados com sugestões a nível de espécie, identificação baseada nos resultados obtidos com os bancos de dados Genbank NCBI-Blast (com o score, quantidade de bases compatíveis e nível de similaridade em %) e RDP-SequenceMatch (com S_ab e números de Matches).

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA	19
1.1 Bactérias associativas	13
1.2 <i>Baccharis dracunculifolia</i> DC.....	20
1.3 Biossurfactantes.....	24
1.4 Identificação molecular de bactérias: Gene <i>16S rRNA</i>	29
2 OBJETIVOS	32
2.1 Objetivo geral	32
2.2 Objetivos específicos.....	32
3 ARTIGO	33
3.1 Introdução.....	34
3.2 Materias e métodos.....	38
3.3 Resultados	45
3.4 Discussão.....	65
3.5 Conclusão	77
REFERÊNCIAS	78
ANEXOS	93

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Bactérias associativas

Plantas são colonizadas por diferentes tipos de microrganismos, inclusive pelas bactérias, Strobel (2003) e Guo et al. (2008) ressaltam que cada planta, individualmente, que existe na Terra é uma hospedeira para um ou mais tipos de microrganismos que constituem uma rica biodiversidade pouco conhecida. As diferentes comunidades microbianas associadas à planta e que habitam suas raízes, partes aéreas e interior dos tecidos vegetais constituem o microbioma da planta (BERG, 2014). Bactérias associadas às plantas podem ocasionar efeitos classificados em benéficos, deletérios e neutros, com base em como interferem no crescimento da planta (DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003).

Bactéria associativa de plantas é um termo que pode englobar as rizobactérias, bactérias endofíticas e bactérias epifíticas, onde cada um dos tipos associam-se as plantas em diferentes níveis de associação (SCHULZ & BOYLE, 2006; WEYENS et al., 2013). Bactérias epifíticas são aquelas bactérias que tem como habitat a superfície das folhas das plantas (filosfera), possuem diversas adaptações para sobreviver nas superfícies foliares com condições mais rigorosas do que as do solo e das raízes (VANDENKOORNHUYSE et al., 2015). Enquanto que rizobactérias são bactérias que irão colonizar a rizosfera e o rizoplane (GARCIA; KNAAK; FIUZA, 2015) atraídas pelos exsudatos, necessários para sua sobrevivência, liberados pelas plantas no solo (ARORA, 2001), as mesmas também conseguem promover o crescimento da planta por via de mecanismos diretos e indiretos (ARORA, 2001; DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003).

A rizosfera é a região do solo influenciada pelas raízes das plantas (**Figura 1 e Figura 2**) através da excreção de exsudatos e mucilagem (TURNER; JAMES; POOLE, 2013). Região onde existe intensa atividade microbiana se comparado ao solo, a intensa atividade se deve à liberação dos exsudatos pelas raízes da planta (ARORA, 2001; DOBBELAERE;

VANDERLEYDEN; OKON, 2003), já o rizoplano seria a área de superfície das raízes que é colonizada por rizobactérias com capacidade de aderência a estas superfícies (ARORA, 2001; VANDENKOORNHUYSE et al., 2015).

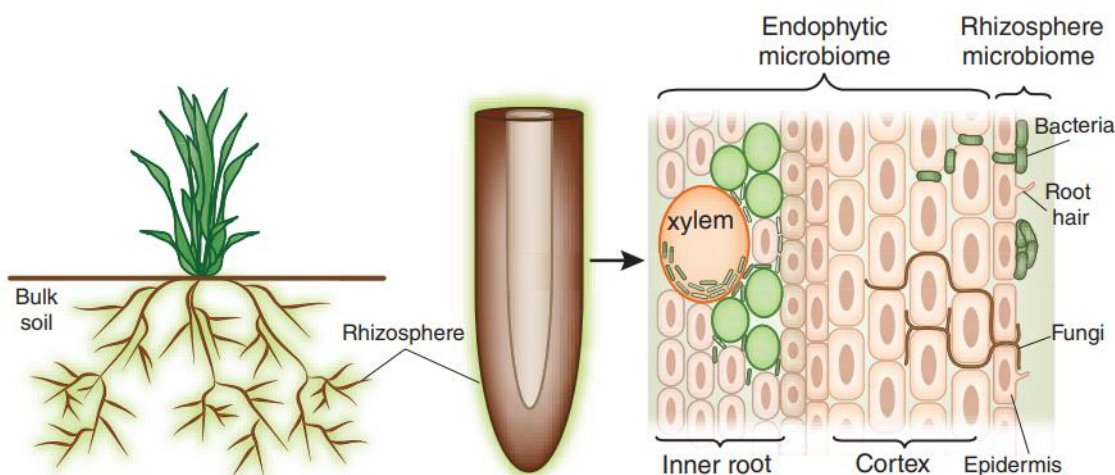


Figura 1 - No microbioma da rizosfera estão presentes bactérias e fungos, recrutados a partir do solo e colonizam a superfície da raiz. O microbioma endofítico inclui microrganismos que se infiltram no córtex da raiz, alguns endófitos ainda podem colonizar as sementes (HIRSCH & MAUCLINE, 2012).

Os exsudatos são secreções celulares das células das raízes de plantas e que podem atuar na sinalização, atração, estimulação e na inibição de comunidades de microrganismos (BAETZ & MARTINOIA, 2014). Geralmente os exsudatos contêm em sua composição: ácidos orgânicos, açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas, hormônios e antimicrobianos (BERTIN; YANG; WESTON, 2003). A composição dos exsudatos radiculares ainda pode variar entre as diferentes espécies de plantas (MARK et al., 2005; MICALLEF; SHIARIS; COLÓN-CARMONA, 2009) e também ao longo dos estágios de desenvolvimento da planta (CAVAGLIERI; ORLANDO; ETCHEVERRY, 2009; DEANGELIS et al., 2009). Os exsudatos radiculares têm grande importância na estruturação do microbioma da rizosfera (SHI et al., 2011; BADRI et al., 2013).

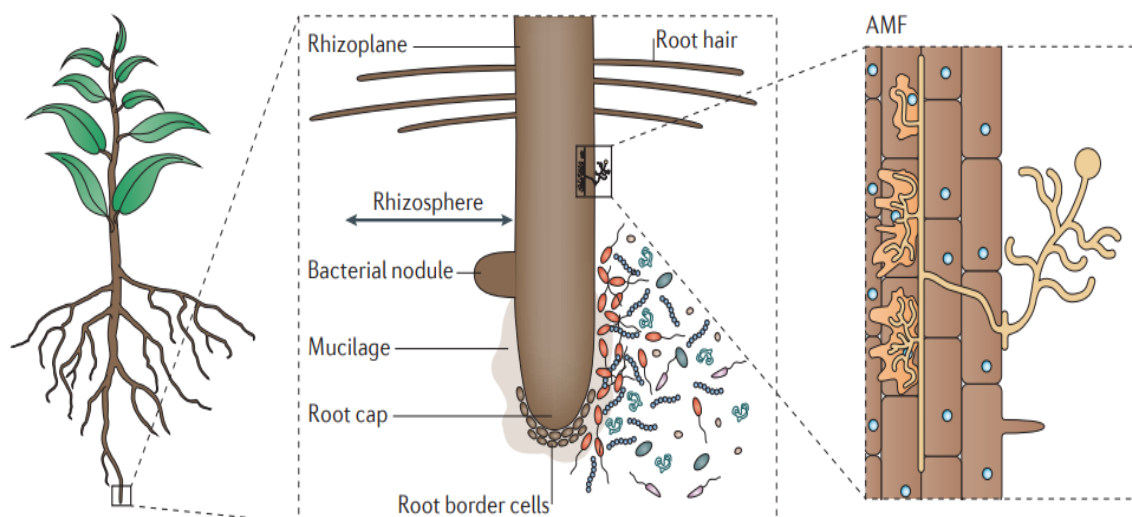


Figura 2 - A rizosfera: é uma zona estreita de solo (de alguns milímetros de largura) que envolve e é influenciada pelas raízes das plantas. O esquema mostra imagens ampliadas da rizosfera, contendo bactérias e fungos saprófitas e simbióticas, incluindo fungos micorrízicos arbusculares (FMA) (PHILIPPOT et al., 2013).

As bactérias associativas do tipo endofíticas (**Figura 3**), são bactérias que em algum momento conseguem colonizar os tecidos internos das plantas (endosfera) estabelecendo-se sem danificar ou prejudicar a hospedeira, e diferentemente dos endossimbiontes as bactérias endofíticas não residem dentro das células do hospedeiro e sim no espaço entre as células, podendo colonizar todos os tipos de tecidos e órgãos vegetais (VERMA & GANGE, 2014). Bactérias rizosféricas às vezes podem derivar-se em bactérias endofíticas (GUO et al., 2008; VERMA & GANGE, 2014), mas nem todas as bactérias endofíticas são derivadas de bactérias rizosféricas (MONTEIRO et al., 2012; SESSITSCH et al., 2012). Geralmente os microrganismos endofíticos de plantas não são considerados fitopatogênicos, mas dependendo dos fatores ambientais e/ou do genótipo da planta hospedeira, podem causar doenças (MONTEIRO et al., 2012). Os microrganismos endofíticos podem ser transmitidos para outras gerações de plantas por meio de sementes infectadas (TRUYENS et al., 2015), como também adentrar na planta hospedeira durante a abertura de estômatos (SHIMIZU, 2011) e através de ferimentos (MCCULLY, 2001; REINHOLD-HUREK & HUREK, 2011). Ainda conseguem colonizar regiões específicas dos tecidos da planta hospedeira ou se disseminarem por toda a planta utilizando os vasos condutores (VERMA & GANGE, 2014).

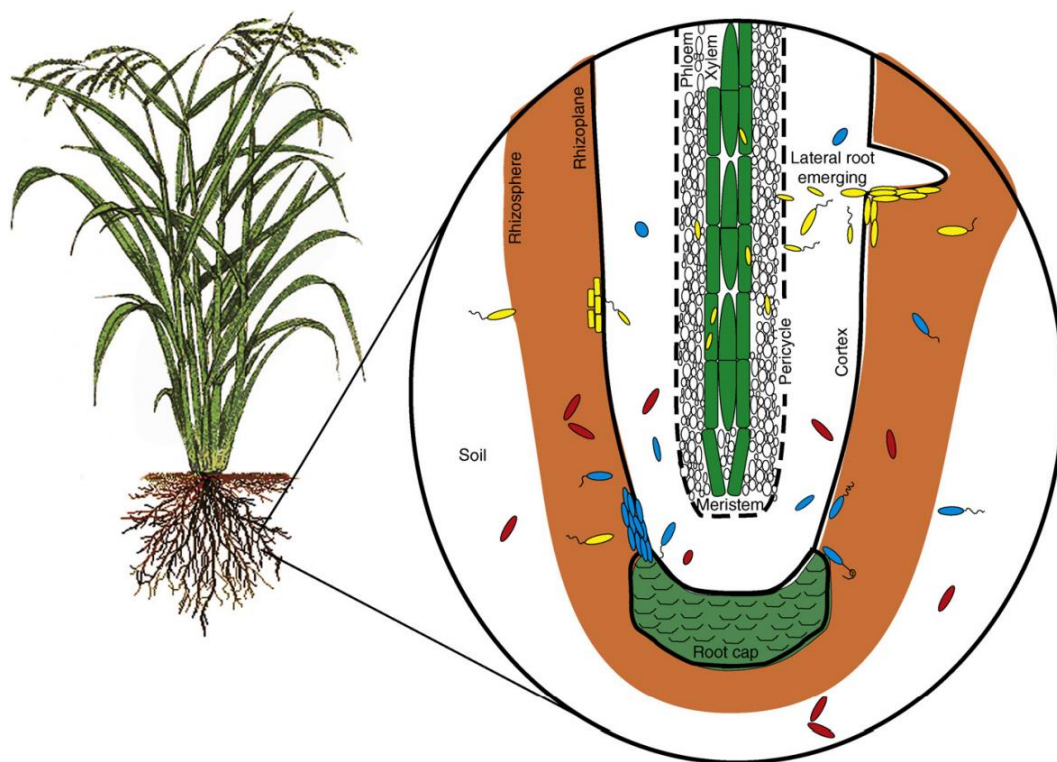


Figura 3 - Tipos de endófitos e seu processo de colonização radicular. Bactérias endófitas passageiras (células vermelhas) são frequentemente restritas ao tecido do córtex da raiz. Endófitos oportunistas (células azuis) apresentam características particulares de colonização das raízes. Endófitos competentes (células amarelas) são propostos para ter todas as propriedades de endófitos oportunistas e, além disso, estão bem adaptados ao ambiente da planta (HARDOIM; VAN OVERBEEK; VAN ELSAS, 2008).

Os endófitos, além de possuírem a habilidade para colonizar o interior de tecidos vegetais podem aumentar a resistência da planta a doenças, por produzirem metabólitos secundários que agem como antimicrobianos eliminando fitopatógenos (VERMA & GANGE, 2014). Além da espécie da planta e das propriedades do solo, os microrganismos endofíticos associados a uma planta medicinal podem influenciar nos compostos bioativos presentes nela (ZHAO et al., 20011). Em plantas medicinais, os endófitos associados podem vir a produzir os mesmos compostos da hospedeira (MEHANNI & SAFWAT, 2009; ZHAO et al., 2011), incluindo compostos que tenham efeito antimicrobiano (AKINSANYA et al., 2015). Egamberdieva et al. (2017) observaram que extratos de plantas medicinais abundantes em endófitos com atividades antagonistas, possuem atividade antimicrobiana contra uma variedade de bactérias patogênicas. O microbioma de uma planta acaba se tornando um fator determinante para a saúde da mesma (BERENDSEN; PIETERSE; BAKKER, 2012).

A importância das bactérias associativas para as plantas fica evidente devido à produção de substâncias produzidas pelas bactérias associativas promotoras de crescimento de plantas (BPCPs). As BPCPs conseguem promover o crescimento vegetal através de vários mecanismos diretos e/ou indiretos (HUNGRIA et al., 2010), produzindo metabólitos como fitohormônios (DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003), antibióticos (GUO et al., 2008;), mineralizando nutrientes do solo, solubilizando fosfato (BASHAN et al., 2008) ou fixando o nitrogênio atmosférico (DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003; BASHAN et al., 2008).

Entre os mecanismos diretos de promoção do crescimento vegetal utilizados pelas BPCPs estão a promoção de crescimento da planta por fixação do nitrogênio atmosférico (N₂) (HUNGRIA et al., 2010; FERREIRA et al., 2013), onde as BPCPs conseguem realizar afixação devido a complexos enzimáticos (nitrogenases) sintetizados pelo seu metabolismo (BALDANI et al., 2002); promoção de crescimento da planta através da solubilização do fosfato presente no solo, aumentando a concentração de (P) em solução, ocasionado pela excreção de ácidos orgânicos de baixo peso molecular ou então pela liberação de prótons H⁺ (GYANESHWAR et al., 2002; PEDRINHO et al., 2010); promoção do crescimento de raízes por produção de ácido indol-acético (AIA) induzindo o alongamento das células vegetais das raízes e conseqüentemente aumentando a absorção de nutrientes pelas raízes (TEIXEIRA et al., 2007; PEDRINHO et al., 2010).

A promoção indireta do crescimento vegetal promovida por BPCPs nas plantas pode ocorrer por meio de produção de compostos que tem efeito antimicrobiano, por exemplo, quando as BPCPs produzem enzimas líticas e antibióticos (COMPANT et al., 2005) que afetam de alguma forma o crescimento e desenvolvimento de fungos e bactérias fitopatogênicas. Ao se associar a uma planta, as BPCPs também podem produzir antimicrobianos e enzimas em resposta à competição de outros microrganismos, por espaço e

nutrientes na mesma planta hospedeira, tornando a hospedeira mais resistente a doenças (HALLMANN et al., 1997), e acabam por promover o crescimento vegetal indiretamente (CATTELAN, 1999) ao inibir microrganismos que são fitopatogênicos para a planta hospedeira. As BCPCs também podem produzir compostos como biossurfactantes (tensoativos) (KRUIJT; TRAN; RAAIJMAKERS, 2009) e sideróforos (quelantes) (TORTORA; DÍAZ-RICCI; PEDRAZA, 2011) que acabam agindo como antimicrobianos. Estes tipos de compostos conseguem atuar no biocontrole de fitopatógenos (BERIĆ et al., 2012; GLICK, 2012).

Os biossurfactantes são compostos com propriedades tensoativas, produzidos por microrganismos (RAAIJMAKERS et al., 2010) que possuem vantagens em relação aos detergentes sintéticos devido à sua baixa toxicidade e natureza altamente biodegradável (JOSHI et al., 2008). Podem apresentar atividade antimicrobiana (ONGENA et al., 2007; ARAUJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013) e influenciar a formação de biofilme bacteriano (RODRIGUES et al., 2006; ARAUJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013; SACHDEV & CAMEOTRA, 2013). A surfactina, por exemplo, é um biossurfactante que interfere em membranas contendo fosfolipídios que possuem cadeias mais curtas e/ou estão em organização fluída, conseqüentemente interferindo em suas funções biológicas por meio da inserção nas bicamadas lipídicas, modificando a permeabilidade da membrana (ONGENA et al., 2007) pela formação de canais iônicos ou por transportar cátions mono ou di-valentes e solubilizando a membrana por seu mecanismo detergente (ARAUJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013). Já os sideróforos, definidos como ligantes ou quelantes específicos de Fe^{+3} , são amplamente produzidos por espécies aeróbicas e facultativamente por espécies anaeróbicas, onde eles desempenham a função de sequestrar e transportar Fe^{+3} para o microrganismo produtor (DURAN & ESPOSITO, 2000; BENITE, DE PMACHADO; DA CMACHADO, 2002), tornando este nutriente indisponível para outros microrganismos, realizando

indiretamente um tipo de biocontrole. Os sideróforos são excretados sob condições de deficiência de ferro, contém sítios ligantes em sua estrutura e um aspecto comum entre estes sítios é sua capacidade em formar anéis quelatos muito estáveis com Fe^{+3} (BENITE, DE PMACHADO; DA CMACHADO, 2002).

As bactérias que se associam às plantas recebem atenção de vários estudos por que possuem um grande potencial biotecnológico que ainda pode ser ampliado com o uso de técnicas de biologia molecular e de melhoramento genético. Os metabólitos com ação antimicrobiana podem ser utilizados para controle biológico de pragas (BACILIO-JIMENEZ et al., 2001) sendo uma alternativa ao uso de agroquímicos que podem ser agressivos e que causam impacto ao meio ambiente e a saúde. Antimicrobianos, sideróforos, surfactantes e outros agentes bioativos (alcalóides, terpenóides e compostos aromáticos repelentes) tornam as bactérias associativas uma fonte para obtenção de novos fármacos (STROBEL, 2003). A indústria farmacêutica não seria a única a se beneficiar com as bactérias associadas as plantas, com o emprego destas bactérias que promovem o crescimento das plantas por fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato e produção de fitohormônios nas lavouras, seria possível impulsionar a produção agrícola tornando-a menos dependente de fertilizantes químicos que são caros e que podem poluir o ambiente garantindo uma forma de agricultura mais sustentável (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

As plantas as quais os microrganismos se associam acabam tendo também um papel importante, servem como habitats e reservatórios de biodiversidade de microrganismos (STROBEL, 2003; GUO et al., 2008; REN et al., 2014). Em uma planta pode haver uma diversidade de microrganismos que ainda não foram descobertos, estudados, classificados e que podem produzir substâncias bioativas sendo possível transforma-las através de processos em produtos agrícolas e farmacêuticos. Segundo Strobel (2003) cada planta, pertencente às 300.000 espécies (aproximadamente) de plantas descritas que existem na Terra, é uma

hospedeira de um ou vários tipos diferentes de microrganismos.

Sendo assim, há necessidade de se estudar espécies nativas medicinais que abrigam biodiversidade microbiana como a *B. dracunculifolia* DC. E que além de tomar conhecimento da diversidade microbiana, pouco conhecida, abrigada pelos vegetais também possa se tornar possível fazer o uso de microrganismos associados a plantas como uma nova fonte de compostos bioativos. Produtos que possam ser empregados na agricultura como agroquímicos ou biofertilizantes, na indústria como enzimas facilitadoras de reações importantes e na área da saúde como fármacos de ação antimicrobiana voltados para o combate a outros microrganismos patogênicos a fim de elevar a qualidade de vida do ser humano.

1.2. *Baccharis Dracunculifolia* DC

Segundo a World Health Organization (2002), plantas medicinais são espécies vegetais que podem ser cultivadas ou não e utilizadas com propósitos terapêuticos, já outros autores definiram plantas medicinais como plantas contendo compostos bioativos usados para curar doenças ou aliviar a dor (OKIGBO; EME; OGBOGU, 2008). Para Maciel et al. (2002) o uso de plantas medicinais está presente em muitos grupos humanos desde a antiguidade.

Nos dias de hoje o comércio informal de plantas medicinais é comum em muitos países subdesenvolvidos. Em regiões mais pobres do Brasil, pessoas cultivam plantas medicinais e também as comercializam (MACIEL et al., 2002). Os motivos pelos quais tornam os tratamentos de doenças à base de fitoterápicos ainda presentes nas sociedades são o acesso restrito que a população pobre tem as novas formas de tratamentos desenvolvidos na medicina convencional, o fácil acesso às plantas medicinais e por causa da tradição do uso destas plantas (JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Dentre as espécies vegetais medicinais nativas do Brasil, destacam-se aquelas do gênero *Baccharis* sp. (Asteraceae). Este gênero possui cerca de 500 espécies descritas, as

quais ocorrem comumente em regiões elevadas no Brasil, Paraguai, Uruguai, Bolívia, Argentina (BUDEL et al., 2004), México, Colômbia e Chile (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005). Entre as espécies mais conhecidas destacam-se *B. crispa*, *B. notoserghila*, *B. dracunculifolia*, *B. trimera*, *B. articulata* e *B. genistelloides*. As plantas deste gênero são utilizadas na medicina popular para fazer chás indicados para tratar problemas no estômago, fígado, inflamações, anemia, desintoxicação do organismo e outros males (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005).

A espécie *Baccharis dracunculifolia* (**Figura 4**) é nativa da América do Sul e ocorre principalmente na Argentina, Paraguai, Uruguai, Bolívia e Brasil. No Brasil a espécie é popularmente conhecida como alecrim-do-campo ou vassourinha e é encontrada nas regiões sul, sudeste, centro-oeste e em áreas de cerrado (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005). A alta concentração de espécies no Brasil e nos Andes indica que uma dessas áreas é o provável centro de origem desse gênero (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005).



Figura 4 - Indivíduos pertencentes à espécie *Baccharis dracunculifolia*.

É uma espécie de planta arbustiva, dioica e perene que pode atingir até 3 m de altura (BARROSO, 1976; BUDEL et al., 2004). Nas plantas do sexo masculino as flores apresentam

uma coloração amarelo-claro enquanto que em plantas do sexo feminino, as flores são brancas. (ESPÍRITO-SANTO et al., 2003). Sua morfologia apresenta ramos pilosos, ápices foliares ricos em glândulas, folhas alternas e lanceoladas. A *B. dracunculifolia* possui flores de tamanho pequeno e que se reúnem em 13 inflorescências que crescem nos brotos (ESPÍRITO-SANTO et al., 2003). Seu fruto do tipo aquênio (KLEIN & FELIPPE, 1992; GOMES & FERNANDES, 2002) é leve e fácil de ser disperso. É também considerada como espécie colonizadora produzindo grande número de frutos do tipo aquênios (KLEIN & FELIPPE, 1992) proliferando-se facilmente em pastagens e áreas perturbadas. *B. dracunculifolia* é uma espécie de planta colonizadora, que durante a sucessão ecológica surge no estágio de transição arbustivo-arbóreo (NETO et al., 2000), e que pode ser utilizada para a recuperação de áreas degradadas (GOMES & FERNANDES, 2002).

A espécie *B. dracunculifolia* se destaca também por ser a principal fonte de resina coletada por abelhas *Apis mellifera* para a produção da própolis verde (PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002; LEITÃO et al., 2004; ALENCAR et al., 2005) além disso, o própolis produzido pelas abelhas a partir de *B. dracunculifolia*, diferentemente dos outros, é o único que contém o artepilin C, que é o principal responsável pelas propriedades anticarcinogênicas do própolis verde (HATA et al., 2012). *A. mellifera* coleta resinas proveniente de diversas partes das plantas como gemas vegetativas, florais e exsudados foliares que serão utilizados na produção de própolis verde (BUDEL et al., 2004).

Algumas das propriedades medicinais da própolis incluem atividades anticancerígena (BUDEL et al., 2004), antiinflamatória (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005; KLOPELL et al., 2007), antimicrobiana (SFORCIN et al., 2000; LEITÃO et al., 2004; ADEMAR FILHO et al.; JORGE et al., 2008), antitripanossomal (CUNHA et al., 2004; PONTIN et al., 2008), anticariogênica (DUARTE et al., 2003) e antioxidante (KUMAZAWA et al., 2004; SIMÕES et al., 2004). Júnior et al. (2003) realizou experimentos *in vitro* e

observou que o extrato da própolis também pode ser utilizado para inibir a produção de gases (como o gás metano que contribui para o efeito estufa) provenientes da fermentação de microrganismos presentes no trato digestivo de ruminantes.

O potencial medicinal de *B. dracunculifolia* tem feito a espécie vegetal se tornar alvo de inúmeras pesquisas, Leitão et al. (2004) reportaram que os extratos das folhas de alecrim-do-campo apresentaram atividades biológicas que revelaram seu potencial terapêutico para a prevenção do desenvolvimento de cárie dental, abrindo caminho para criação de cremes dentais e enxaguatórios bucais a base do extrato da planta.

Devido a sua importância, têm sido realizados estudos de caracterização genética de *B. dracunculifolia* provenientes de diferentes altitudes do Estado de São Paulo visando identificar genes responsáveis pelas características de produção de óleos e de resinas usadas pelas abelhas, para que, por meio de técnicas de melhoramento genético seja possível aumentar a produção destes compostos bioativos (BELINI, 2015). Para produção de própolis verde, as abelhas coletam a resina quando as folhas estão novas, permitindo que uma mesma plantação seja usada para as duas finalidades (BELINI, 2015). As folhas de *B. dracunculifolia* são fonte de um óleo aromático que pode ser utilizado pela indústria de fármacos, alimentos e de cosméticos devido à presença de trans-nerolidol que pode atuar como flavorizante e fixador natural (KLOPELL et al., 2007; BELINI, 2015) e espatulenol com atividade antibacteriana (BELINI, 2015).

Ainda existem poucos estudos com as comunidades de microrganismos associados a espécie *B. dracunculifolia*. Os estudos realizados por Oki et al. (2009) e Cuzzi et al. (2012) que abordam a comunidade de fungos endofíticos presentes em *B. dracunculifolia*. Há também o estudo conduzido por Santana et al. (2016) com a comunidade de bactérias endofíticas presente em *B. dracunculifolia*. A realização de estudos com microrganismos que se associam a espécies vegetais é importante para expandir o conhecimento que se tem sobre a

diversidade microbiana, preservação de espécies de plantas e potencial biotecnológico.

1.3. Biossurfactantes

Biossurfactantes são compostos bioativos de origem microbiana, produzidos por fungos como os do gênero *Aspergillus* e bactérias dos gêneros *Streptomyces*, *Pseudomonas* e *Bacillus* (RAAIJMAKERS et al., 2010). Possuem as mesmas propriedades que os surfactantes, ou seja, possuem a capacidade de reduzir a tensão superficial ou a tensão interfacial devido à presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula (NITSCHKE et al., 2002; MARCHANT; BANAT, 2012). Outras propriedades importantes que os biossurfactantes possuem são: detergência, emulsificação, lubrificação e capacidade espumante (NITSCHKE et al., 2002; BARROS et al., 2008; DALVIN, 2011).

Segundo Gautam e Tyagi (2006), os biossurfactantes podem ser compostos por vários tipos estruturais orgânicos como, por exemplo: glicolipídeos, lipopeptídeos, complexos proteínas-polissacarídeos, fosfolipídeos, ácidos graxos e lipídeos neutros (COLLA & COSTA, 2003). Em *Bacillus subtilis*, existe uma variedade de produção de famílias de lipopeptídeos (como surfactina, iturina e fengicina) de moléculas anfifílicas cíclicas, compostas de sete (surfactinas e iturinas) ou 10 alfa-aminoácidos (fengicinas) ligados a um único ácido graxo beta-aminoácido (iturinas) ou beta-hidroxi (surfactina e fengicina) (ONGENA et al., 2007). O comprimento da cadeia desse ácido graxo pode variar de 13 a 16 carbonos para surfactinas, de 14 a 17 carbonos para iturinas e 14 a 18 para fengicinas (ONGENA et al., 2007).

Dentro da família das surfactinas estão os biossurfactantes mais potentes com maior capacidade de emulsão e propriedades espumantes (ONGENA et al., 2007; ONGENA et al., 2008). Os lipopeptídeos cíclicos permanecem estáveis a partir de 15 °C até 100 °C em valores

de pH de 3 a 11 (JOSHI et al., 2008), e ainda são mais tolerantes às enzimas microbianas, como as proteinases, mas são pouco estáveis em solventes orgânicos. Devido a estas propriedades, os lipopeptídeos possuem uma grande tolerância em condições ambientais (ONGENA et al., 2007).

Atualmente grande parte dos surfactantes utilizados para fins comerciais, industriais e de pesquisa são sintetizados quimicamente e em sua maioria são derivados do petróleo (JOSHI et al., 2008; NITSCHKE et al., 2002), deixando resíduos no decorrer do seu processo de produção, resíduos estes que impactam o meio ambiente e que não se degradam facilmente. Os biossurfactantes tem ganhado atenção devido as suas vantagens em relação aos surfactantes, tais como: toxicidade inferior, maior biodegradabilidade, melhor compatibilidade ambiental, maior formação de espuma, alta seletividade, atividade específica em condições extremas (temperatura, pH e salinidade) e a capacidade de ser sintetizado a partir de fontes renováveis (BARROS et al., 2008; JOSHI et al., 2008).

Os biossurfactantes possuem aplicação em diversas áreas como: medicina (atividade antibacteriana; antifúngica; antiviral e antitumoral), agricultura (formulações de herbicidas e pesticidas), mineração (flotação e separação de calcita e eschelita, prevenção da floculação e dispersão de misturas de pedra calcárea e água), farmácia (devido a sua compatibilidade com a pele, os biossurfactantes podem ser usados em produtos de higiene e cosméticos), indústria (formação da consistência e textura, dispersão de fase, solubilização de aromas, aplicação em panificação e emulsificação de gorduras) (NITSCHKE et al., 2002). O custo da produção de biossurfactantes pode ser reduzido pelo melhoramento de estirpes, otimização dos meios de cultivo ou pelo uso de substratos alternativos de baixo custo (JOSHI et al., 2008). No ano de 2016 o mercado global de biossurfactantes foi avaliado em cerca de US\$ 3,99 bilhões e está previsto que até o ano de 2022 esse mercado alcançará o valor de US\$ 5,52 bilhões (MARKETS AND MARKETS, 2017).

Os biossurfactantes produzidos por microrganismos além de terem propriedades tensoativas também possuem atividade antimicrobiana e estimulam o sistema imune das plantas que hospedam estes microrganismos. Os lipopeptídeos cíclicos são os mais adequados para a proteção de culturas de vegetais (ONGENA et al., 2007; ROMERO et al 2007; RAAIJMAKERS et al 2010). A atividade antibiótica é obtida com a destruição ou interferência nas propriedades da membrana de patógenos.

Devido à sua natureza anfifílica, podem facilmente associar-se e ancorar firmemente em camadas lipídicas e assim podem interferir com a integridade da membrana biológica de um modo dependente de dose. Surfactinas e outros lipopeptídeos são ineficazes em membranas de células vegetais devido aos fitoesteróis encontrados nas estruturas destas (ONGENA et al., 2007; ONGENA et al., 2008). Dessa forma a sensibilidade e especificidade da ação antimicrobiana dos lipopeptídeos residem na natureza da parede celular do patógeno e da parede celular do hospedeiro, mas alguns agentes patogênicos podem possuir paredes celulares que são resistentes a biossurfactantes (ARORA, 2015). Destacam-se as espécies dentro do gênero *Bacillus* como as mais promissoras devido a sua variedade de atividades de biocontrole positivo em plantas, incluindo a formação de biofilme e antagonismo (BAIS et al., 2004; KEARNS et al., 2005; ONGENA et al., 2007).

Segundo Ongena et al. (2008), estudos sobre vesículas lipídicas sugerem que a baixa concentração [razão de surfactina-para-lípido molar (Rb) $<0,04$ na membrana] induz perturbações limitadas nas superfícies de membranas. Na concentração intermediária (Rb 0,05-0,1) provocam uma permeabilização transitória, mas as membranas se reorganizam. Mas em proporções elevadas (Rb 0,1-0,2) ocorre formação irreversível de poros por causa da inserção de grupos ricos em surfactina na membrana (ONGENA et al., 2008). A adição posterior de surfactina para atingir a concentração micelar crítica (CMC) leva à completa solubilização e perturbação da bicamada lipídica com formação de micelas mistas (em Rb

0,22). Este processo de desestabilização da bicamada lipídica é facilitada pela forma tridimensional da molécula de surfactina com cadeias laterais carregadas que se projetam para a fase aquosa e porções apolares que se projetam no núcleo hidrofóbico da membrana (ONGENA et al., 2008). A presença de colesterol na camada fosfolipídica atenua o efeito desestabilizador das surfactinas. Os estudos também sugerem que a sensibilidade das membranas biológicas pode variar de um modo específico, dependendo do teor de esteróis dos organismos alvo. Isto poderia explicar porque surfactinas exibem ação hemolítica, antiviral, antimicoplasma e atividades antibacterianas (ONGENA et al., 2008).

Outro tipo de emprego importante dos biossurfactantes é a biorremediação de águas e solos contaminados com derramamento de óleos, por aumentarem a interação superficial A/O (emulsões onde a fase contínua é o óleo) e dessa forma acelerando o processo de degradação de óleos pela atividade de microrganismos promovendo a biorremediação nos ambientes contaminados (NITSCHKE et al., 2002). Para a biorremediação podem ser adicionados ao ambiente contaminado microrganismos produtores de biossurfactantes ou fatores de crescimento de microrganismos selvagens presentes no ambiente capazes de produzir estes compostos (NITSCHKE et al., 2002).

Entre as bactérias que são conhecidas por serem produtoras de biossurfactantes encontram-se espécies como *Pseudomonas aeruginosa* (mono- e di-ramnolipídeos), *Rhodococcus erythropolis* (fosfolipídeos glicolipídeos, etc.), *Bacillus subtilis* (surfactina), *Bacillus licheniformis* (lipopeptídeos) e *Arthrobacter paraffineus* (trealose e lipídeos sucrose) (CHRISTOFI & IVSHINA, 2002), *Pseudomonas fluorescens* (lipopeptídeos e lipoproteínas), *Serratia marcescens* (lipopeptídeos e lipoproteínas), *Corynebacterium lepus* (ácidos graxos), *Nocardia erythropolis* (lipídeos neutros), *Thiobacillus thiooxidans* (fosfolipídeos), *Acinetobacter calcoaceticus* (surfactantes poliméricos) e *Acinetobacter radioresistens* (surfactantes poliméricos) (BUENO, 2008).

O gênero *Bacillus* se destaca por possuir membros produtores de biossurfactantes que podem ser uma alternativa aos surfactantes sintéticos, proporcionando vantagens como biodegradabilidade e baixa toxicidade (ANGELINI et al., 2009). Estirpes de *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* foram descritas por produzir diferentes lipopeptídeos antimicrobianos (PEREZ, 2017). Alguns lipopeptídeos de *Bacillus* têm potencial para aplicações na atividade antagonica contra uma ampla gama de fitopatógenos e também na promoção de mecanismos de defesa da hospedeira através da interação benéfica de espécies de *Bacillus* com plantas (ONGENA & JACQUES, 2008). Para Yang, Wei, Mu (2006) e Silva et al. (2014) existem lipopeptídeos produzidos por espécies de *Bacillus* que podem ser promissores agentes antitumorais, antivirais e antimicoplasma.

Há também fungos envolvidos na produção de surfactantes como as leveduras *Torulopsis* sp. (soforolipídeos) (CHRISTOFI & IVSHINA, 2002) e *Candida* sp. (surfactantes poliméricos) (CHRISTOFI & IVSHINA, 2002; BUENO, 2008).

Inicialmente foi observado que bactérias de solo produziam biossurfactantes para ter acesso a fontes de carbono hidrofóbicas (BURCH et al., 2014). Posteriormente foram sendo descobertas outras funções que os biossurfactantes desempenhavam para as bactérias que os sintetizavam (BURCH et al., 2014), motilidade (SACHDEV & CAMEOTRA, 2013), antagonismo como na desestabilização da membrana de outros microrganismos (ONGENA et al., 2007; ONGENA et al., 2008), solubilizando hidrocarbonetos, solubilizando compostos insolúveis em água (ARAUJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013), pela participação na formação de biofilme bacteriano (LOH et al. 2002; NEWTON & FRAY 2004; SACHDEV & CAMEOTRA, 2013) e também pelo impedimento da formação do biofilme (alterando a hidrofobicidade de superfícies e conseqüentemente alterando a capacidade de adesão dos microrganismos a elas) (ARAUJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013). A capacidade de motilidade e de formação de biofilme nas superfícies vegetais fazem com que os biossurfactantes

também sejam necessários para as bactérias conseguirem estabelecer associações com as plantas (LOH et al. 2002; NEWTON & FRAY 2004; SACHDEV & CAMEOTRA, 2013).

Segundo os autores Sachdev & Cameotra (2013), as rizobactérias produzem biossurfactantes que aumentam a disponibilidade de nutrientes de moléculas hidrofóbicas e os microrganismos do solo produzem biossurfactantes que mantêm uma distribuição adequada de fertilizantes químicos no solo. Para Burch et al. (2014), biossurfactantes são uma adaptação que contribuem para a sobrevivência das bactérias epifíticas, pelo aumentando da motilidade das células bacterianas e/ou capacidade de adquirir nutrientes. Ainda em seu estudo, Burch et al. (2014) testou uma estirpe bacteriana de *Pseudomonas syringae* e observou, que, o microrganismo conseguiu aumentar a taxa de difusão de água através de cutículas isoladas da espécie vegetal *Prunus laurocerasus* para as superfícies hidrofóbicas expostas a alta umidade relativa do ar, segundo o autor isso ocorreu por causa das propriedades higroscópicas da seringafactina, o biossurfactante produzido pelo microrganismo. E ainda supõem-se, que biossurfactantes além de facilitarem a mobilidade e obtenção de água para os microrganismos epifíticos, também facilitam a obtenção de nutrientes (LINDOW & BRANDL, 2003; BURCH et al., 2014).

1.4. Identificação molecular de bactérias: Gene *16S rRNA*

O gene 16S RNA ribossomal é o principal gene utilizado em estudos de ecologia (CASE et al. 2007), taxonomia e filogenia (JANDA & ABBOTT, 2007) microbianas como um “gene barcode” para quantificar a estrutura e diversidade da comunidade microbiana (PACE, 1997; HUGENHOLTZ; GOEBEL; PACE, 1998). Em sua estrutura o gene *16S rRNA* apresenta uma sequência que é constituída por nove regiões que são hipervariáveis (VAN DE PEER; CHAPELLE; DE WACHTER, 1996) flanqueadas por regiões conservadas e desta forma, é possível amplificar por PCR as sequências alvo utilizando primers universais

(BAKER; SMITH; COWAN, 2003).

O *16S rRNA* é um dos componentes da subunidade 30S dos ribossomos de procariotos e sua sequência gênica (*16S rDNA*) tem 1500 pares de base sendo por isso, mais informativa que o gene 5S rRNA com 120 pares de bases e que é componente da subunidade 50S do ribossomo procariótico (WOESE, 1987; AMARAL NASCIMENTO, 2011). Além disso, o gene *16S rRNA* requer menos trabalho para análises em comparação com o gene 23S rRNA que também faz parte da subunidade 50S e que possui uma sequência de 3000 pares de bases (WOESE, 1987; AMARAL NASCIMENTO, 2011). Segundo Cheneby et al. (2000), o sequenciamento total ou parcial do gene *16S rRNA* além de permitir a identificação de bactérias a nível de gênero também permite fazer conexões do genótipo e o ambiente estudado. E ainda em alguns casos é possível realizar a identificação bacteriana até o nível de espécie (CHENEBY et al., 2000).

A frequente utilização do gene *16S rRNA* como um gene barcode ocorre por conta de várias características do gene como o fato dele ser universal entre organismos dos domínios Bacteria e Archaea (PACE, 1997; KEMBEL et al., 2012), é filogeneticamente informativo (KEMBEL et al., 2012), e a sequência gênica contém regiões conservadas, variáveis e hipervariáveis (DAS et al., 2014).

A técnica de identificação bacteriana baseada na sequência do gene *16S rRNA* possui várias vantagens como: identificação rápida e precisa em comparação com técnicas como cromatografia gasosa e espectroscopia de massa (CLARRIDGE, 2004; KEMBEL et al., 2012), isolados que apresentam morfologia incomum também podem ser identificados (GEE et al., 2004) e ainda é possível realizar descobertas de novos gêneros bacterianos e até mesmo espécies quando se combina a técnica baseada na sequência do gene *16S rRNA* com técnicas de sequências de outros genes (STALEY, 2006). Mas a técnica de identificação bacteriana baseada na sequência do gene *16S rRNA* também possui limitações, por exemplo, quando é

utilizada como marcador taxonômico em gêneros como *Brucella* que possui a sequência do gene *16S rRNA* muito conservada (DO NASCIMENTO et al., 2017). A técnica também acaba se tornando limitada quando há variações de nucleotídeos entre vários óperons do rRNA de um genoma (DO NASCIMENTO et al., 2017). A ocorrência de transferência lateral e recombinação do material genético também impedem que a técnica possa refletir com precisão a filogenia procariótica (DO NASCIMENTO et al., 2017).

Segundo Caporaso et al. (2011) resultados de pesquisas baseados em técnicas de identificação bacteriana com o gene *16S rRNA* podem ser utilizadas para documentar a biodiversidade inexplorada e as características ecológicas de qualquer comunidade inteira ou taxa microbiana individual. Alguns estudos sugeriram que pequenos fragmentos do gene *16S rRNA* com tamanho de 100 pb podem ser suficientes para esclarecer as diferenças entre comunidades microbianas (LIU et al., 2007). O sequenciamento do gene *16S rRNA* permitiu a identificação e o estabelecimento de relações eficazes entre um grande número de espécies do gênero *Bacillus* (GOTO et al., 2000). Antes dos avanços da engenharia genética a identificação das espécies de *Bacillus* era realizada considerando critérios morfológicos e fisiológicos, demandando um alto nível de habilidade e tempo (GOTO et al., 2000).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este trabalho teve o propósito de identificar bactérias pertencentes a comunidade microbiana associada à espécie vegetal *B. dracunculifolia* e verificar se estas bactérias possuem capacidade de produzir compostos biossurfactantes.

2.2. Objetivo específicos

- Isolar bactérias do solo, da endosfera e da rizosfera de *B. dracunculifolia* utilizando diferentes meios de cultivo;

- Analisar a densidade populacional de bactérias associadas à *B. dracunculifolia*;

- Realizar a bioprospecção de microrganismos produtores de biossurfactantes utilizando ensaios bioquímicos;

- Realizar a identificação molecular dos isolados pelo sequenciamento do gene *16S rRNA*;

- Construir árvores filogenéticas dos gêneros encontrados;

3. ARTIGO

Diversidade e Produção de Biossurfactantes de Bactérias Associativas de *Baccharis dracunculifolia* DC

Diversity and Production of Biosurfactants of *Baccharis dracunculifolia* DC Associated Bacteria

Artigo a ser submetido ao periódico *Research in microbiology*

Diversidade e Produção de Biossurfactantes de Bactérias Associativas de *Baccharis dracunculifolia* DC

Venancio, D.C.^{1*}; Rodrigues, E.P.¹; Barcellos, F.G.¹; Jardim, A.C.M.¹; Alves, L.M.¹

¹Laboratório de Genética de Microrganismos (LAGEM), Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, Brasil.

*Autor correspondente: Departamento de Biologia Geral - CCB. Universidade Estadual de Londrina - Campus Universitário. (e-mail: douglas.13693@gmail.com).

RESUMO

A microbiota associativa e endofítica de plantas medicinais nativas pode representar uma fonte de novos compostos, relevantes na interação com a planta e com diversas aplicações biotecnológicas, como é o caso dos biossurfactantes. A espécie medicinal *Baccharis dracunculifolia* DC (alecrim-do-campo) vem se tornando alvo de estudos devido ao potencial terapêutico que apresenta e por ser a fonte de matéria prima da própolis verde. O objetivo deste trabalho foi identificar bactérias associadas a espécie vegetal *B. dracunculifolia* DC e verificar se estão presentes nesta planta bactérias associativas com capacidade de produzir compostos do tipo biossurfactante. Para isso, amostras de raízes e solo foram coletadas, processadas, plaqueadas em três diferentes meios de cultivo, com a densidade populacional contabilizada por 20 dias após o período de incubação. Posteriormente foram feitos o isolamento e purificação de bactérias morfologicamente distintas. A técnica de sequenciamento parcial do gene *16S rRNA* foi utilizada para identificar o gênero dos isolados obtidos. A metodologia do colapso da gota, espalhamento de óleo e índice de emulsão revelam a capacidade de produzir biossurfactantes dos isolados. Foi possível obter 76 isolados dos quais 48 foram identificados, entre estes haviam representantes de 14 gêneros de bactérias. O ensaio de colapso da gota selecionou 27 isolados positivos para produção de biossurfactante, enquanto que, 12 isolados formaram halos no ensaio de espalhamento de óleo e 18 conseguiram produzir emulsões, dois isolados apresentaram bons resultados nos ensaios de espalhamento de óleo e índice de emulsão. O isolado 48 (com halo de solubilização de óleo de 74 mm e um índice de emulsão de 72%) e o isolado 130 (com halo de solubilização de óleo de 52 mm e um índice de emulsão de 62%) provenientes do solo e do interior de raízes, respectivamente. Os isolados 48 e 130 foram identificados como representantes dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus*, respectivamente. Através dos resultados obtidos, pode-se concluir que *B. dracunculifolia* DC apresenta uma microbiota bacteriana diversa com presença de bactérias capazes de produzir compostos do tipo biossurfactantes.

Palavras-chave: rizobactéria, endófitos, tensoativos, surfactantes, alecrim-do-campo

3.1. Introdução

Bactérias associativas, podem estabelecer diferentes associações com as plantas em diferentes níveis. Estima-se que cada planta que existe na Terra, é uma hospedeira de vários tipos de microrganismos (STROBEL, 2003; REN et al., 2014), e muitas vezes abrigam uma biodiversidade microbiana pouco conhecida (GUO et al., 2008). Bactérias associadas as plantas podem ocasionar efeitos classificados como benéficos, deletérios ou neutros, com base em como interferem no crescimento da planta hospedeira (DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003).

Bactérias associadas as plantas podem ser encontradas nas partes aéreas da planta (BERG, 2014), na região da rizosfera (GARCIA; KNAAK; FIUZA, 2015) e no interior dos tecidos e órgãos vegetais (BERG, 2014; VERMA & GANGE, 2014). Existem vários tipos de bactérias associativas de plantas. As bactérias epifíticas são aquelas bactérias que são adaptadas a sobrevivência na superfície das folhas das plantas (filosfera) (VANDENKOORNHUYSE et al., 2015); as rizobactérias são bactérias que colonizam a rizosfera e o rizoplane (GARCIA; KNAAK; FIUZA, 2015) atraídas pelos exsudatos radiculares (ARORA, 2001); as bactérias endofíticas colonizam os tecidos internos das plantas (endosfera) e habitam o espaço entre as células (VERMA & GANGE, 2014).

Muitas vezes as bactérias que se associam as plantas podem originar relações de interações benéficas promovendo o crescimento vegetal (HUNGRIA et al., 2010), estas são chamadas de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs). As BPCPs conseguem promover o crescimento vegetal por meio de mecanismos diretos como a fixação de nitrogênio atmosférico (HUNGRIA et al., 2010; FERREIRA et al., 2013), produção de fitohormônios como ácido indol-acético (AIA) (TEIXEIRA et al., 2007; PEDRINHO et al., 2010) e disponibilizando fósforo pela solubilização de fosfato (GYANESHWAR et al., 2002; PEDRINHO et al., 2010). As BPCPs também podem promover o crescimento vegetal pelos

mecanismos indiretos como produção de enzimas líticas e antibióticos (COMPANT et al., 2005) que promovem o crescimento vegetal de maneira indireta por inibir microrganismos que são fitopatogênicos para a planta hospedeira.

Bactérias associativas também podem produzir compostos bioativos como biossurfactantes que são produzidos por vias metabólicas secundárias (GAUTAM & TYAGI, 2006) e que podem ter várias aplicações como antagonismo de fitopatógenos (ONGENA et al., 2008) e biorremediação de ambientes que foram contaminados por óleo (NITSCHKE et al., 2002). Os biossurfactantes assim como os surfactantes conseguem reduzir a tensão superficial e possuem grupos hidrofílicos e hidrofóbicos em suas moléculas (NITSCHKE et al., 2002; MARCHANT; BANAT, 2012) e podem atuar como emulsificantes, lubrificantes e espumantes (NITSCHKE et al., 2002; BARROS et al., 2008; DALVIN, 2011). No ano de 2016 o mercado global de biossurfactantes foi avaliado em cerca de US\$ 3,99 bilhões e está previsto que até o ano de 2022 esse mercado alcançará o valor de US\$ 5,52 bilhões (MARKETS AND MARKETS, 2017).

No estudo conduzido por Snook et al. (2009), os autores relatam a atividade antagonista de lipopeptídeos produzidos por uma estirpe bacteriana endofítica de *Bacillus mojavensis* contra o fungo fitopatogênico *Fusarium verticillioides*. Os biossurfactantes ainda possuem várias vantagens em relação aos surfactantes como toxicidade inferior, maior biodegradabilidade, melhor compatibilidade ambiental, maior formação de espuma, alta seletividade, atividade específica em condições extremas (temperatura, pH e salinidade) e a capacidade de ser sintetizado a partir de fontes renováveis (BARROS et al., 2008; JOSHI et al., 2008). Ainda, o custo da produção de biossurfactantes pode ser reduzido pelo melhoramento de estirpes, otimização dos meios de cultivo ou pelo uso de substratos alternativos de baixo custo (JOSHI et al., 2008).

As bactérias associativas produzem biossurfactantes pelo papel que estes compostos

desempenham nos processos de sinalização de regulação de densidade populacional (DUSANE et al., 2010), motilidade bacteriana (SACHDEV & CAMEOTRA, 2013), desestabilização da membrana de outros microrganismos (ONGENA et al., 2007; ONGENA et al., 2008) e pela participação na formação do biofilme bacteriano (LOH et al. 2002; NEWTON & FRAY 2004; SACHDEV & CAMEOTRA, 2013) ou pelo impedimento da formação do biofilme (ARAUJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013) de outras bactérias. Os biosurfactantes também acabam se tornando necessários para as bactérias associativas de plantas principalmente para colonizar e estabelecer relações com as plantas através da motilidade e formação de biofilme (LOH et al. 2002; NEWTON & FRAY 2004; SACHDEV & CAMEOTRA, 2013).

Um dos gêneros de plantas que se destaca pelo seu potencial medicinal no Brasil é o gênero *Baccharis* sp. da família Asteraceae. É um gênero que contém mais de 500 espécies de plantas com ocorrência comum em países do continente Sul-Americano como o Brasil (BUDEL et al., 2004 ; VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005). As plantas deste gênero são utilizadas na medicina popular para fazer chás indicados para tratar inflamações, úlceras, problemas digestivos, intoxicações e outras doenças (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005). Entre as espécies deste gênero, *Baccharis dracunculifolia* DC tem se tornado alvos de estudos devido ao seu potencial terapêutico (FERRONATTO et al., 2007; SOARES et al., 2015).

No Brasil, *B. dracunculifolia* é popularmente conhecida como alecrim-do-campo ou vassourinha e na medicina popular é utilizada para tratamento de distúrbios gástricos, úlceras, intoxicações e inflamações (BUDEL et al., 2004). Esta espécie também é a principal fonte de resinas de gemas vegetativas e exsudatos foliares utilizados pelas abelhas *Apis mellifera* na produção de própolis verde, o qual tem valor comercial (BUDEL et al., 2004; ALENCAR et al., 2005) devido as suas propriedades antimicrobianas, cicatrizantes e anestésicas

(ALENCAR et al., 2005) além disso o estudo realizado por Onofre e Steilmann (2012) revelou que a microbiota associada a *B. dracunculifolia* possui potencial biotecnológico.

Portanto, este trabalho teve o propósito de identificar a nível de gênero, bactérias associadas a espécie vegetal *B. dracunculifolia* e também verificar se estes microrganismos associativos possuem capacidade de produzir compostos do tipo biossurfactante.

3.2. Materiais e métodos

Coleta do material vegetal e processamento das amostras

Amostras de solo e de raízes de plantas saudáveis de alecrim-do-campo (*B. dracunculifolia*) foram coletadas em local de ocorrência natural da espécie no distrito de Warta (23°13'46.7"S 51°09'02.3"W) pertencente ao município de Londrina-PR. As amostras foram reunidas para constituir três amostras compostas de solo (quatro subamostras de solo por amostra composta de solo) e três amostras compostas de raízes (quatro subamostras de raízes por amostra composta de raíz). As amostras foram transportadas em caixa térmica com gelo até o Laboratório de Genética de Microrganismos (LAGEM-UEL) e imediatamente processadas.

Amostras de raízes (2 g) de cada amostra composta (A1, A2 ou A3) foram transferidas para um frasco contendo 100 mL de água peptonada tamponada (1 g/L de peptona; 0,5 g/L de NaCl; 0,35 g/L de Na₂HPO₄; 0,15 g/L de KH₂PO₄; pH ajustado para 6,5) e homogeneizadas por 30 segundos no agitador tipo vortex, seguido de agitação em aparelho sonicador (potência 100% e frequência de 80 Hz) por 30 segundos. A suspensão obtida (1 mL) constituiu a suspensão de células da rizosfera, sendo diluída seriadamente até 10⁻⁸ em tubos de ensaio com 9 mL de salina (0,85%) e utilizada para isolamento das bactérias. Após, as raízes foram tratadas com cloramina-T a 1% por 40 minutos e lavadas com solução salina 0,85% por 15 minutos, seguido de três lavagens de 5 minutos com água destilada esterilizada.

As raízes foram maceradas em 100 mL de água peptonada tamponada e a suspensão obtida (1 mL) constituiu a suspensão de células endofíticas, foi diluída seriadamente até 10⁻⁵ em tubos de ensaio contendo 9 mL de salina (0,85%) e, em seguida, utilizada para isolamento das bactérias. A água da última lavagem (cerca de 0,1 mL) foi plaqueada em meio ágar-batata-dextrose TSA (Tryptone Soya Agar, Himedia) e cultivada a 28 °C por 4 dias para avaliação da eficiência da desinfestação superficial.

As amostras de solo (2 g de cada amostra composta A1, A2 ou A3) foram adicionadas em um erlenmeyer (250 mL) com 100 mL de água peptonada tamponada e depois de agitadas por 30 segundos em um aparelho vortex, foram agitadas em aparelho sonicador (potência 100%, frequência de 80Hz, 30 segundos). Posteriormente ao tratamento anterior, 1 mL da solução foi transferido para tubos de ensaio com 9 mL de salina (0,85 %), diluído até 10^{-8} e, em seguida, utilizada para isolamento das bactérias.

Plaqueamento, isolamento e preservação das culturas

As quatro últimas diluições das suspensões obtidas (conforme descrito acima) foram plaqueadas (0,1 mL de cada diluição) nos meios BA (caldo de 200 g/L de batata cozida; 15 g/L de ágar; pH para 6,5), YCED (0,3 g/L de caseína hidrolisada; 0,3 g/L de extrato de levedura; 0,3 g/L de glicose dextrose; 18 g/L de Agar; 0,3 g/L de K_2HPO_4 ; pH 6,5) conforme Crawford et al. (1993) e no meio R2A (0,5 g/L de extrato de levedura; 0,5 g/L de peptona; 0,5 g/L de caseína hidrolisada; 0,5 g/L de glicose dextrose; 0,5 g/L de amido solúvel; 0,3 g/L de piruvato de sódio; 0,3 g/L de K_2HPO_4 ; 0,05 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 15 g/L de ágar; pH 6,5) conforme Reasoner e Geldreich (1985).

As culturas foram cultivadas em B.O.D. a 28° C por até 30 dias. Durante este período, foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs) por g de peso fresco e as médias dos dados obtidos foram submetidas ao ensaio estatístico de Duncan (ensaio de comparação múltipla), sendo as colônias morfologicamente distintas coletadas e cultivadas em meio TSA (Tryptone Soya Agar, Himedia) a 28° C para purificação. Os isolados obtidos foram cultivados em meio líquido TSB (Tryptone Soya Broth, Himedia) por 72 horas a 120 rpm e após, as culturas foram homogeneizadas com glicerol esterilizado (1:1 v/v) e armazenadas a -20 °C.

Produção de biossurfactantes

O primeiro e mais simples ensaio realizado para detecção da produção de biossurfactantes pelos isolados foi baseado na técnica de colapso de gota adaptada de Youssef et al. (2004). Os isolados foram inoculados em tubos de ensaio contendo 5 mL meio líquido TSB (Tryptone Soya Broth, Himedia) e incubados durante 5 dias a 120 rpm e 28° C. A suspensão obtida (pre-inóculo) foi inoculada (10µL) em placas Deep-Well de 24 poços contendo 6 mL de meio mínimo como descrito por Vogel (1956) e incubados durante 7 dias em agitação (120 rpm) e temperatura de 28° C. Após crescimento, cerca de 10 µL de cada suspensão celular foi adicionado à superfície da tampa da placa Deep-Well previamente preparada com uma fina e homogênea camada de óleo mineral. Após 1 minuto de estabilização, o formato da gota foi observado. A presença de biossurfactantes foi caracterizada pelo espalhamento da gota sobre a superfície e os isolados positivos foram classificados conforme o nível de espalhamento: baixa (+), média (++) e alta (+++) produção.

O ensaio de espalhamento de óleo foi realizado em duplicata conforme as condições estabelecidas por Morikawa, Hirata e Imanaka (2000) mas com modificações. Neste ensaio 30 µL de petróleo bruto foram adicionados na superfície de 20 mL de água destilada em uma placa de Petri (de 10 cm de diâmetro) formando uma fina camada de óleo. Posteriormente uma alíquota de 30 µL do sobrenadante de cultura em meio Vogel foi depositado no centro da camada de óleo formada sobre a água. O biossurfactante foi detectado em sobrenadante de culturas que conseguiram formar um halo claro na superfície do óleo. Neste ensaio foi utilizada água destilada como controle negativo, os valores de diâmetro de halo de cada isolado testado foram medidos e comparados aos valores de halo obtidos com diferentes concentrações de uma curva de dodecil sulfato de sódio (SDS) nas concentrações de [0,03%], [0,06%], [0,125%], [0,25%] e [0,5%] (**Anexo 1**).

Para verificar a capacidade de formar emulsões foi feito o índice de emulsão com 24 horas (IE₂₄) (em duplicata), foi utilizado o protocolo estabelecido por Cooper e Goldenberg (1987) com modificações. As culturas líquidas de cada isolado em meio Vogel foram centrifugadas (4.000 rpm, 15 min) e uma alíquota do sobrenadante (2 mL) foi transferido para um tubo de ensaio onde foi adicionado 4 mL de querosene comercial como hidrocarboneto. A altura total do conteúdo líquido dentro do tubo foi medida e então os tubos foram agitados no aparelho vortex por 2 minutos para obtenção da emulsão. A altura da emulsão no tubo foi medida após 24 horas e os valores de índice de emulsão foram obtidos pela equação: [(altura da emulsão/altura total) x 100%].

Extração e amplificação do 16S rDNA

Para extração do DNA total os isolados foram cultivados por até 72 horas em meio de cultura líquido TSB. A cultura (1 mL) foi centrifugada (10000 rpm por 5 minutos) e o precipitado obtido foi ressuspenso em 1 mL de água destilada esterilizada e transferido para um microtubo contendo Beads 0,1 mm (20 mg). A suspensão foi centrifugada (12000 rpm por 5 minutos) e o precipitado celular foi ressuspenso em 200 µL de buffer A (triton 2%; SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl (pH 8) 10 mM e EDTA (pH 8) 1mM) e 200 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), seguido de vigorosa homogeneização no vortex por 5 minutos. O lisado foi homogeneizado com 200 µL de TE 10X (pH 8), centrifugado (12000 rpm, 5 min, 4°C) e a fase aquosa (350 µL) obtida foi transferida e homogeneizada com 1 volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Após a centrifugação (12000 rpm, 5 min, 4°C), a fase aquosa formada (350 µL) contendo DNA total foi transferida e homogeneizada com 2 µL de RNase (10 ng/mL). Após tratamento por 15 minutos a 37°C, o DNA foi homogeneizado com 350 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), centrifugado por 5 minutos (12000 rpm, 4°C) e a fase aquosa (350 µL) transferida. O DNA foi precipitado com 1

mL de etanol absoluto gelado (2 h a -20°C), centrifugado (12000 rpm, 10 minutos, 4°C), seco à temperatura ambiente, ressuscitado em 50 µL de TE (pH 8) e armazenado a -20°C. A quantidade e a qualidade do DNA obtido, foi analisada com eletroforese em gel de agarose (0,8%) com tampão TBE 0,5X a 5 V/cm por 50 minutos, a coloração do gel foi realizada com brometo de etídeo (0,5 µg/mL). As imagens do gel foram digitalizadas com o fotodocumentador L-PIX EX Molecular Imaging (Loccus Biotecnologia) sob luz ultravioleta (UV).

Depois de obter o DNA extraído, as amostras de DNA foram utilizadas como molde para amplificação do gene *16S rRNA*, para isto foram utilizados os primers 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1429r (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (MILLER et al., 2013). Para a mistura da reação de PCR foram adicionados: 0,2 mM de dNTPs; tampão de PCR 1x; 1,5 mM de MgCl₂; 0,1 pmol de cada primer; 1,25 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 1 µL de DNA extraído, em um volume final de 25 µL. A reação foi realizada em um termociclador AmpliTherm™ usando um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 2 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos; anelamento a 55°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos, com um ciclo para finalizar a extensão de 72°C por 10 minutos e manutenção a 4°C.

Os produtos de PCR foram purificados com a adição de um volume de acetato de amônio (7,5 M) e três volumes de etanol absoluto gelado (96%), e incubação por 15 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, os produtos de PCR foram centrifugados por 15 minutos (12000 rpm, a 4°C) e posteriormente tiveram o sobrenadante descartado por inversão do microtubo. Então foi adicionado três volumes de etanol gelado (70%) e centrifugado por 10 minutos (1200 rpm, a 4°C), com o sobrenadante sendo descartado após a centrifugação. O precipitado foi deixado para secar a 37°C e depois foi ressuscitado em 25-50 µL de água ultra-pura esterilizada. A visualização dos fragmentos amplificados por PCR foi feita por

eletroforese em gel de agarose (1%) com tampão TBE 0,5X a 5 V/cm por 90 minutos usando marcador molecular λ de 30 ng. O gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 $\mu\text{g/mL}$). As imagens do gel foram digitalizadas com o fotodocumentador L-PIX EX Molecular Imaging (Loccus Biotecnologia) sob luz ultravioleta (UV).

Depois de obter o DNA purificado, foram realizadas as reações de sequenciamento parcial do gene *16S rRNA* com as amostras purificadas, para isto foi utilizado o primer 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'). Para a mistura da reação de sequenciamento foram adicionados: 2,34 μL de tampão de sequenciamento para BigDye; 0,1 pmol do primer; 0,66 μL de BigDye e 1 μL de DNA purificado, em um volume final de 10 μL . A reação de sequenciamento foi realizada em um Termociclador AmpliTherm™ usando um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 segundos; anelamento a 50°C por 45 segundos e extensão a 60°C por 3 minutos, com um ciclo para finalizar a extensão de 60°C por 10 minutos e manutenção a 4°C.

Para precipitação da reação de sequenciamento, as amostras de DNA foram adicionadas em uma microplaca. Em cada poço da microplaca foi adicionado 2,5 μL de EDTA (125mM) e homogeneizado. Também foi adicionado 30 μL de etanol absoluto e homogeneizado. Em seguida, a microplaca foi incubada por 15 minutos em temperatura ambiente (25° C) e depois centrifugada por 30 minutos a 3000 rpm. Posteriormente o sobrenadante foi descartado por inversão. Foram adicionados 30 μL de etanol (70%) e centrifugados por 15 minutos a 3200 rpm, o sobrenadante foi descartado por inversão. A microplaca foi deixada para secar a temperatura de 37° C até que todo o etanol tivesse evaporado. Após a secagem, cada uma das amostras de DNA precipitado foi ressuspendida em 10 μL de formamida (High-Di™, Thermo Fisher Scientific). Foi realizada a desnaturação por 3 minutos a temperatura de 95°C e depois as amostras de DNA foram injetadas no sequenciador ABI 3500XL.

Após o sequenciamento, as sequências *16S rRNA* dos isolados foram analisadas e editadas com o programa BioEdit (HALL, 2011) e comparadas com o banco de dados GenBank NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) conjuntamente com a ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (*BLAST*) para comparação de sequências de nucleotídeos (ALTSCHUL et al., 1997) e verificar qual o comprimento do fragmento a ser utilizado com base no primeiro hit. As sequências obtidas também foram comparadas com o banco de dados de genes ribossomais RDP (Ribosomal Database Project) (<https://rdp.cme.msu.edu/>) com as funções de análise Classifier e Sequence Match (COLE et al., 2005) para obter referências para a classificação a nível de gênero.

Construção de árvores filogenéticas

Para a construção das árvores filogenéticas baseadas na similaridade da sequência parcial do gene *16S rRNA* apenas no sentido “forward” (27f) de cada gênero bacteriano encontrado, primeiramente foi realizado o alinhamento das sequências dos isolados com espécies tipos e grupo externo. Todos os alinhamentos foram feitos utilizando o algoritmo ClustalW e o programa Bioedit foi usado para refinar visualmente todos os alinhamentos (HALL, 1999). Os melhores modelos de substituição de nucleotídeos e análises de Neighbor-joining (NJ) foram realizadas com o programa MEGA7 (TAMURA et al., 2007) com bootstrap de 1000 replicações e estimativa do parâmetro Gamma também realizados pelo programa. Para a árvore de cada gênero, foi utilizada uma espécie da mesma família mas pertencente a outro gênero como grupo externo.

3.3. Resultados

Contagem populacional

Dados de densidade populacional bacteriana estimados através da contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs), revelaram que após 20 dias de incubação a densidade de bactérias no tratamento solo foi de $4,43 \times 10^9$ UFC/g de peso fresco, significativamente maior que a população observada nos tratamentos rizosfera e endofítico. No mesmo período, a densidade populacional nos tratamentos rizosfera e endofítico foi de $8,83 \times 10^8$ e $4,27 \times 10^8$ UFC/g de peso fresco, respectivamente (**Figura 1**).

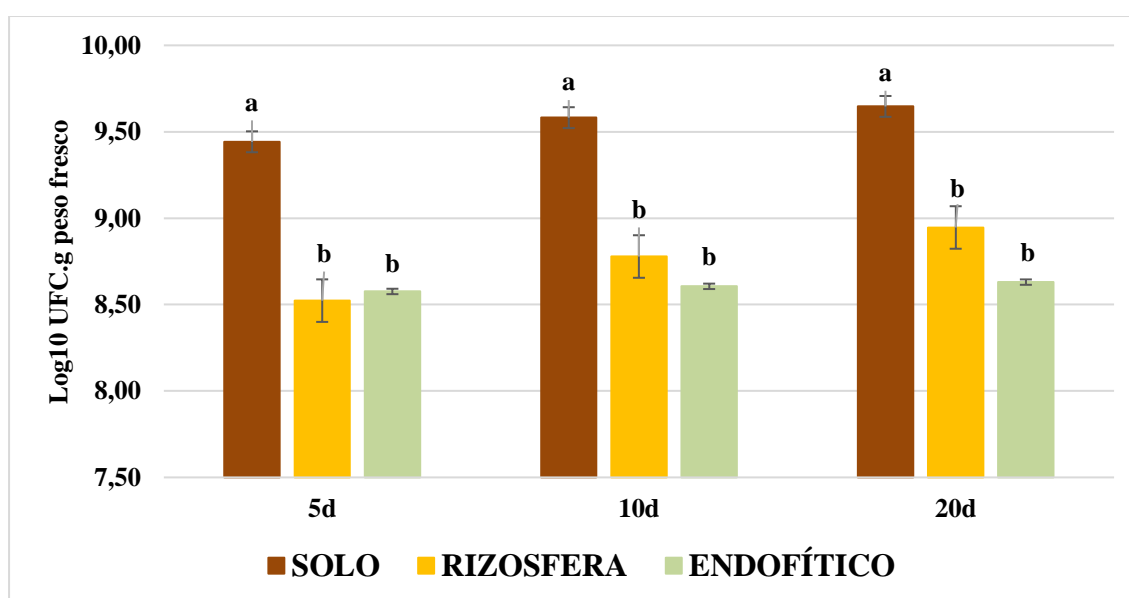


Figura 1 - Densidade populacional de bactérias associativas de *B. dracunculifolia* no período de 5-20 dias de incubação. Dados são medias de três repetições biológicas (A1, A2 e A3) \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,01$).

Em relação aos meios de cultivo, os meios BA, YCED e R2A permitiram contagens populacionais elevadas maiores que 1×10^8 UFC/ g peso fresco e com valores próximos entre si dentro de cada tratamento (solo, rizosfera e endofítico) (**Figura 2**). Em todos os meios utilizados o tratamento solo permitiu contagens a cima de 1×10^9 UFC/ g peso fresco.

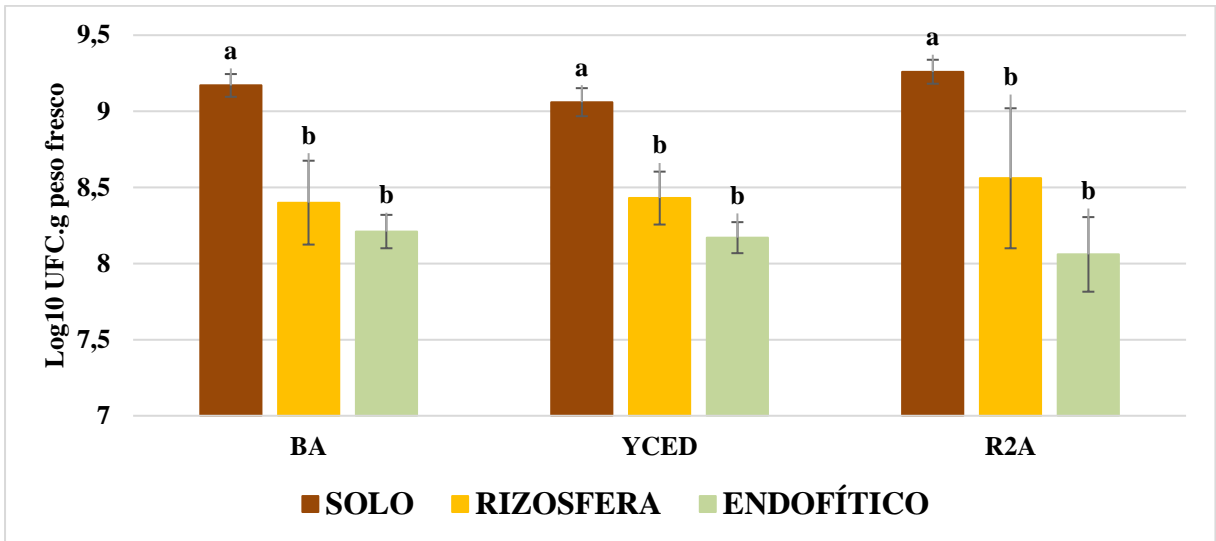


Figura 2 - Densidade populacional de isolados associativos de *B. dracunculifolia* após 20 dias de crescimento para cada meio de cultivo utilizado. Dados são médias de três repetições biológicas (A1, A2 e A3) \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,01$).

Isolamento

Ao todo foram obtidos 76 isolados que foram preservados após o processo de purificação realizado em meio de cultivo sólido (**Anexo 2**). Dos 76 isolados, 63% foram obtidos do solo, 8% da rizosfera e os 29% restantes foram provenientes da endosfera (**Figura 3**).

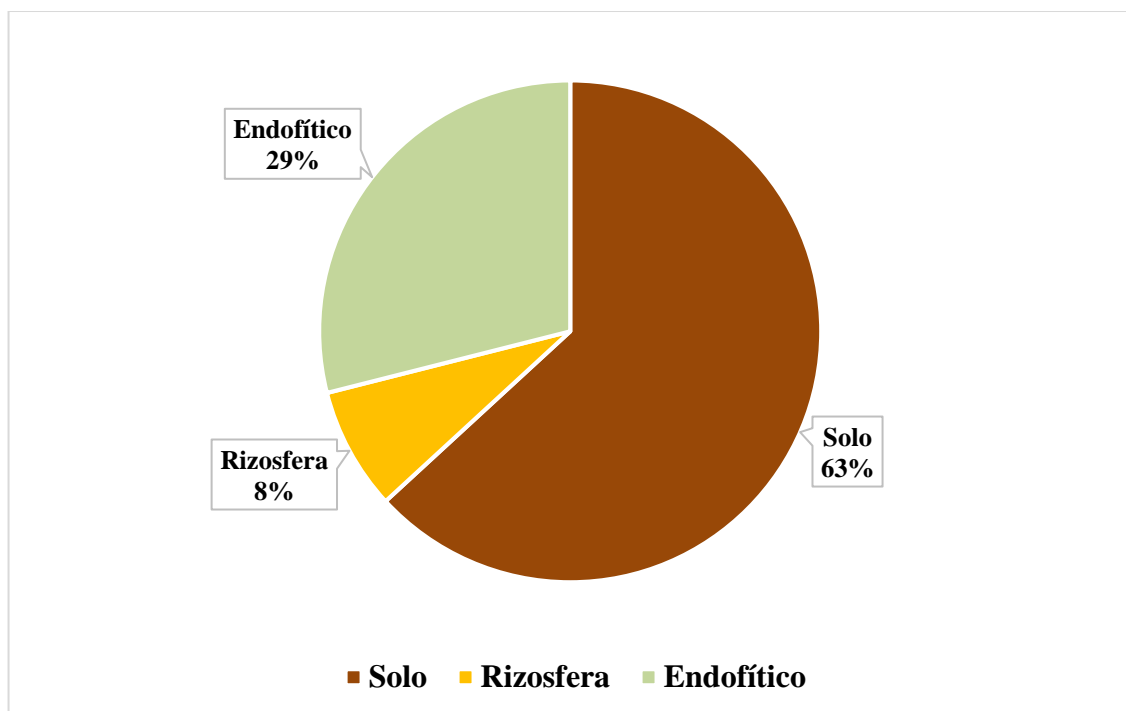


Figura 3 - Porcentagens de bactérias isoladas do solo, rizosfera e endosfera de *B. dracunculifolia*.

Produção de biossurfactantes

A produção de biossurfactantes foi avaliada inicialmente pelo ensaio de colapso da gota e os isolados que apresentaram resultado positivo foram posteriormente avaliados pelos ensaios de espalhamento de óleo e índice de emulsão. Os ensaios de colapso da gota e de espalhamento de óleo tem como objetivo verificar as propriedades tensoativas (BODOUR & MILLER-MAIER, 1998), enquanto que o índice de emulsão verifica a propriedade de formar emulsão (COOPER & GOLDENBERG, 1987). Foram avaliados os 76 isolados e destes, 27 foram capazes de produzir biossurfactantes (**Figura 4**). Deste grupo, 13 são bactérias do tratamento solo, 13 do tratamento endofítico e apenas uma proveniente do tratamento rizosfera (**Tabela 1**).

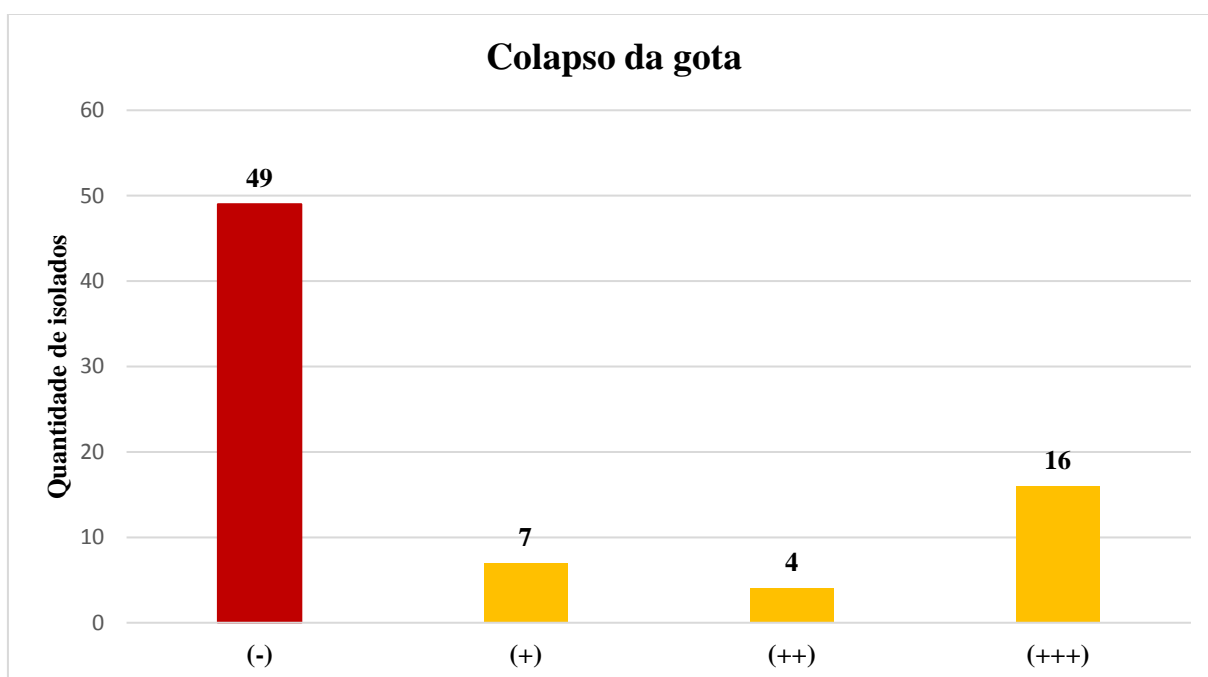


Figura 4 - Produção de biossurfactantes por bactérias isoladas de *B. dracunculifolia* no ensaio de colapso da gota. Os isolados foram categorizados em níveis de produção: negativo (-), baixo (+), médio (++) e alto (+++).

No ensaio do colapso da gota, entre os isolados mais eficientes (+++) na produção de biossurfactantes, 11 eram bactérias do tratamento endofítico, 4 do tratamento solo e apenas uma do tratamento rizosfera (**Tabela 1**). Os isolados mais eficientes (+++) tiveram sua gota de cultura completamente espalhada na superfície do óleo, sendo difícil sua visualização e demonstrando uma reação muito positiva.

Tabela 1 - Tabela de isolados produtores de biossurfactantes no ensaio de colapso da gota (Produção de biossurfactante: baixa (+); média (++); alta (+++). Origem dos isolados: solo (tratamento solo); rizosfera e rizoplano (tratamento rizosfera); endofítico (tratamento endofítico).

Isolado	Produção	Origem	Isolado	Produção	Origem
31	+++	solo	131	+++	endofítico
41	+++	solo	138	+++	endofítico
50	+++	solo	42	++	solo
63	+++	solo	45	++	solo
95	+++	rizosfera	49	++	solo
106	+++	endofítico	51	++	solo
114	+++	endofítico	13	+	solo
116	+++	endofítico	14	+	solo
117	+++	endofítico	34	+	solo
118	+++	endofítico	44	+	solo
119	+++	endofítico	48	+	solo
125	+++	endofítico	127	+	endofítico
129	+++	endofítico	28	+	endofítico
130	+++	endofítico			

No ensaio de espalhamento de óleo, os isolados 48 e 130 produziram halos de 74 mm e 52 mm, respectivamente, que contrastaram com os halos formados pelo restante dos isolados analisados (**Figura 5**). Um dos isolados que se destacou foi isolado do tratamento endofítico (isolado 130) e o outro do tratamento solo (isolado 48), sendo este último o que conseguiu formar o halo maior. O restante dos isolados formaram halos pequenos, sendo 5 deles isolados do tratamento solo, um do tratamento rizosfera e 4 do tratamento endofítico. Os demais isolados não formaram halos.

Entre os 27 isolados selecionados apenas três apresentaram propriedades emulsificantes com IE_{24} acima de 50% (**Figura 6**), um deles foi o isolado 48 do tratamento solo e apresentou um IE_{24} de 72%, enquanto que, os outros dois foram os isolados 130 e 131 do tratamento endofítico que obtiveram um IE_{24} de 62% e 60%, respectivamente. Os demais isolados não atingiram o IE_{24} de 50% e quatro deles não apresentaram propriedades emulsificantes no ensaio.

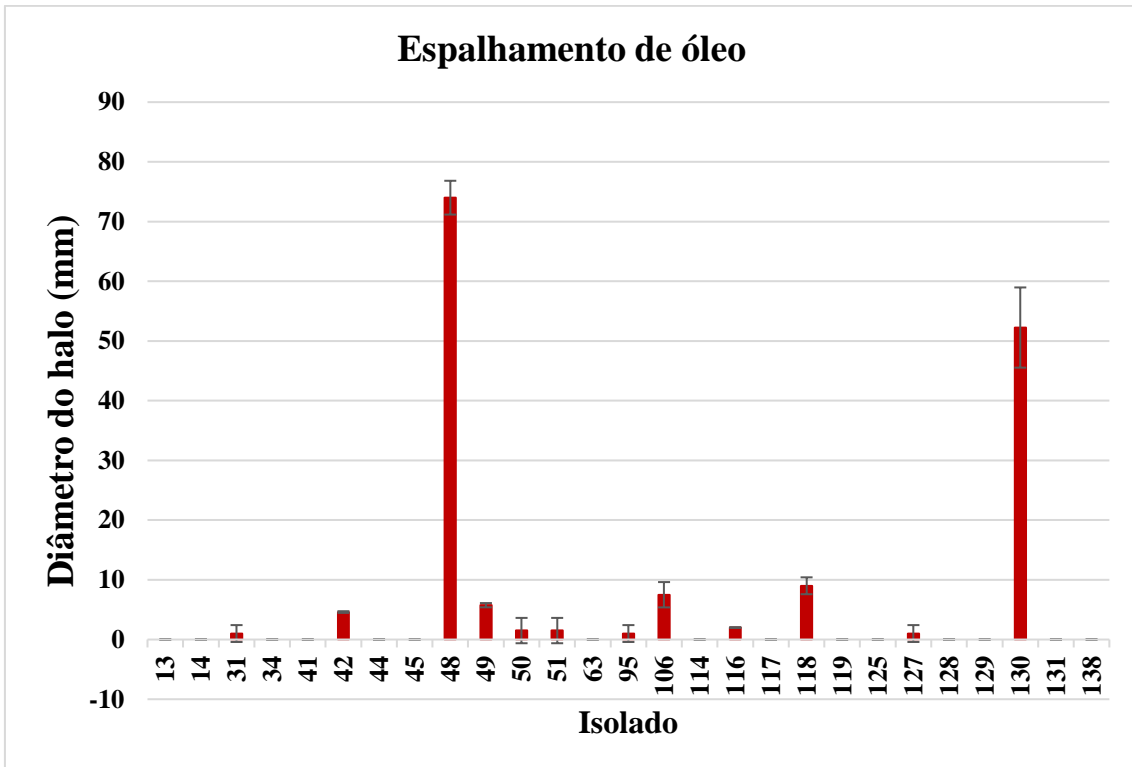


Figura 5 - Gráfico de formação de halo pelos isolados selecionados no ensaio de espalhamento de óleo. Dados do gráfico são médias de duas repetições com \pm desvio padrão.

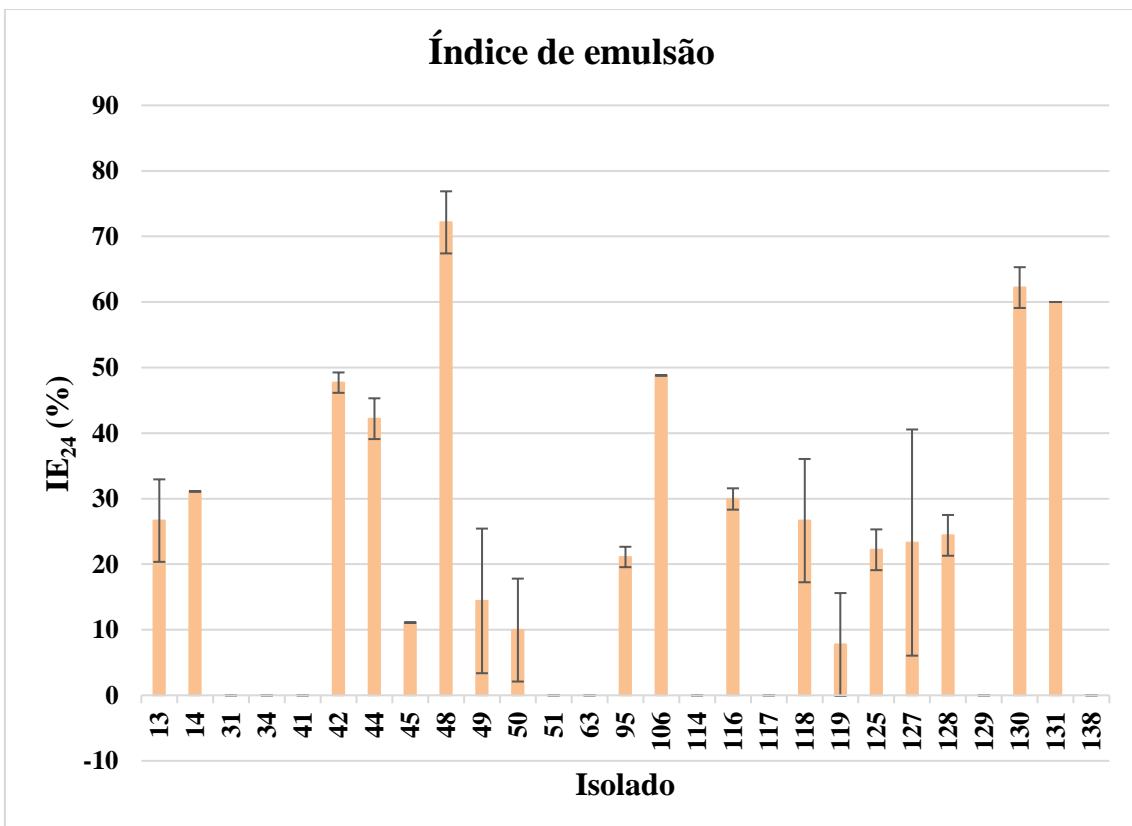


Figura 6 - Gráfico de formação de emulsões pelos isolados selecionados para o índice de emulsão 24h (IE₂₄). Dados do gráfico são médias de duas repetições com \pm desvio padrão.

Identificação molecular dos isolados

Dos 76 isolados associados a *B. dracunculifolia*, foi possível sequenciar o gene *16S rRNA* e comparar as sequências com bancos de dados de cerca 53 isolados. Entre eles estão presentes bactérias pertencentes aos gêneros presentes nos filos Actinobacteria (*Streptomyces*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Cellulomonas* e *Terrabacter*), Firmicutes (*Bacillus* e *Staphylococcus*) e Proteobacteria (*Pseudomonas*, *Cupriavidus*, *Burkholderia*, *Ralstonia* e *Acinetobacter*) (**Figura 7**). Mas cinco dos 53 isolados sequenciados não puderam ter seus gêneros identificados pela ferramenta Classifier do banco de dados RDP (**Tabela 2**). O **anexo 2** mostra a classificação completa dos isolados e os isolados que não puderam ser classificados.

O banco de dados Genbank NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) permitiu a identificação em nível de gênero e até a espécie de todos os 53 isolados pela ferramenta *BLAST*, com exceção dos isolados 34 e 72 (**Anexo 3**). Os isolados 34, 41, 67, 72 e 90 (9% dos isolados) não puderam ser identificados com a ferramenta Classifier do banco de dados Ribosomal Database Project (RDP), enquanto que, com a ferramenta Sequence Match foi possível obter o gênero e a sugestão da espécie de todos os isolados. (**Anexo 3**).

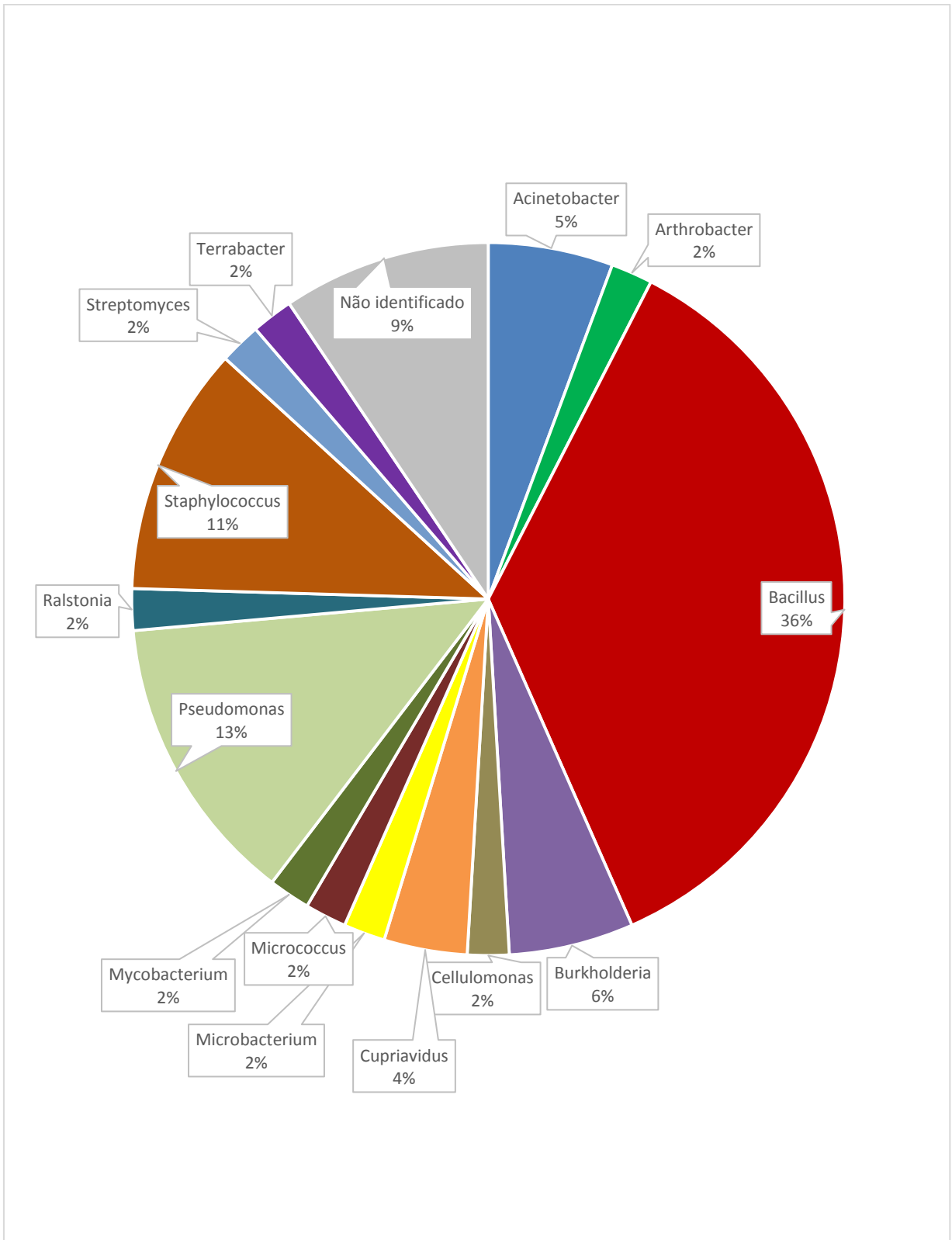


Figura 7 - Porcentagem de gêneros bacterianos entre os isolados obtidos utilizando a ferramenta RDP-Classifier.

Tabela 2 - Tabela com todos os isolados identificados a nível de gênero, identificação tendo como base o banco de dados RDP-Classifer.

Isolado	Origem	RPD Classifier	
		Gênero	Dominio Bacteria (%)
34	solo	-	100
41	solo	-	100
67	solo	-	100
72	solo	-	0
90	rizosfera	-	100
9	solo	<i>Acinetobacter</i>	100
110	endofítico	<i>Acinetobacter</i>	100
137	endofítico	<i>Acinetobacter</i>	100
112	endofítico	<i>Arthrobacter</i>	100
10	solo	<i>Bacillus</i>	100
18	solo	<i>Bacillus</i>	100
19	solo	<i>Bacillus</i>	100
23	solo	<i>Bacillus</i>	100
26	solo	<i>Bacillus</i>	100
28	solo	<i>Bacillus</i>	100
31	solo	<i>Bacillus</i>	100
37	solo	<i>Bacillus</i>	100
49	solo	<i>Bacillus</i>	100
50	solo	<i>Bacillus</i>	100
52	solo	<i>Bacillus</i>	100
55	solo	<i>Bacillus</i>	100
63	solo	<i>Bacillus</i>	100
77	solo	<i>Bacillus</i>	100
79	solo	<i>Bacillus</i>	100
85	rizosfera	<i>Bacillus</i>	100
95	rizosfera	<i>Bacillus</i>	100
127	endofítico	<i>Bacillus</i>	100
130	endofítico	<i>Bacillus</i>	100
117	endofítico	<i>Burkholderia</i>	100
129	endofítico	<i>Burkholderia</i>	100
132	endofítico	<i>Burkholderia</i>	100
40	solo	<i>Cellulomonas</i>	100
54	solo	<i>Cupriavidus</i>	100
59	solo	<i>Cupriavidus</i>	100
66	solo	<i>Microbacterium</i>	100
75	solo	<i>Micrococcus</i>	100
35	solo	<i>Mycobacterium</i>	100
13	solo	<i>Pseudomonas</i>	100
45	solo	<i>Pseudomonas</i>	100
48	solo	<i>Pseudomonas</i>	100
71	solo	<i>Pseudomonas</i>	100
104	endofítico	<i>Pseudomonas</i>	100
105	endofítico	<i>Pseudomonas</i>	100
107	endofítico	<i>Pseudomonas</i>	100
131	endofítico	<i>Ralstonia</i>	100
5	solo	<i>Staphylococcus</i>	100
27	solo	<i>Staphylococcus</i>	100
81	solo	<i>Staphylococcus</i>	100
96	rizosfera	<i>Staphylococcus</i>	100
133	endofítico	<i>Staphylococcus</i>	100
135	endofítico	<i>Staphylococcus</i>	100
2	solo	<i>Streptomyces</i>	100
87	rizosfera	<i>Terrabacter</i>	100

Dos 53 isolados sequenciados havia 34 bactérias do tratamento solo, 5 do tratamento rizosfera e 14 do tratamento endofítico. Ao todo foram encontrados representantes de 14

gêneros de bactérias. No tratamento rizosfera havia a presença de representantes dos gêneros *Bacillus*, *Staphylococcus* e *Terrabacter* (**Figura 8a**). No tratamento endofítico prevaleceram os gêneros *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* e *Staphylococcus* (**Figura 8b**). No tratamento solo foram encontrados os gêneros *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Cupriavidus*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Streptomyces* (**Figura 8c**).

Os isolados 48 (solo) e 130 (endofítico) foram os que apresentaram os melhores resultados no ensaio de espalhamento no óleo e no índice de emulsão (IE₂₄), foram classificados como sendo representantes dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus*, respectivamente.

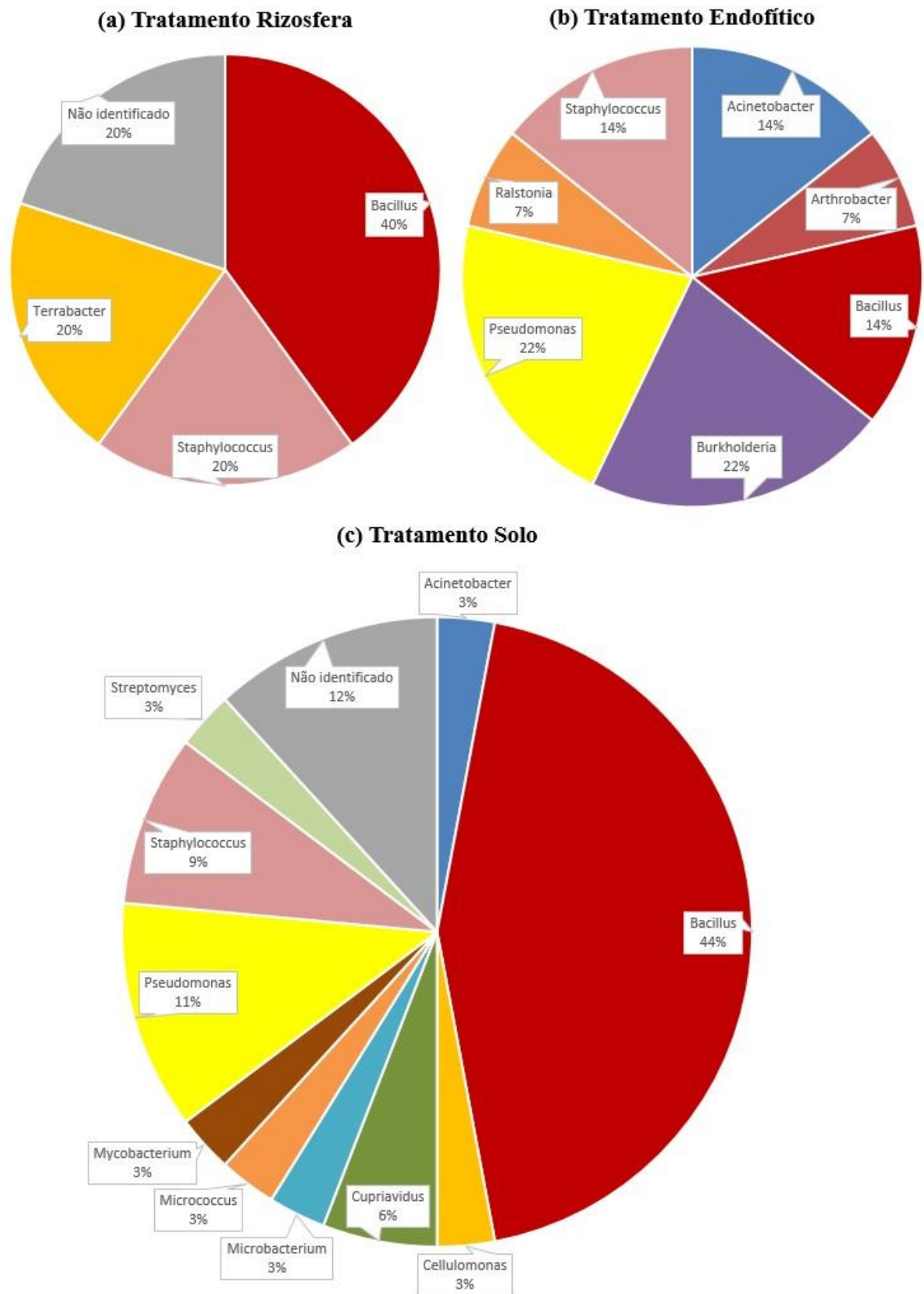


Figura 8 - Porcentagem de gêneros bacterianos presentes em cada tratamento. (a) Tratamento Rizosfera; (b) Tratamento Endofítico; (c) Tratamento Solo.

Filogenia baseada no gene *16S rRNA*

A partir das sequências alinhadas foram construídas as árvores filogenéticas baseadas na similaridade da sequência parcial do gene *16S rRNA*. Os valores de bootstrap não confiáveis (abaixo de 70%) não foram mostrados.

Os isolados 09 e 137 identificados como sendo do gênero *Acinetobacter* são próximos da espécie *A. nosocomialis* RUH 2376^(T) enquanto que o isolado 110 se aproxima de *A. pittii* LMG 1035^(T) e de *A. calcoaceticus* NCCB 22016^(T) (**Figura 9**). O isolado 112 pertencente ao gênero *Arthrobacter* está próximo da espécie *A. histidinolorans* DSM 20115^(T) (**Figura 10**).

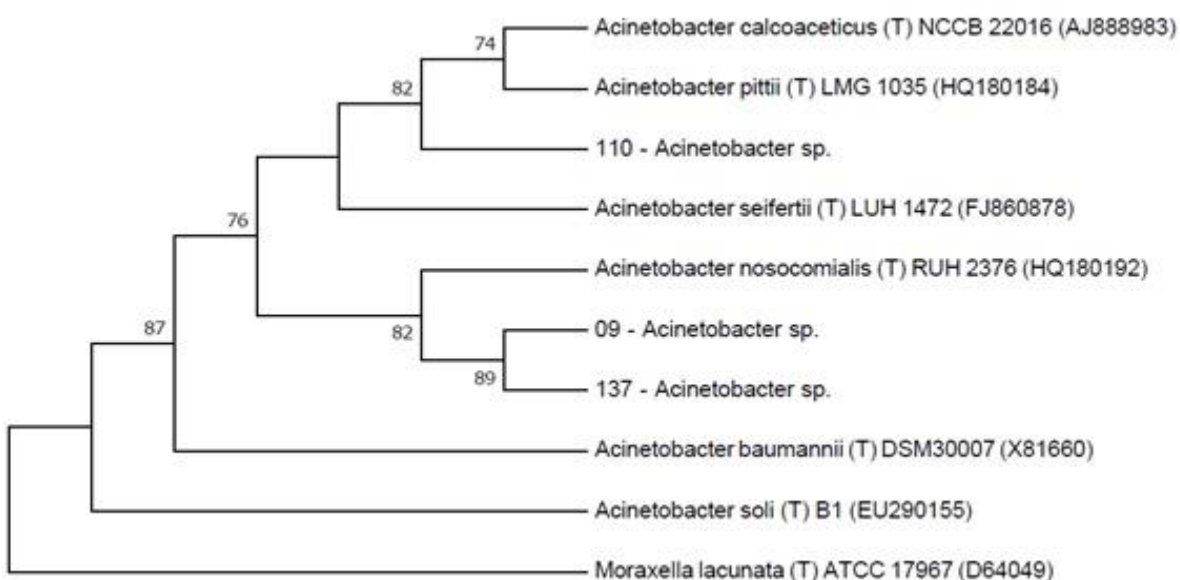


Figura 9 - Árvore filogenética do isolado pertencente ao gênero *Acinetobacter* foi construída baseada na similaridade da sequência parcial do gene *16S rRNA* e utilizando a espécie *Moraxella lacunata* ATCC 17967^(T) como grupo externo. A relação evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A árvore ideal com a soma do comprimento do ramo = 0,30984476 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas em que os *taxa* associados e agrupados no ensaio de bootstrap (1000 réplicas) são mostradas próximas às ramificações. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Kimura de 2 parâmetros. A variação da *taxa* entre os nodos foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 0,2583). A análise envolveu 10 sequências nucleotídicas. Todas as posições com menos de 95% de cobertura do site foram eliminadas. Ou seja, menos de 5% de intervalos de alinhamento, dados ausentes e bases ambíguas foram permitidos em qualquer posição. Houve um total de 833 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas no MEGA7. Valores de bootstrap abaixo de 70% não foram mostrados. Nome de espécie precedido de símbolo (T) indicam espécie tipo.

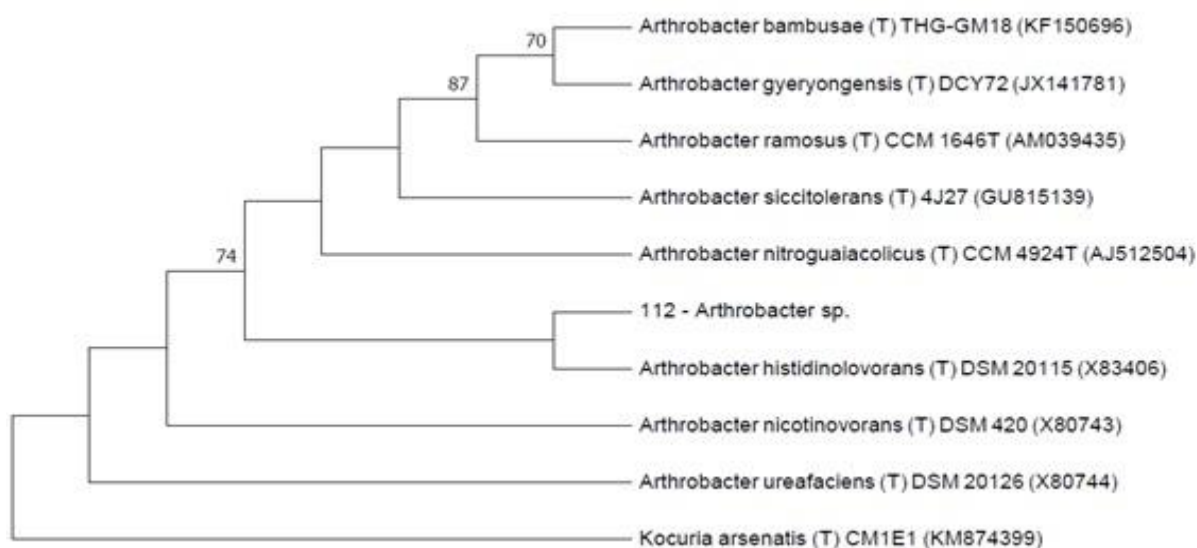


Figura 10 - Árvore filogenética do isolado pertencente ao gênero *Arthrobacter* foi construída baseada na similaridade da sequência parcial do gene *16S rRNA* e utilizando a espécie *Kocuria arsenatis* CM1E1^(T) como grupo externo. A relação evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A árvore ideal com a soma do comprimento do ramo = 0,29508967 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas em que os *taxa* associados e agrupados no ensaio de bootstrap (1000 réplicas) são mostradas próximas às ramificações. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Tamura-Nei. A variação da *taxa* entre os nodos foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 0,05). A análise envolveu 10 sequências nucleotídicas. Todas as posições com menos de 95% de cobertura do site foram eliminadas. Ou seja, menos de 5% de intervalos de alinhamento, dados ausentes e bases ambíguas foram permitidos em qualquer posição. Houve um total de 961 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas no MEGA7. Valores de bootstrap abaixo de 70% não foram mostrados. Nome de espécie precedido de símbolo (T) indicam espécie tipo.

Dos isolados pertencentes ao gênero *Bacillus*, os isolados 10 e 77 ficaram mais próximos da espécie *B. qingshengii* G19^(T), o isolado 19 mantive-se próximo de *B. aryabhatai* B8W22^(T), o isolado 26 se encontra próximo de *B. megaterium* IAM 13418^(T), isolados 37 e 85 mantiveram-se próximos de *B. thuringiensis* IAM 12077^(T), os isolados 18, 23 e 28 estão mais relacionados com *B. cereus* JCM 2152^(T), o isolado 79 mostrou proximidade com *B. amyloliquefaciens* S2QPS11^(T), o isolado 130 ficou posicionado próximo a *B. tequilenses* 10b^(T), já os isolados 63 e 127 mostram estar mais relacionado com *B. pumilus* ATCC 7061^(T), o isolado 95 ficou mais próximo de *B. invictae* Bi.FFUP1^(T), o isolado 50 ficou próximo de *B. safensis* FO-036b^(T) e o clado formado pelos isolados 31, 49, 52 e 55 também ficaram próximos de *B. safensis* FO-036b^(T) (**Figura 11**).

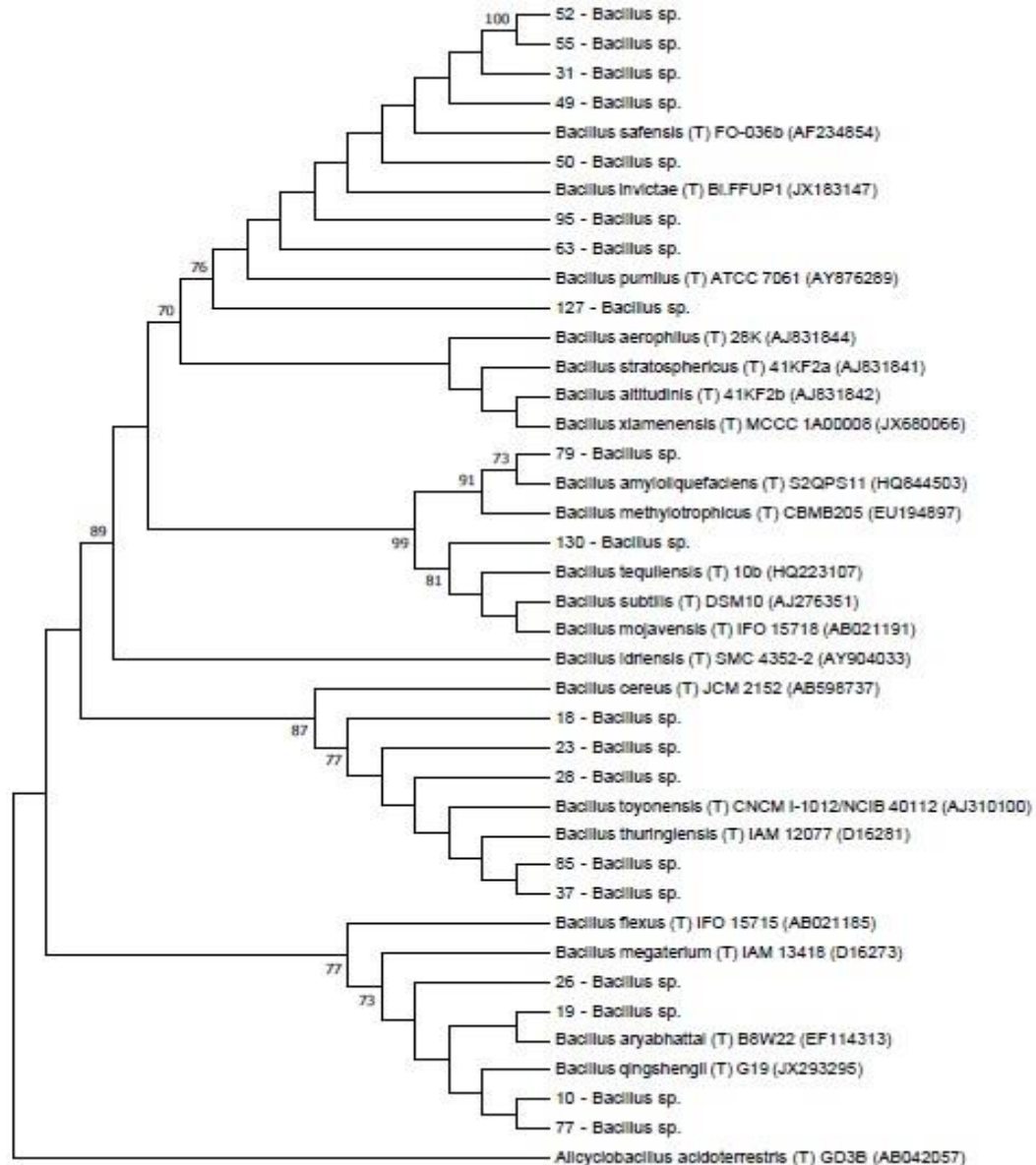


Figura 11 - Árvore filogenética do isolado pertencente ao gênero *Bacillus* foi construída baseada na similaridade da sequência parcial do gene *16S rRNA* e utilizando a espécie *Allcyclobacillus acidoterrestris* GD3B^(T) como grupo externo. A relação evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A árvore ideal com a soma do comprimento do ramo = 0.78839840 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas em que os *taxa* associados e agrupados no ensaio de bootstrap (1000 réplicas) são mostradas próximas às ramificações. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Tamura-Nei. A variação da *taxa* entre os nodos foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 0,2106). A análise envolveu 40 sequências nucleotídicas. Todas as posições com menos de 95% de cobertura do site foram eliminadas. Ou seja, menos de 5% de intervalos de alinhamento, dados ausentes e bases ambíguas foram permitidos em qualquer posição. Houve um total de 766 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas no MEGA7. Valores de bootstrap abaixo de 70% não foram mostrados. Nome de espécie precedido de símbolo (T) indicam espécie tipo.

Os isolados do gênero *Burkholderia* 117 e 132 estão intimamente relacionados entre si e são próximos da espécie *B. difusa* R-15930^(T) enquanto o isolado 129 mostra-se próximo de *B. pyrrocinia* LMG 14191^(T) (**Figura 12**). O isolado 40 classificado como sendo pertencente do gênero *Cellulomonas* está próximo das espécies *C. biazotea* DSM20112^(T) e *C. fimi*

DSM20113^(T) (**Figura 13**). Os representantes do gênero *Cupriavidus*, os isolados 54 e 59 exibem semelhanças com as espécies *C. laharis* 1263a^(T) e *C. pinatubonensis* 1245^(T), respectivamente (**Figura 14**).

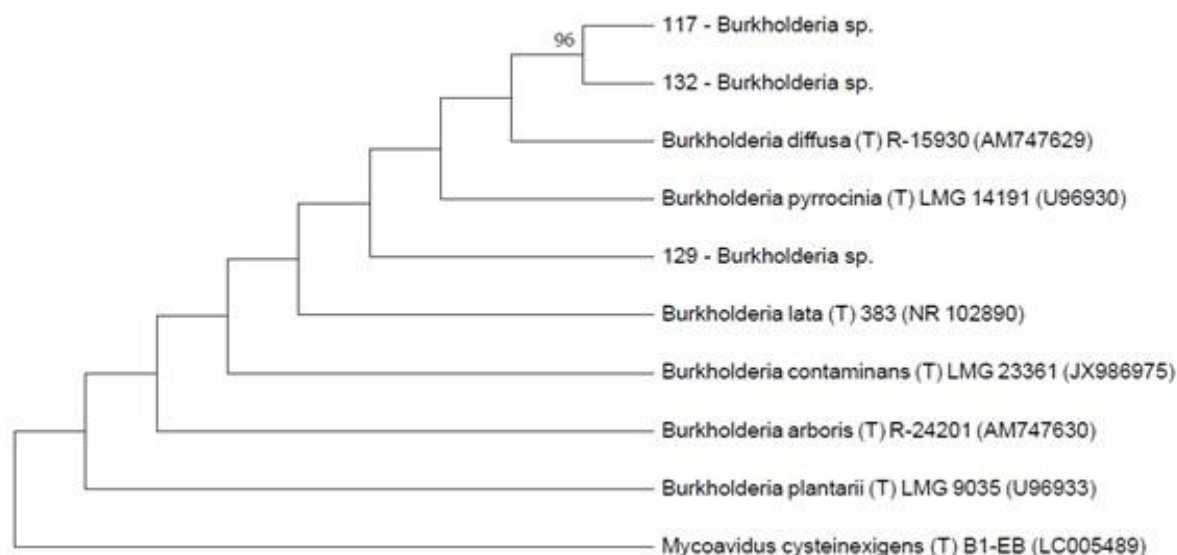


Figura 12 - Árvore filogenética do isolado pertencente ao gênero *Burkholderia* foi construída baseada na similaridade da sequência parcial do gene *16S rRNA* e utilizando a espécie *Mycoavidus cysteinexigens* B1-EB^(T) como grupo externo. A relação evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A árvore ideal com a soma do comprimento do ramo = 0.26319230 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas em que os *taxa* associados e agrupados no ensaio de bootstrap (1000 réplicas) são mostradas próximas às ramificações. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Tamura-Nei. A variação da *taxa* entre os nodos foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 0,0538). A análise envolveu 10 sequências nucleotídicas. Todas as posições com menos de 95% de cobertura do site foram eliminadas. Ou seja, menos de 5% de intervalos de alinhamento, dados ausentes e bases ambíguas foram permitidos em qualquer posição. Houve um total de 837 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas no MEGA7. Valores de bootstrap abaixo de 70% não foram mostrados. Nome de espécie precedido de símbolo (T) indicam espécie tipo.

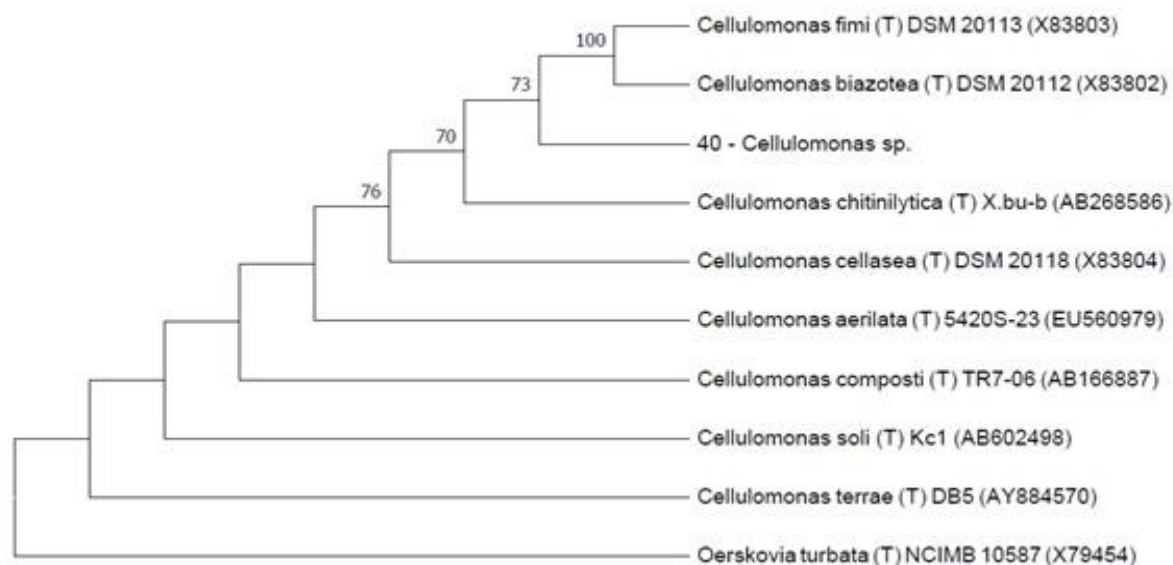


Figura 13 - Árvore filogenética do isolado pertencente ao gênero *Cellulomonas* foi construída baseada na similaridade da sequência parcial do gene *16S rRNA* e utilizando a espécie *Oerskovia turbata* NCIMB 10587^(T)

como grupo externo. A relação evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A árvore ideal com a soma do comprimento do ramo = 0.19960422 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas em que os *taxa* associados e agrupados no ensaio de bootstrap (1000 réplicas) são mostradas próximas às ramificações. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de 3 parâmetros de Tamura. A variação da *taxa* entre os nodos foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 0,05). A análise envolveu 10 sequências nucleotídicas. Todas as posições com menos de 95% de cobertura do site foram eliminadas. Ou seja, menos de 5% de intervalos de alinhamento, dados ausentes e bases ambíguas foram permitidos em qualquer posição. Houve um total de 925 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas no MEGA7. Valores de bootstrap abaixo de 70% não foram mostrados. Nome de espécie precedido de símbolo (T) indicam espécie tipo.

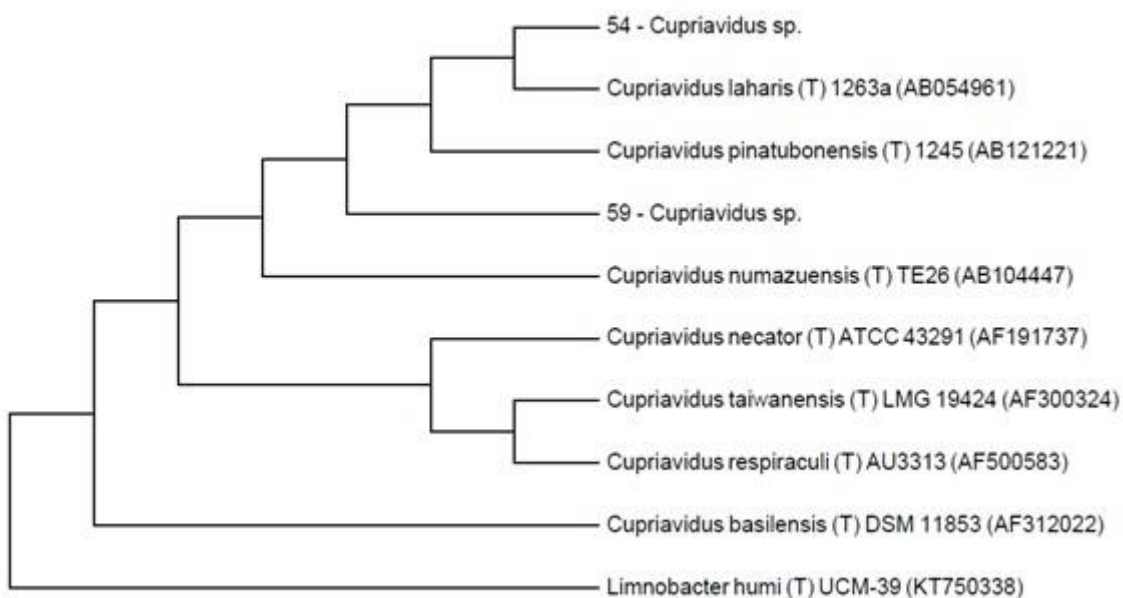


Figura 14 – Árvore filogenética do isolado pertencente ao gênero *Cupriavidus* foi construída baseada na similaridade da sequência parcial do gene *16S rRNA* e utilizando a espécie *Limnobacter humi* UCM-39^(T) como grupo externo. A relação evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A árvore ideal com a soma do comprimento do ramo = 0,33805780 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas em que os *taxa* associados e agrupados no ensaio de bootstrap (1000 réplicas) são mostradas próximas às ramificações. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Tamura-Nei. A variação da *taxa* entre os nodos foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 0,1168). A análise envolveu 10 sequências nucleotídicas. Todas as posições com menos de 95% de cobertura do site foram eliminadas. Ou seja, menos de 5% de intervalos de alinhamento, dados ausentes e bases ambíguas foram permitidos em qualquer posição. Houve um total de 805 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas no MEGA7. Valores de bootstrap abaixo de 70% não foram mostrados. Nome de espécie precedido de símbolo (T) indicam espécie tipo.

O isolado 66 do gênero *Microbacterium* mostrou proximidade com a espécie *M. trichotecenolyticum* DSM 8608^(T) (**Figura 15**). Enquanto que o isolado 75 do gênero *Micrococcus* possui similaridade com a espécie *M. yunnanensis* YIM 65004^(T) (**Figura 16**). Do gênero *Mycobacterium*, o isolado 35 mostrou proximidade com a espécie *M. parafortuitum* DSM 43528^(T) (**Figura 17**).

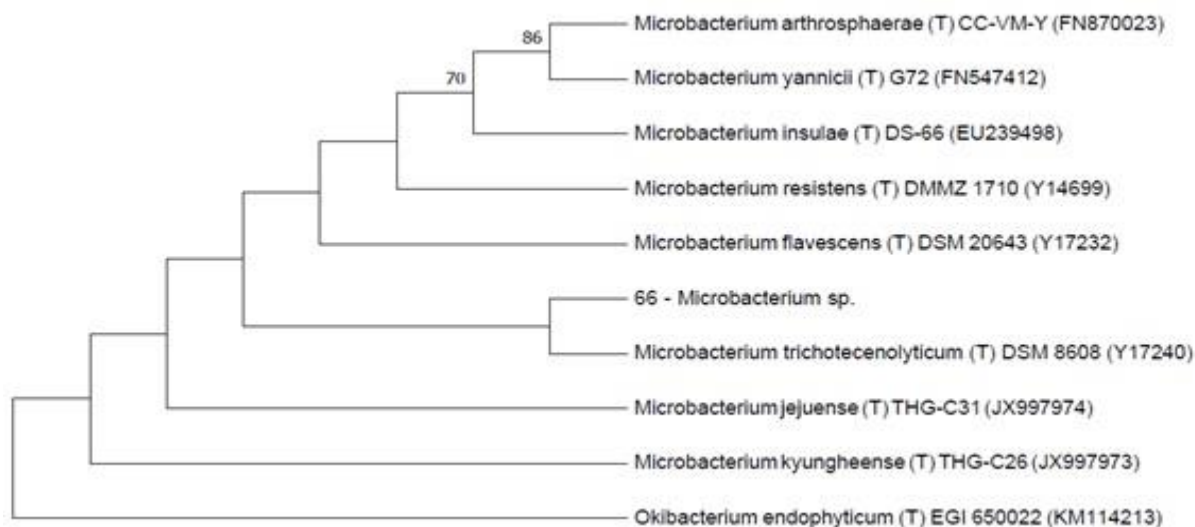


Figura 15 – Árvore filogenética do isolado pertencente ao gênero *Microbacterium* foi construída baseada na similaridade da sequência parcial do gene *16S rRNA* e utilizando a espécie *Okibacterium endophyticum* EGI 650022^(T) como grupo externo. A relação evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A árvore ideal com a soma do comprimento do ramo = 0,24772256 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas em que os *taxa* associados e agrupados no ensaio de bootstrap (1000 réplicas) são mostradas próximas às ramificações. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Tamura-Nei. A variação da *taxa* entre os nodos foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 0,05). A análise envolveu 10 sequências nucleotídicas. Todas as posições com menos de 95% de cobertura do site foram eliminadas. Ou seja, menos de 5% de intervalos de alinhamento, dados ausentes e bases ambíguas foram permitidos em qualquer posição. Houve um total de 831 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas no MEGA7. Valores de bootstrap abaixo de 70% não foram mostrados. Nome de espécie precedido de símbolo (T) indicam espécie tipo.

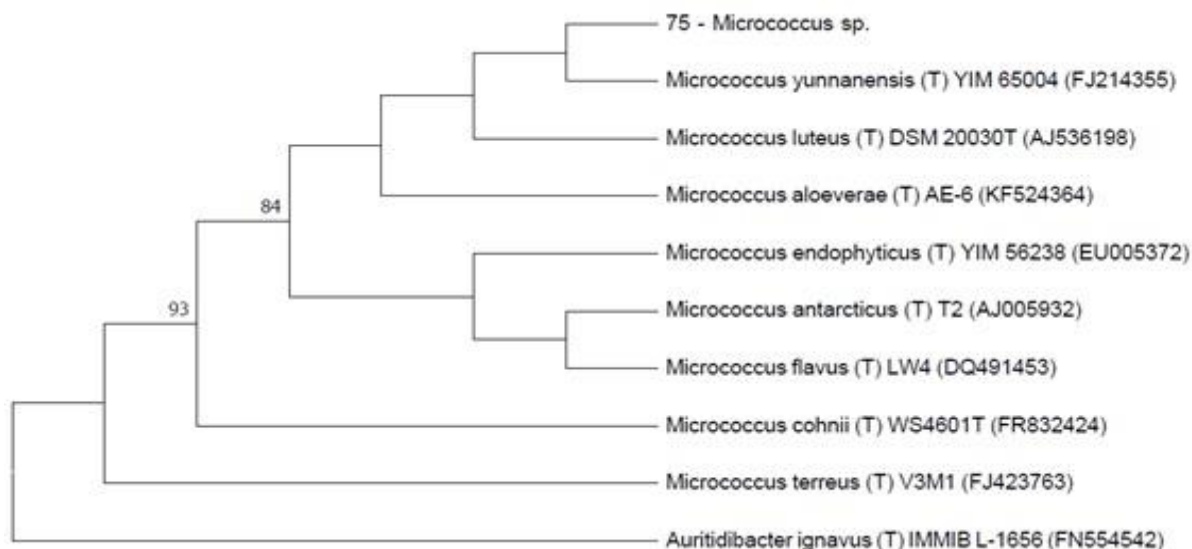


Figura 16 – Árvore filogenética do isolado pertencente ao gênero *Micrococcus* foi construída baseada na similaridade da sequência parcial do gene *16S rRNA* e utilizando a espécie *Auritidibacter ignavus* IMMIB L-1656^(T) como grupo externo. A relação evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A árvore ideal com a soma do comprimento do ramo = 0,16386447 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas em que os *taxa* associados e agrupados no ensaio de bootstrap (1000 réplicas) são mostradas próximas às ramificações. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Tamura-Nei. A variação da *taxa* entre os nodos foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 0,1759). A análise envolveu 10 sequências nucleotídicas. Todas as posições com menos de 95% de cobertura do site foram eliminadas. Ou seja, menos de 5% de intervalos de alinhamento, dados ausentes e bases ambíguas foram permitidos em qualquer posição. Houve um total de 733 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas no MEGA7. Valores de bootstrap abaixo de 70% não foram mostrados. Nome de espécie precedido de símbolo (T) indicam espécie tipo.

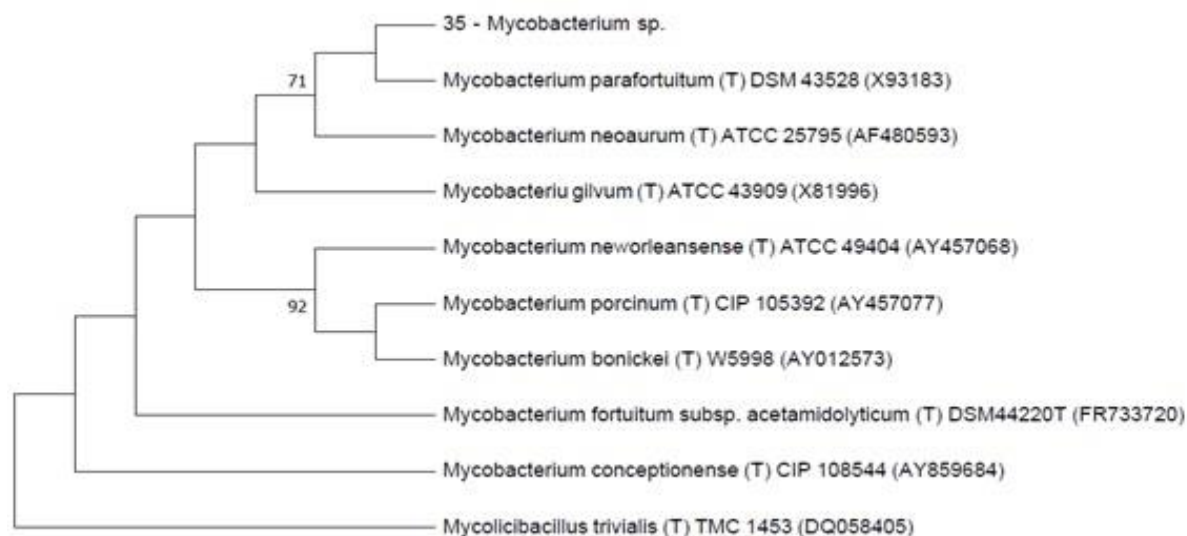


Figura 17 – Árvore filogenética do isolado pertencente ao gênero *Mycobacterium* foi construída baseada na similaridade da sequência parcial do gene *16S rRNA* e utilizando a espécie *Mycolicibacillus trivialis* TMC 1453^(T) como grupo externo. A relação evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A árvore ideal com a soma do comprimento do ramo = 0,14623234 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas em que os *taxa* associados e agrupados no ensaio de bootstrap (1000 réplicas) são mostradas próximas às ramificações. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de 3 parâmetros de Tamura. A variação da *taxa* entre os nodos foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 0,05). A análise envolveu 10 sequências nucleotídicas. Todas as posições com menos de 95% de cobertura do site foram eliminadas. Ou seja, menos de 5% de intervalos de alinhamento, dados ausentes e bases ambíguas foram permitidos em qualquer posição. Houve um total de 783 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas no MEGA7. Valores de bootstrap abaixo de 70% não foram mostrados. Nome de espécie precedido de símbolo (T) indicam espécie tipo.

O isolado 71 ficou posicionado mais próximo da espécie *Pseudomonas plecoglossicida* FPC 951^(T) enquanto que os demais isolados do gênero *Pseudomonas* (isolados 13, 45, 48, 104, 105 e 107) encontram-se próximos a *P. nitroreducens* IAM 1439^(T) (**Figura 18**). O isolado 131 do gênero *Ralstonia* está em mais proximidade com a espécie *R. pickettii* ATCC 27511^(T) (**Figura 19**).

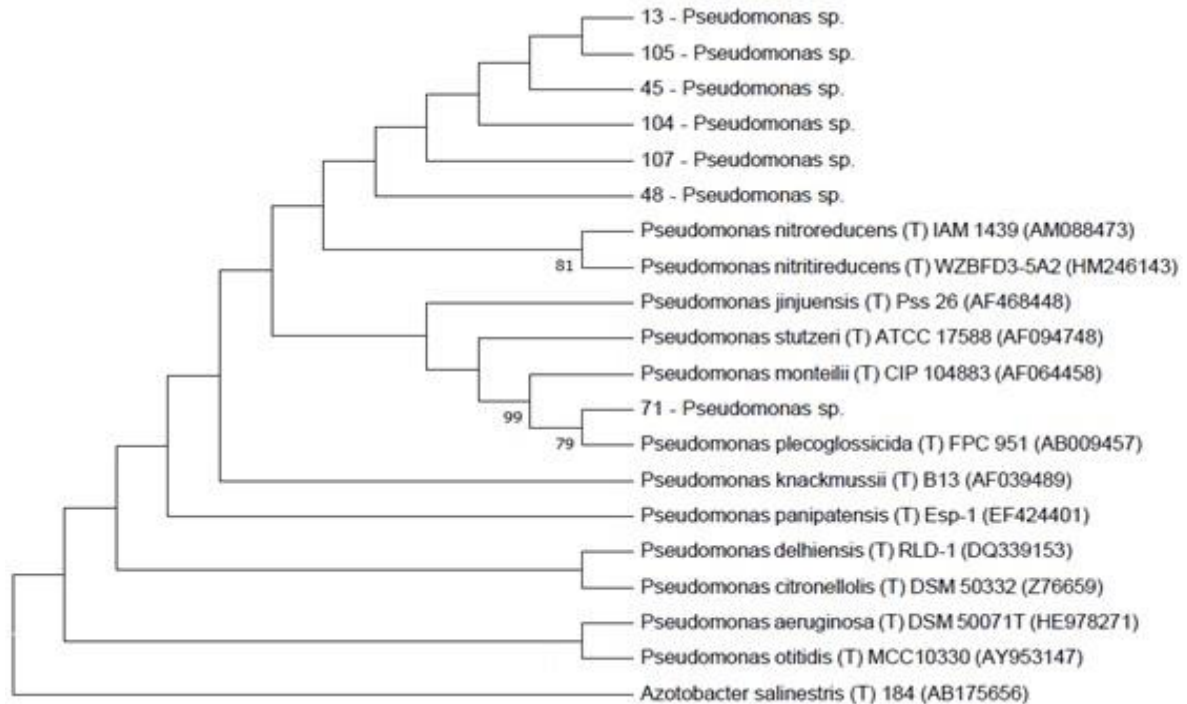


Figura 18 - Árvore filogenética do isolado pertencente ao gênero *Pseudomonas* foi construída baseada na similaridade da sequência parcial do gene *16S rRNA* e utilizando a espécie *Azotobacter salinestris* 184^(T) como grupo externo. A relação evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A árvore ideal com a soma do comprimento do ramo = 0,38547799 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas em que os *taxa* associados e agrupados no ensaio de bootstrap (1000 réplicas) são mostradas próximas às ramificações. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Kimura de 2 parâmetros. A variação da *taxa* entre os nodos foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 0,05). A análise envolveu 20 sequências nucleotídicas. Todas as posições com menos de 95% de cobertura do site foram eliminadas. Ou seja, menos de 5% de intervalos de alinhamento, dados ausentes e bases ambíguas foram permitidos em qualquer posição. Houve um total de 848 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas em MEGA7. Valores de bootstrap abaixo de 70% não foram mostrados. Nome de espécie precedido de símbolo (T) indicam espécie tipo.

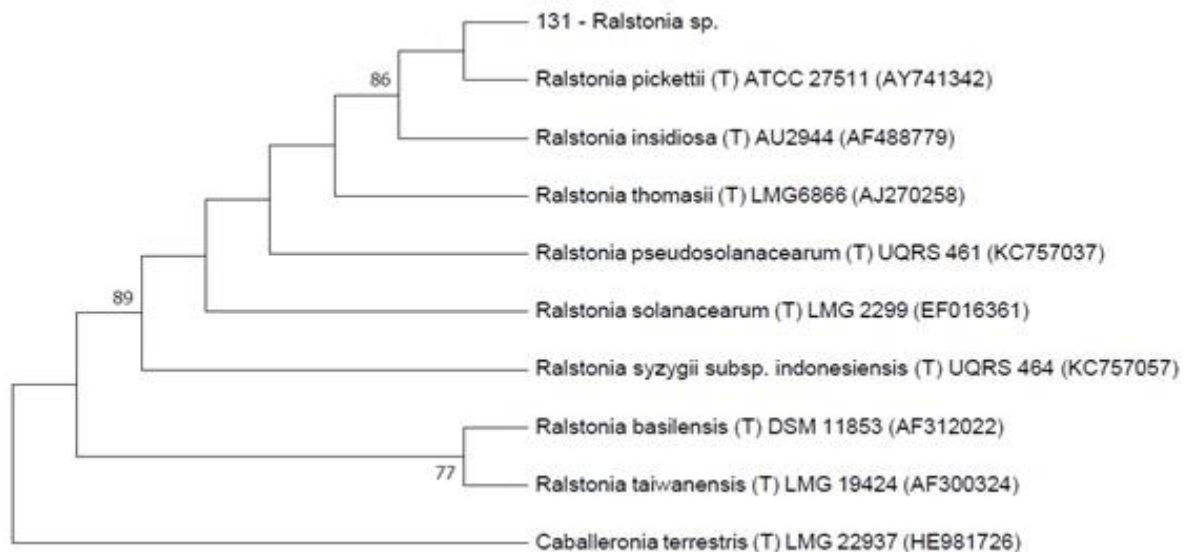


Figura 19 - Árvore filogenética do isolado pertencente ao gênero *Ralstonia* foi construída baseada na similaridade da sequência parcial do gene *16S rRNA* e utilizando a espécie *Caballeronia terrestris* LMG 22937^(T) como grupo externo. A relação evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A árvore ideal com a soma do comprimento do ramo = 0,55711164 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas em que os *taxa* associados e agrupados no ensaio de bootstrap (1000 réplicas) são mostradas próximas às ramificações. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Tamura-Nei. A variação da *taxa* entre os nodos foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 0,05). A análise envolveu 10 sequências

nucleotídicas. Todas as posições com menos de 95% de cobertura do site foram eliminadas. Ou seja, menos de 5% de intervalos de alinhamento, dados ausentes e bases ambíguas foram permitidos em qualquer posição. Houve um total de 880 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas no MEGA7. Valores de bootstrap abaixo de 70% não foram mostrados. Nome de espécie precedido de símbolo (T) indicam espécie tipo.

Entre os isolados do gênero *Staphylococcus*, o isolado 135 mostrou proximidade com a espécie *S. epidermidis* ATCC 14990^(T), o isolado 96 está mais relacionado com *S. hominis* DSM 20328^(T), os isolados 81 e 133 estão mais próximos de *S. saprophyticus subsp. bovis* GTC 843^(T), enquanto os isolados 05 e 27 encontram-se próximos da espécie *S. warneri* ATCC 27836^(T) (**Figura 20**). O isolado 02 pertencente ao gênero *Streptomyces* aparece como sendo próximo da espécie *S. atrovirens* NRRL B-163557^(T) (**Figura 21**). E o isolado 87 do gênero *Terrabacter* mostra-se intimamente relacionado com a espécie *Terrabacter terrigena* ON10^(T) (**Figura 22**).

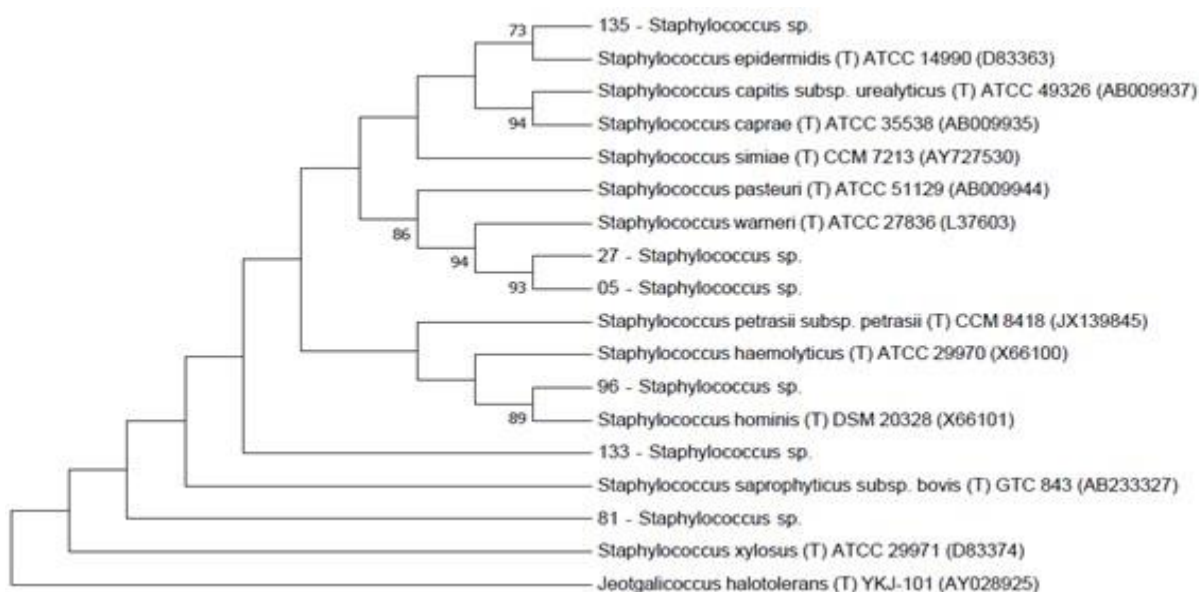


Figura 20 - Árvore filogenética do isolado pertencente ao gênero *Staphylococcus* foi construída baseada na similaridade da sequência parcial do gene *16S rRNA* e utilizando a espécie *Jeotgalicoccus halotolerans* YKJ-101^(T) como grupo externo. A relação evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A árvore ideal com a soma do comprimento do ramo = 0,61598425 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas em que os *taxa* associados e agrupados no ensaio de bootstrap (1000 réplicas) são mostradas próximas às ramificações. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Kimura de 2 parâmetros. A variação da *taxa* entre os nodos foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 0,1723). A análise envolveu 18 sequências nucleotídicas. Todas as posições com menos de 95% de cobertura do site foram eliminadas. Ou seja, menos de 5% de intervalos de alinhamento, dados ausentes e bases ambíguas foram permitidos em qualquer posição. Houve um total de 469 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas no MEGA7. Valores de bootstrap abaixo de 70% não foram mostrados. Nome de espécie precedido de símbolo (T) indicam espécie tipo.

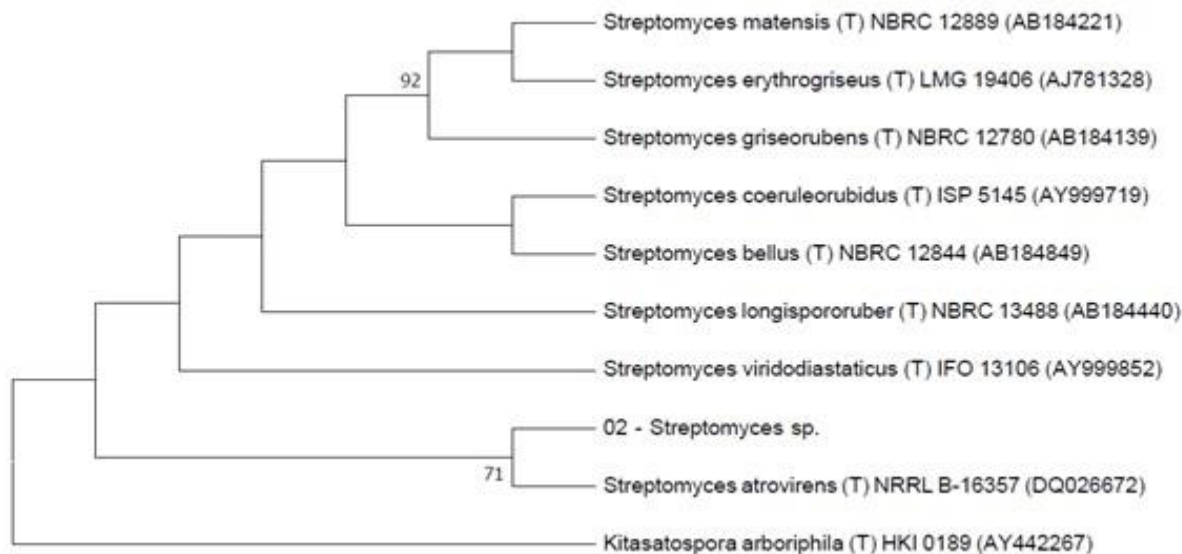


Figura 21 - Árvore filogenética do isolado pertencente ao gênero *Streptomyces* foi construída baseada na similaridade da sequência parcial do gene *16S rRNA* e utilizando a espécie *Kitasatospora arboriphila* HKI 0189^(T) como grupo externo. A relação evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A árvore ideal com a soma do comprimento do ramo = 0,11061310 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas em que os *taxa* associados e agrupados no ensaio de bootstrap (1000 réplicas) são mostradas próximas às ramificações. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de 3 parâmetros de Tamura. A variação da *taxa* entre os nodos foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 0,05). A análise envolveu 10 sequências nucleotídicas. Todas as posições com menos de 95% de cobertura do site foram eliminadas. Ou seja, menos de 5% de intervalos de alinhamento, dados ausentes e bases ambíguas foram permitidos em qualquer posição. Houve um total de 950 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas no MEGA7. Valores de bootstrap abaixo de 70% não foram mostrados. Nome de espécie precedido de símbolo (T) indicam espécie tipo.

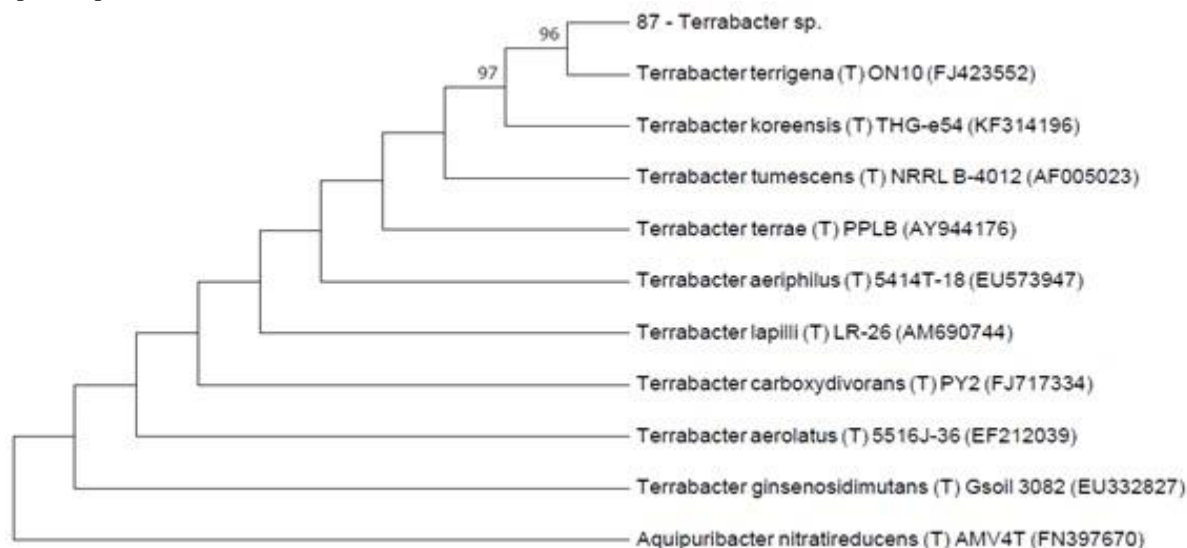


Figura 22 - Árvore filogenética do isolado pertencente ao gênero *Terrabacter* foi construída baseada na similaridade da sequência parcial do gene *16S rRNA* e utilizando a espécie *Aquipuribacter nitratireducens* AMV4T^(T) como grupo externo. A relação evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A árvore ideal com a soma do comprimento do ramo = 0,28688372 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas em que os *taxa* associados e agrupados no ensaio de bootstrap (1000 réplicas) são mostradas próximas às ramificações. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de 3 parâmetros de Tamura. A variação da *taxa* entre os nodos foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 0,0732). A análise envolveu 11 sequências nucleotídicas. Todas as posições com menos de 95% de cobertura do site foram eliminadas. Ou seja, menos de 5% de intervalos de alinhamento, dados ausentes e bases ambíguas foram permitidos em qualquer posição. Houve um total de 863 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas no MEGA7. Valores de bootstrap abaixo de 70% não foram mostrados. Nome de espécie precedido de símbolo (T) indicam espécie tipo.

3.4. Discussão

Contagem populacional

Os resultados obtidos com a densidade bacteriana endofítica de raízes ultrapassaram os valores observados por Hallmann (2001) (**Figura 1**), que observou populações bacterianas endofíticas de interior das raízes atingindo densidades de aproximadamente 10^5 - 10^7 unidades formadoras de colônias por grama de tecido (UFC g⁻¹). Segundo Bolton et al. (1992) a densidade de bactérias na rizosfera pode ser 24 vezes maior que a do solo adjacente, essa é uma relação que não foi observado nos resultados obtidos.

Produção de biossurfactantes

A técnica do colapso da gota segue o princípio, de que, uma gota de um líquido contendo algum biossurfactante colapsará e se espalhará sobre uma superfície com óleo (JAIN et al., 1991; BODOUR & MILLER-MAIER, 1998). A quantidade de surfactante necessária para causar colapso é dependente da capacidade do surfactante de reduzir a tensão superficial e interfacial (BODOUR & MILLER-MAIER, 1998), geralmente utilizada como ensaio qualitativo. Da Silva et al. (2017) observou que, quando utilizado em conjunto com outros ensaios, o ensaio do colapso da gota se torna eficaz na prospecção de microrganismos produtores biossurfactantes. Já a técnica de espalhamento do óleo é utilizada para medir o diâmetro das zonas claras (halos) formadas quando uma gota de solução contendo biossurfactante é adicionada em uma superfície de óleo-água (MORIKAWA; HIRATA; IMANAKA, 2000).

Embora 27 isolados tenham apresentado resultados positivos no ensaio do colapso da gota, apenas os isolados 48 e 130 apresentaram resultados satisfatórios no ensaio de espalhamento de óleo e apenas os isolados 48, 130 e 131 conseguiram emulsificar mais da metade da querose como mostrou o índice de emulsão.

Lan et al. (2015) realizaram ensaios para produção de biossurfactantes com uma estirpe de *Pseudomonas* (SWP-4) que segundo o autor é uma estirpe de alto rendimento de biossurfactantes do tipo ramnolipídeos, no ensaio de espalhamento de óleo, o maior halo formado pela estirpe foi de 1,6 cm (16 mm). Os autores Mani, Sivakumar e Balan (2016) isolaram uma bactéria marinha (*Bacillus simplex*) com potencial de aplicação na indústria e na biorremediação, com o espalhamento de óleo com resultado neste ensaio de halo de 54 mm. Os isolados de *B. dracunculifolia* selecionados para o ensaio de espalhamento de óleo no geral não formaram halos maiores do que 8 mm, mas os isolados 48 e 130 formaram halos de 74 e 52 mm respectivamente (**Figura 5**) equivalendo a concentrações de SDS maiores que 0,25% (**Anexo 1**).

A emulsão ocorre quando gotas microscópicas dispersam uma fase líquida (fase dispersa) em uma outra fase líquida (fase contínua), sendo as duas fases imiscíveis entre si (BOOM, 2008). No caso dos biossurfactantes, um fator que pode interferir na capacidade de emulsificação é a afinidade que determinado biossurfactante possui em relação a determinados substratos (DE LIMA et al., 2010). No trabalho realizado por Priya e Usharani (2009), foi avaliado a produção de biossurfactantes por estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis*, eles observaram que os melhores valores de IE₂₄ encontrados para o hidrocarboneto querosene foram de 52% para o gênero *Bacillus* e 55% para o gênero *Pseudomonas*. A capacidade de emulsificar querosene já é considerada satisfatória com um IE₂₄ de 50% (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000; MAIER & SOBERON-CHAVEZ, 2000; BENINCASA et al., 2004). No estudo de Shahaliyan, Safahieh e Abyar (2015), bactérias marinhas *Bacillus* sp. e *Pseudomonas* sp. geraram emulsões em querosene com IE₂₄ de 6,5% e 46% respectivamente. Os resultados com isolados de *B. dracunculifolia*, mostraram que três isolados (48, 130 e 131) conseguiram emulsificar porcentagens significativas de querosene comercial apresentando um IE₂₄ a cima de 50%, com o melhor resultado chegando

a 72% (**Figura 6**).

Geralmente os biossurfactantes microbianos são específicos solubilizando ou emulsionando hidrocarbonetos diferentes de forma distinta (ILORI; AMOBI; ODOCHA, 2005). Biossurfactantes que possuem baixa massa molecular reduzem a tensão superficial da água, mas não produzem boas emulsões. Enquanto que, os biossurfactantes de peso molecular elevado atuam bem na produção de emulsões, mas não são tão bons na redução da tensão superficial (PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011). No entanto, os dois melhores isolados (48 e 130) no ensaio de espalhamento de óleo (solubilização de óleo cru) também apresentaram os dois melhores resultados de índice de emulsão de querosene comercial.

Os resultados obtidos sugerem que *B. dracunculifolia* possui em seu microbioma bacteriano associativo, bactérias capazes de produzir biossurfactantes com propriedades de solubilização e também biossurfactantes com propriedades emulsificantes, possuindo uma potencial aplicabilidade em indústrias e também na biorremediação. Mas ainda há a necessidade de se realizar mais ensaios para verificação do verdadeiro potencial dos isolados que obtiveram os melhores resultados (como por exemplo, ensaios de capacidade de redução da tensão superficial e de antagonismo de fitopatógenos) e também realizar a caracterização dos biossurfactantes produzidos por eles.

A produção de biossurfactantes pelos isolados associados a *B. dracunculifolia* ainda pode estar relacionado com o estabelecimento de interações com a planta, nas quais os biossurfactantes tem relevância (LOH et al. 2002; NEWTON & FRAY 2004; SACHDEV & CAMEOTRA, 2013). Os biossurfactantes atuam na motilidade bacteriana e na formação de biofilme que possuem importância no processo de colonização da planta (LOH et al. 2002; NEWTON & FRAY 2004; SACHDEV & CAMEOTRA, 2013).

Identificação taxonômica molecular dos isolados

Através da identificação taxonômica molecular foram obtidos representantes de 14 gêneros bacterianos: *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Cellulomonas*, *Cupriavidus*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Staphylococcus*, *Streptomyces* e *Terrabacter*. A maioria dos isolados pertenciam ao gênero *Bacillus* (19 isolados) e os outros dois gêneros com maior quantidade de isolados foram *Pseudomonas* (7 isolados) e *Staphylococcus* (6 isolados) (**Figura 7**).

Santana et al. (2016) realizaram um trabalho com a comunidade de bactérias endofíticas de *B. dracunculifolia*, no estudo foram encontrados 26 filos bacterianos. Onde os filos mais abundantes de endófitos encontrados em *B. Dracunculifolia* foram Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Acidobacteria e Nitrospirae.

Neste trabalho os gêneros observados se distribuem em 3 filos diferentes: Firmicutes, Proteobacteria e Actinobacteria. O filo Firmicutes foi majoritariamente representado por bactérias do gênero *Bacillus* (e por *Staphylococcus*), já o filo Proteobacteria teve uma maior abundância de bactérias do gênero *Pseudomonas* (e por *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Cupriavidus* e *Ralstonia*) enquanto o filo Actinobacteria foi igualmente representado por bactérias dos gêneros *Streptomyces*, *Mycobacterium*, *Cellulomonas*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Terrabacter* e *Arthrobacter* (**Anexo 2**).

Dos cinco isolados que não puderam ter o gênero identificado, um isolado pode ser identificado ao nível de ordem Bacillales (isolado 90), dois puderam ser identificados até o nível de família como sendo Bacillaceae (isolados 19 e 30), um outro isolado obteve apenas a confirmação de pertencer ao domínio Bactéria (isolado 34) enquanto que o último isolado não obteve esta confirmação (**Anexo 2**).

As bactérias pertencentes ao gênero *Arthrobacter* (gram-positivas) geralmente constituem parte das comunidades microbianas da filosfera das plantas (RASTOGI et al.,

2012) mas também são abundantes no solo (MONGODIN et al., 2006). Mostram-se bem adaptadas como bactérias epifíticas (SCHEUBLIN & LEVEAU, 2013). Bactérias *Arthrobacter* podem degradar uma grande variedade de poluentes orgânicos, incluindo hidrocarbonetos aromáticos (SCHEUBLIN & LEVEAU, 2013).

O gênero *Cellulomonas* apresenta bactérias gram-positivas de metabolismo aeróbico ou anaeróbico facultativo já foram encontradas em vários ambientes como ar, água, solo, plantas e até em minas de carvão (ZHANG et al., 2013). O gênero *Cellulomonas* possui os únicos microrganismos anaeróbios facultativos capazes de hidrolisar a celulose (CHRISTOPHERSON et al., 2013).

O gênero *Microbacterium* possui bactérias gram-positivas que podem ser encontradas em habitats como o solo, insetos, humanos, ambientes marinhos e plantas (na filosfera ou como endófitos) (MADHAIYAN et al., 2010). Conseguem promover o crescimento vegetal pela produção de precursores do fitohormônio ácido indol acético (AIA) (TSAVKELOVA et al., 2007).

Micrococcus é um gênero de bactérias gram-positivas aeróbias que podem ser encontradas em solos, água, sedimentos e na pele (GAVA; DA SILVA; FRIAS, 2009). Em associações com plantas, pode promover o crescimento destas por via da síntese de *ácido indol acético* (AIA) (TSAVKELOVA; CHERDYNTSEVA; NETRUSOV, 2005; DASTAGER; DEEPA; PANDEY, 2010), solubilizando fósforo produzindo sideróforos (DASTAGER; DEEPA; PANDEY, 2010).

Mycobacterium é um gênero que inclui bactérias sem mobilidade e dotadas de uma parede celular espessa, possuem metabolismo aeróbio (VAZ et al., 2016). Dentro do gênero há várias espécies patogênicas incluindo bactérias causadoras da tuberculose (VAZ et al., 2016). Quando associado as plantas, bactérias do gênero *Mycobacterium* podem promover o crescimento vegetal por produção do fitohormônio ácido indol acético (AIA)

(TSAVKELOVA; CHERDYNTSEVA; NETRUSOV, 2005) e por estimular a absorção de azoto, fósforo e potássio em solos com baixa oferta destes nutrientes (EGAMBERDIYEVA, 2007).

Streptomyces é um gênero de bactérias gram-positivas que apresentam uma forma filamentosa se assemelhando aos fungos, desenvolvem uma camada de hifas com esporos que conseguem crescer em várias condições ambientais. Conseguem produzir compostos com propriedades antifúngicas, antivirais, antitumorais, anti-hipertensivos, antibióticas e imunossupressores (DE LIMA PROCÓPIO et al., 2012). É um gênero que também consegue promover o crescimento vegetal por conta da produção do fitohormônio *ácido indol acético* (AIA) e por produzir sideróforos (SADEGHI et al., 2012).

Integrantes do gênero *Bacillus* são bactérias gram-positivas mesófilas de metabolismo aeróbio ou anaeróbio facultativo capazes de formar endósporos (BARROS, 2004), estão presentes em diversos ambientes (VERMA et al., 2016). Bactérias do gênero *Bacillus* podem sintetizar uma variedade de compostos antimicrobianos (FICKERS, 2012; SUMI et al., 2014). Também promovem o crescimento vegetal por meio da síntese de antimicrobianos, fitohormônios, biossurfactantes e pelo biocontrole de fitopatógenos (SANTOYO; OROZCO-MOSQUEDA; GOVINDAPPA, 2012).

O gênero *Staphylococcus* agrupa bactérias gram-positivas mesófilas e imóveis encontradas isoladas ou agrupadas na forma de “cachos”, possuem metabolismo anaeróbio facultativo (CORDEIRO, 2011). O gênero possui espécies patogênicas para o ser humano, que colonizam mucosas intestinais e principalmente a mucosa nasal (PEREIRA et al., 2009). Os estafilococos conseguem desenvolver resistência a vários antibióticos e parte das espécies patogênicas conseguem produzir enzimas que coagulam o plasma sanguíneo (PEREIRA et al., 2009). Há relatos de estafilococos endofíticos de plantas que possuem genes para síntese de auxina e sideróforos (CHAUDHRY et al., 2017).

O gênero *Acinetobacter* inclui um grande grupo de bactérias gram-negativas presentes em diferentes ecossistemas naturais e podem causar infecções oportunistas em humanos, muito provavelmente por possuírem uma bioquímica e fisiologia versáteis (TOUCHON et al., 2014). Em relação as plantas, bactérias do gênero *Acinetobacter* atuam na promoção do crescimento vegetal pela produção de hormônios vegetais, solubilização de fosfato, produção de sideróforos e biocontrole de fitopatógenos e pragas (ROKHBAKHSH-ZAMIN et al., 2011).

Burkholderia é um gênero que abriga bactérias gram-negativas que vivem em solos ácidos (STOPNISEK et al., 2014; TAGO et al., 2014) e algumas espécies desse gênero podem estabelecer relações de antagonismo ou de mutualismo com fungos (VIAL et al., 2007). Apresentam potencial biotecnológico por promoverem o crescimento vegetal através da fixação de nitrogênio (PEIX et al., 2001), produção de fitohormônios (CASTRO-GONZÁLEZ et al., 2011) e também produzem enzimas hidrolíticas com importância comercial (EBERL & VANDAMME, 2016).

As espécies presentes dentro do gênero *Cupriavidus* são bactérias gram-negativas comensais ou mutualistas (LYKIDIS et al., 2010) que apresentam a capacidade de estabelecer relação com plantas leguminosas por meio da formação de nódulos de fitoextração de metais tóxicos (CHEN et al., 2008; KLONOWSKA et al., 2012).

O gênero *Pseudomonas* reúne um grupo de bactérias gram-negativas aeróbicas encontradas em biofilmes ou em formas planctônicas. São bactérias que possuem metabolismo adaptável e por isso conseguem habitar vários ambientes como solo e água. Também conseguem estabelecer associações com plantas e animais (ÖZEN & USSERY, 2012). Bactérias do gênero *Pseudomonas* tem grande importância nas áreas médica e biotecnológica. A maioria dos *Pseudomonas* patogênicos tem as plantas como alvo (ÖZEN & USSERY, 2012). *Pseudomonas* são capazes de promover o crescimento vegetal por

produzirem quelantes de ferro, antimicrobianos e por induzirem a resistência sistêmica em plantas (SANTOYO; OROZCO-MOSQUEDA; GOVINDAPPA, 2012). Bactérias deste gênero produzem os biossurfactantes mais estudados, os do tipo raminolipídeos (TULEVA; IVANOV; CHRISTOVA, 2002).

Membros do gênero *Ralstonia* são bactérias gram-negativas oligotróficas e vivem em ambientes úmidos (solos, rios e lagos de água doce). Apresentam-se adaptadas a sobrevivência em ambientes com poucos nutrientes (ZHANG & QIU, 2016). Algumas bactérias deste gênero podem ser responsáveis por infecções hospitalares graves (RYAN & ADLEY, 2014). Também são patogênicas para as plantas (WICKER et al., 2012) mas apresentam potencial para biorremediação de ambientes contaminados com metais pesados (RYAN; PEMBROKE; ADLEY, 2007).

Filogenia baseada no gene *16S rRNA*

Os resultados de bootstrap obtidos com as árvores filogenéticas foram comparados com os valores de similaridade de sequência obtidos com a ferramenta Blast do banco de dados Genbank NCBI e com os escores de S_{ab} das sequências obtidos com a ferramenta Sequence Match do banco de dados RDP.

Os isolados 09, 110 e 137 pertencentes ao gênero *Acinetobacter* apresentaram bons resultados de bootstrap (89% para os isolados 09 e 137, e 82% para o isolado 110) e com proximidade às espécies *A. nosocomialis* RUH 2376^(T) (isolados 09 e 137) e *A. calcoaceticus* NCCB 22016^(T) (isolado 110) (**Figura 9**). O isolado 09 apresentou 98% de similaridade com *A. nosocomialis* (NCBI-Blast) e um valor de S_{ab} de 0.875 para *A. calcoaceticus* (RDP-Seqmatch) (**Anexo 3**). O isolado 110 mostrou 99% de similaridade de sequência com *A. oleivorans* (NCBI-Blast) e um S_{ab} de 0.973 com *A. calcoaceticus* (RDP-Seqmatch) (**Anexo 3**).

O único isolado representante do gênero *Arthrobacter*, o isolado 112 mostra-se relacionado com a espécie *A. histidinovorans* DSM 20115^(T), mas ao mesmo tempo apresenta um valor de bootstrap com pouca confiabilidade (**Figura 10**). O isolado 112 possui similaridade de 99% com a espécie *Paenarthrobacter nicotinovorans* (NCBI-Blast) enquanto possui um S_{ab} com valor de 0.965 para a espécie *A. nicotinovorans* (RDP-Seqmatch) (**Anexo 3**).

Entre os isolados obtidos e pertencentes ao gênero *Bacillus*, os isolados 10, 19, 31, 37, 49, 50, 52, 55, 63, 77, 85 e 95 mostraram-se próximos das espécies *B. qingshengii* G19^(T) (isolados 10 e 77), *B. aryabhatai* B8W22^(T) (isolado 19), *B. thuringiensis* IAM 12077^(T) (isolados 37 e 85), *B. pumilus* ATCC 7061^(T) (isolados 63), *B. invictae* Bi.FFUP1^(T) (isolado 95) e *B. safensis* FO-036b^(T) (isolados 31, 49, 50, 52 e 55), mas todos exibiram baixos valores de bootstrap o que torna seus nós com as espécies mais próximas menos confiáveis (**Figura 11**). Entretanto os isolados 10, 19, 77 tem 99% de similaridade (NCBI-Blast) e valores de S_{ab} de 0.953 a 0.989 com *B. aryabhatai* (RDP-Seqmatch) (**Anexo 3**). Os isolados 31, 49, 50, 52, 55, 63 e 95 possuem similaridade de sequência de 99% com *B. zhangzhouensis* (NCBI-Blast) e um valor de S_{ab} de 0.976 para *B. safensis* (RDP-Seqmatch) (**Anexo 3**). O isolado 37 mostrou similaridade de 99% (NCBI-Blast) e S_{ab} de 0.953 a 1.00 que apontam para a espécie *B. toyonensis* (RDP-Seqmatch) (**Anexo 3**). O isolado 85 apresentou similaridade de 99% com *B. wiedmannii* (NCBI-Blast) e S_{ab} de 0.970 para *B. toyonensis* (RDP-Seqmatch) (**Anexo 3**).

Os isolados do gênero *Bacillus* que exibiram valores de bootstrap confiáveis foram os isolados 18 (87%), 23 (87%), 26 (73%), 28 (87%), 79 (73%), 127 (76%) e 130 (81%). Estes isolados estavam relacionados com as espécies *B. megaterium* IAM 13418^(T) (isolado 26), *B. cereus* JCM 2152^(T) (isolados 18, 23 e 28), *B. amyloliquefaciens* S2QPS11^(T) (isolado 79), *B. pumilus* ATCC 7061^(T) (isolados 127) e *B. tequilenses* 10b^(T) (isolado 130) (**Figura 11**). Os

isolados 18, 23 e 28 apresentam 99% de similaridade (NCBI-Blast) e S_ab de 0.922 a 1.00 com a espécie *B. toyonensis* (RDP-Seqmatch) (**Anexo 3**). O isolado 26 tem 99% de similaridade com *B. megaterium* (NCBI-Blast) e um valor de S_ab de 0.971 para *B. aryabhatai* (RDP-Seqmatch) (**Anexo 3**). O isolado 79 possui um nível de similaridade de 97% com *B. velezensis* (NCBI-Blast) e valor de S_ab de 0.897 com *B. amyloliquefaciens* (RDP-Seqmatch) (**Anexo 3**). O isolado 127 mostrou similaridade de 99% com *B. zhangzhouensis* (NCBI-Blast) e S_ab de 0.984 com *B. safensis* (RDP-Seqmatch) (**Anexo 3**). O isolado 130 apresentou 99% de similaridade (NCBI-Blast) e S_ab de 0.978 correspondentes a espécie *B. subtilis* (RDP-Seqmatch) (**Anexo 3**).

Isolados 117, 129 e 132 do gênero *Burkholderia*, sendo que os isolados 117 e 132 mostram-se intimamente relacionados um com outro e próximos da espécie *B. diffusa* R-15930^(T), mas apresentam um valor de bootstrap com baixa confiabilidade no nó com *B. diffusa* R-15930^(T) (**Figura 12**). Já o isolado 129 mostra proximidade com a espécie *B. pyrrocinia* LMG 14191^(T), mas também exibe valor de bootstrap baixo (**Figura 12**). O isolado 132 possui uma similaridade de sequência de 98% com *B. diffusa* (NCBI-Blast) e valor S_ab de 0.937 também com *B. diffusa* (RDP-Seqmatch), enquanto que, o isolado 117 mostra uma similaridade de 99% com *B. diffusa* (NCBI-Blast) mas apresenta um S_ab de 0.947 para a espécie *B. plantarii* (RDP-Seqmatch). E o isolado 129 tem 99% de similaridade (NCBI-Blast) e S_ab de 0.965 com a espécie *B. lata* (RDP-Seqmatch) (**Anexo 3**).

Os isolado 40 representante do gênero *Cellulomonas*, está mais relacionado com as espécies *C. biazotea* DSM20112^(T) e *C. fimi* DSM20113^(T), apresenta um valor de bootstrap de 73% considerado confiável (**Figura 13**). Mas o isolado 40 mostra 98% de similaridade de sequência com *C. chitinilytica* (NCBI-Blast) e valor de S_ab de 0.932 também com *C. chitinilytica* (RDP-Seqmatch) (**Anexo 3**).

Isolados 54 e 59 pertencentes ao gênero *Cupriavidus*, mostram semelhança com as

espécies *C. laharis* 1263a^(T) e *C. pinatubonensis* 1245^(T) respectivamente, mas ao mesmo tempo possuem baixos valores de bootstrap indicando baixa confiabilidade (**Figura 14**). O isolado 54 possui 99% de similaridade com *C. oxalaticus* (NCBI-Blast) e um valor de S_{ab} de 0.885 para *C. taiwanensis* (RDP-Seqmatch) (**Anexo 3**). Já o isolado 59 possui 99% de similaridade com *C. numazuensis* (NCBI-Blast) e valor S_{ab} de 0.943 para *C. necator* (RDP-Seqmatch) (**Anexo 3**).

O representante do gênero *Microbacterium*, o isolado 66, está próximo da espécie *M. trichotecenolyticum* DSM 8608^(T) só que apresenta baixo valor de bootstrap (**Figura 15**). Também apresenta similaridade de 99% (NCBI-Blast) e S_{ab} de 0.912 para a espécie *M. Trichotecenolyticum* (RDP-Seqmatch) (**Anexo 3**).

O isolado 75 pertencente ao gênero *Micrococcus* ficou posicionado próximo a espécie *M. yunnanensis* YIM 65004^(T) mas ao mesmo tempo obteve um valor de bootstrap muito pobre (**Figura 16**). O isolado 75 ainda mostrou similaridade de 98% de sua sequência com a espécie *M. luteus* (NCBI-Blast) mas também um S_{ab} de 0.908 para a espécie *M. Yunnanensis* (RDP-Seqmatch) (**Anexo 3**).

O único representante obtido do gênero *Mycobacterium*, o isolado 35, ficou posicionado próximo a espécie *M. parafortuitum* DSM 43528^(T) no entanto apresentou um valor de bootstrap abaixo do considerado satisfatório (**Figura 17**). Mas os resultados de similaridade mostraram que a sequência do isolado 35 é 99% semelhante a espécie *M. Parafortuitum* (NCBI-Blast) e valor de S_{ab} de 0.963 também aponta para a espécie *M. Parafortuitum* (RDP-Seqmatch) (**Anexo 3**).

As sequências obtidas com os isolados 13, 45, 48, 71, 104, 105 e 107 mostraram similaridade com espécies do gênero *Pseudomonas*. Os isolados 13, 45, 48, 104, 105 e 107 formaram um clado com proximidade a *P. nitroreducens* IAM 1439^(T) mas com um valor de bootstrap muito baixo (**Figura 18**). Todos apresentaram um valor de similaridade de 99%

com *P. nitroreducens* (NCBI-Blast) e exibiram valores de 0.948 a 0.970 de S_ab para *P. nitroreducens* (RDP-Seqmatch) (**Anexo 3**). Enquanto que o isolado 71 exibiu proximidade com *P. plecoglossicida* FPC 951^(T) e apresentou um valor confiável de bootstrap de 79% (**Figura 18**). O isolado 71 exibiu um valor de 99% de similaridade com *P. plecoglossicida* (NCBI-Blast) e um valor de 0.978 S_ab com *P. monteilii* (RDP-Seqmatch) (**Anexo 3**).

O isolado 131 representante do gênero *Ralstonia* manteve-se próximo a espécie *R. picketii* ATCC 27511^(T) mas exibiu um valor de bootstrap baixo e não confiável (**Figura 19**). O isolado 131 tem uma sequência com 99% de similaridade com *R. picketii* (NCBI-Blast) e apresenta um S_ab de 0.939 para a espécie *R. syzygii* (RDP-Seqmatch) (**Anexo 3**).

Os isolados 05, 27, 96 e 135 pertencentes ao gênero *Staphylococcus* mostraram-se valores de bootstrap confiáveis (93%, 93%, 89% e 73% respectivamente) e proximidade com espécies *S. warneri* ATCC 27836^(T) (isolados 05 e 27), *S. hominis* DSM 20328^(T) (isolado 96) e *S. epidermidis* ATCC 14990^(T) (isolado 135). Os isolados 81 e 133 mostraram ser próximos da espécie *S. saprophyticus subsp. bovis* GTC 843^(T), mas apresentaram valores de bootstrap muito baixos (**Figura 20**). Os isolados 05 e 27 apresentaram valor de 99% de similaridade com *S. warneri* (NCBI-Blast), o isolado 05 possui valor S_ab de 0.943 com *S. pasteurii* enquanto que o isolado 27 apresentou valor de S_ab de 0.942 para *S. warneri* (RDP-Seqmatch) (**Anexo 3**). O isolado 96 exibiu similaridade de 99% (NCBI-Blast) e S_ab de 0.984 (RDP-Seqmatch) com *S. hominis* (**Anexo 3**). Os isolados 81 e 133 apresentaram 99% de similaridade (NCBI-Blast) e S_ab 0.977 e 0.950 (RDP-Seqmatch) com *S. saprophyticus* (**Anexo 3**). O isolado 135 mostrou 99% de similaridade (NCBI-Blast) e S_ab de 1.000 (RDP-Seqmatch) com *S. epidermidis* (**Anexo 3**).

O único representante do gênero *Streptomyces*, o isolado 02 exibiu um valor de 71% de bootstrap e está relacionado com a espécie *S. atrovirens* NRRL B-163557^(T) (**Figura 21**). Possui 98% de similaridade com a espécie *S. atrovirens* (NCBI-Blast) e um S_ab de 0.908

para a espécie *S. griseorubens* (**Anexo 3**).

O isolado 87 pertencente ao gênero *Terrabacter* obteve um valor de bootstrap muito confiável (96%) e apresentou proximidade com a espécie *T. terrigena* ON10^(T) (**Figura 22**). O isolado também apresentou similaridade de 99% com *T. terrigena* (NCBI-Blast) e um valor de S_{ab} de 0.932 com *T. koreensis* (RDP-Seqmatch) (**Anexo 3**).

3.5. Conclusão

No presente estudo, por meio dos resultados obtidos pode-se concluir que *Baccharis dracunculifolia* DC, além de ser uma espécie vegetal de valor comercial, também possui uma comunidade de microrganismos associativos pertencentes principalmente aos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* capazes de produzir biossurfactantes que solubilizam petróleo bruto e que emulsificaram querosene comercial de forma eficiente, apresentando um potencial biotecnológico a ser explorado.

Também foi possível concluir que o isolado 48 (solo) pertencente ao gênero *Pseudomonas* e os isolados 130 e 131 (endofíticos) pertencentes ao gênero *Bacillus* obtiveram os melhores resultados nos ensaios de espalhamento de óleo e no índice de emulsão, com exceção do isolado 131 que obteve bom resultado apenas no índice de emulsão.

REFERÊNCIAS

- ADEMAR FILHO, A. et al. Antimicrobial activity of the extract and isolated compounds from *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 63, n. 1-2, p. 40-46, 2008.
- ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L.; PAREDES-GUZMÁN, J.; PARK, Y. K. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 909-915, 2005.
- ALEXANDER, D. B.; ZUBERER, D. A. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. **Biology and Fertility of Soils**, v. 12, n. 1, p. 39-45, 1991.
- ALI, S. S.; VIDHALE, N. N. Bacterial siderophore and their application: a review. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 2, n. 12, p. 303-312, 2013.
- ALLEN, M. J.; EDBERG, S. C.; REASONER, D. J. Heterotrophic plate count bacteria - what is their significance in drinking water?. **International journal of food microbiology**, v. 92, n. 3, p. 265-274, 2004.
- ALTSCHUL, Stephen F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- AMARAL NASCIMENTO, A. M. Use of the rRNA operon and genomic repetitive sequences for the identification of bacteria. **Handbook of Molecular Microbial Ecology I: Metagenomics and Complementary Approaches**, p. 29-39, 2011.
- ANGELINI, T. E. et al. *Bacillus subtilis* spreads by surfing on waves of surfactant. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 43, p. 18109-18113, 2009.
- ARAÚJO, L. V.; FREIRE, D. M. G.; NITSCHKE, M. Biosurfactants: anticorrosive, antibiofilm and antimicrobial properties. **Química Nova**, v. 36, n. 6, p. 848-858, 2013.
- ARORA, N. K. Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets. **Department of Environmental Microbiology, Babasaheb Bhimrao Ambedkar University**, p. 2-25, 2001.
- ARORA, N. K. Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets. **Springer**, India, 2015.
- BACILIO-JIMÉNEZ, M. et al. Endophytic bacteria in rice seeds inhibit early colonization of roots by *Azospirillum brasilense*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, n. 2, p. 167-172, 2001.
- BADRI, D. V. et al. Application of natural blends of phytochemicals derived from the root exudates of *Arabidopsis* to the soil reveal that phenolic-related compounds predominantly modulate the soil microbiome. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 7, p. 4502-4512, 2013.
- BAETZ, U.; MARTINOIA, E. Root exudates: the hidden part of plant defense. **Trends in**

Plant Science, v. 19, n. 2, p. 90-98, 2014.

BAIS, H. P.; FALL, R.; VIVANCO, J. M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. **Plant physiology**, v. 134, n. 1, p. 307-319, 2004.

BALDANI, J. I. et al. Potencial biotecnológico de bactérias diazotróficas associativas e endofíticas. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**, p. 195-232, 2002.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 53, n. 5, p. 495-508, 2000.

BARROS, F. F. C. et al. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biosurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. **Food Science and Technology** (Campinas), 2008.

BARROS, V. R. M. Estudo de fatores de patogenicidade de *Bacillus* spp isolado em leite UHT. Tese de Doutorado. **Universidade de São Paulo**. 2004.

BARROSO, G. M. Compositae-subtribo Baccharidinae Hoffmann, estudo das espécies ocorrentes no Brasil. **Rodriguésia**, v. 28, n. 41, p. 3-273, 1976.

BASHAN, Y. et al. Environmental uses of plant growth-promoting bacteria. **Plant-Microbe interactions. Research Signpost, Trivandrum, Kerala, India**, p. 69-93, 2008.

BELINI, C. M. B. *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae): composição do óleo essencial, diversidade e parâmetros genéticos. 2015. xii, 91 f. Tese (Doutorado em Ciências Agrônômicas) - **Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho**, Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, 2015.

BENINCASA, M. et al. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 85, n. 1, p. 1-8, 2004.

BENITE, A. M. C.; DE PMACHADO, S.; DA CMACHADO, B. Sideroforos:" uma Resposta dos Microorganismos". **Química nova**, v. 25, n. 6/B, p. 1155-1164, 2002.

BERENDSEN, R. L.; PIETERSE, C. M. J.; BAKKER, P. A. H. M. The rhizosphere microbiome and plant health. **Trends in plant science**, v. 17, n. 8, p. 478-486, 2012.

AKINSANYA, M. A. et al. Metagenomics study of endophytic bacteria in *Aloe vera* using next-generation technology. **Genomics data**, v. 6, p. 159-163, 2015.

BERG, G. et al. Unraveling the plant microbiome: looking back and future perspectives. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 148, 2014.

BERIĆ, T. et al. Antimicrobial activity of *Bacillus* sp. natural isolates and their potential use in the biocontrol of phytopathogenic bacteria. **Food Technology and Biotechnology**, v. 50, n. 1, p. 25-31, 2012.

BERTIN, C.; YANG, X.; WESTON, L. A. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. **Plant and soil**, v. 256, n. 1, p. 67-83, 2003.

BODOUR, A. A.; MILLER-MAIER, R. M. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 32, n. 3, p. 273-280, 1998.

BOLTON, J. R. H. Microbial ecology of the rhizosphere. **Soil microbial ecology**, p. 27-63, 1993.

BOOM, R. M. Emulsions: principles and preparation. In: Food Materials Science. **Springer**, New York, NY, p. 305-339. 2008.

BUDEL, J. M. et al. Morfoanatomia foliar e caulinar de *Baccharis dracunculifolia* DC, Asteraceae. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, n. 4, p. 477-483, 2004.

BUENO S. M. Bactérias Produtoras de Biossurfactantes: Isolamento, Produção, Caracterização e Comportamento num Sistema modelo. Tese de doutorado. São José do Rio Preto (SP): **Universidade Estadual Paulista**. Instituto de Biociências, Letras e Ciência Exatas; 89 p. 2008.

BURCH, A. Y. et al. Comparison of biosurfactant detection methods reveals hydrophobic surfactants and contact-regulated production. **Environmental microbiology**, v. 13, n. 10, p. 2681-2691, 2011.

CASTRO-GONZÁLEZ, R. et al. High diversity of culturable Burkholderia species associated with sugarcane. **Plant and soil**, v. 345, n. 1-2, p. 155-169, 2011.

CATTELAN, A. J. Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal. **Embrapa Soja**. Documentos, 1999.

CAVAGLIERI, L.; ORLANDO, J.; ETCHEVERRY, M. Rhizosphere microbial community structure at different maize plant growth stages and root locations. **Microbiological research**, v. 164, n. 4, p. 391-399, 2009.

CHAUDHRY, V. et al. Glimpse into the Genomes of Rice Endophytic Bacteria: Diversity and Distribution of Firmicutes. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 2115, 2017.

CHEN, W. et al. Metal biosorption capability of *Cupriavidus taiwanensis* and its effects on heavy metal removal by nodulated *Mimosa pudica*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 151, n. 2-3, p. 364-371, 2008.

CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I. B. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, n. 6, p. 915-929, 2002.

CHRISTOPHERSON, M. R. et al. The genome sequences of *Cellulomonas fimi* and “*Cellvibrio gilvus*” reveal the cellulolytic strategies of two facultative anaerobes, transfer of “*Cellvibrio gilvus*” to the genus *Cellulomonas*, and proposal of *Cellulomonas gilvus* sp.

nov. **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e53954, 2013.

COLE, J. R. et al. The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. **Nucleic acids research**, v. 33, n. suppl_1, p. D294-D296, 2005.

COMPANT, S. et al. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 9, p. 4951-4959, 2005.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and environmental microbiology**, v. 53, n. 2, p. 224-229, 1987.

CORDEIRO, M.M. Caracterização molecular de cepas de *Staphylococcus aureus* isolados no Hospital Municipal de Ipatinga/MG. Dissertação (Mestrado). **Universidade Federal de Ouro Preto**, OuroPreto, p. 71, 2011.

CRAWFORD, D. L. et al. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 11, p. 3899-3905, 1993.

CUNHA, I. B. D. S. et al. Antitrypanosomal activity of Brazilian Propolis from *Apis mellifera*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 52, n.5, p.602-604, 2004.

CUZZI, C. et al. Endophytic fungi of the “vassourinha” (*Baccharis dracunculifolia* DC, Asteraceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 10, n. 2, p. 135, 2012.

DA SILVA, F. S. F. et al. Produção de biossurfactantes por cepas bacterianas de origem marinha utilizando querosene como fonte de carbono. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 11, n. 1, p. 07-18, 2017.

DALTIN, D. Tensoativos: química, propriedades e aplicações. **São Paulo: Blucher**, 2011.

DASTAGER, S. G.; DEEPA, C. K.; PANDEY, A. Isolation and characterization of novel plant growth promoting *Micrococcus* sp NII-0909 and its interaction with cowpea. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 987-992, 2010.

DE LIMA PROCÓPIO, R. E. et al. Antibiotics produced by *Streptomyces*. **The Brazilian Journal of infectious diseases**, v. 16, n. 5, p. 466-471, 2012.

DE SANTANA, R. S. M. Caracterização da comunidade bacteriana endofítica de *Baccharis dracunculifolia*, com e sem galha causada por *Baccharopelma dracuncufoliae*. 2013. Tese de Doutorado. **Universidade Federal de Minas Gerais**.

DEANGELIS, K. M. et al. Selective progressive response of soil microbial community to wild oat roots. **The ISME journal**, v. 3, n. 2, p. 168, 2009.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, n. 2, p. 107-149, 2003.

DOS SANTOS, S. C. et al. Biosurfactant production from pseudomonas strains isolated in rhizospheric soils from semi-arid area of Bahia, Brazil. **SITIENIBUS série Ciências Biológicas**, v. 12, n. 1, p. 157-163, 2012.

DUARTE, S. et al. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v.26, n.4, p. 527-531, 2003.

DURAN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied catalysis B: environmental**, v. 28, n. 2, p. 83-99, 2000.

DUSANE, D. H. et al. Quorum sensing: implications on rhamnolipid biosurfactant production. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 27, n. 1, p. 159-184, 2010.

EBERL, L.; VANDAMME, P. Members of the genus Burkholderia: good and bad guys. **F1000Research**, v. 5, 2016.

EDDLEMAN, H. Making bacteria media from potato. **Indiana Biolab**, 1998.

EGAMBERDIEVA, D. et al. Antimicrobial activity of medicinal plants correlates with the proportion of antagonistic endophytes. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 199, 2017.

ESPÍRITO-SANTO, M. M. et al. Sexual differences in reproductive phenology and their consequences for the demography of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae), a dioecious tropical shrub. **Annals of Botany**, v. 91, n. 1, p. 13-19, 2003.

FERREIRA, A. S. et al. Implications of *Azospirillum brasilense* inoculation and nutrient addition on maize in soils of the Brazilian Cerrado under greenhouse and field conditions. **Applied soil ecology**, v. 72, p. 103-108, 2013.

FERRONATTO, R. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* DC e *Baccharis uncinella* DC (Asteraceae). **Revista brasileira farmacognosia**, v. 17, p. 224-230, 2007.

FICKERS, P. Antibiotic compounds from *Bacillus*: why are they so amazing. **American Journal of Biochemistry & Biotechnology**, n. 8, p. 38-43, 2012.

GARCIA, T. V.; KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Bactérias endofíticas como agentes de controle biológico na orizicultura. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, p. 01-09, 2015.

GAUTAM, K. K.; TYAGI, V. K. Microbial surfactants: a review. **Journal of Oleo Science**, v. 55, n. 4, p. 155-166, 2006.

GAVA, A. J.; DA SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. Tecnologia de alimentos. **NBL Editora**, 2009.

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

GOMES, V.; FERNANDES, G. W. Germination of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) achene. **Acta Botanica Brasilica**, v. 16, n. 4, p. 421-427, 2002.

GUO, B. et al. Bioactive natural products from endophytes: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 136-142, 2008.

GYANESHWAR, P. et al. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. In: Food Security in Nutrient-Stressed Environments: Exploiting Plants Genetic Capabilities. **Springer Netherlands**. p. 133-143, 2002.

HALL, T. A. et al. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: **Nucleic acids symposium series**. [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000., 1999. p. 95-98.

HALL, T. BioEdit: an important software for molecular biology. **GERF Bull Biosci**, v. 2, n. 1, p. 60-1, 2011.

HALLMANN, J. et al. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 10, p. 895-914, 1997.

HALLMANN, J. Plant interactions with endophytic bacteria. **CABI Publishing**, New York, 2001.

HARDOIM, P. R.; VAN OVERBEEK, L. S.; VAN ELSAS, J. D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in microbiology**, v. 16, n. 10, p. 463-471, 2008.

HATA, T. et al. Artepillin C, a major ingredient of Brazilian propolis, induces a pungent taste by activating TRPA1 channels. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e48072, 2012.

HIRSCH, P. R.; MAUCLINE, T. H. Who's who in the plant root microbiome?. **Nature biotechnology**, v. 30, n. 10, p. 961, 2012.

HUNGRIA, M. et al. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1-2, p. 413-425, 2010.

ILORI, M. O.; AMOBI, C. J.; ODOCHA, A. C. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. isolated from a tropical environment. **Chemosphere**, v. 61, n. 7, p. 985-992, 2005.

JAIN, D. K. et al. A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 13, n. 4, p. 271-279, 1991.

JORGE, R. et al. Brazilian propolis: seasonal variation of the prenylated p-coumaric acids and antimicrobial activity. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, n. 12, p. 889-893, 2008.

JOSHI, S. et al. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. **Bioresource technology**, v. 99, n. 1, p. 195-199, 2008.

- JÚNIOR, D. S. et al. Ação do extrato de própolis sobre a fermentação in vitro de diferentes alimentos pela técnica de produção de gases. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, p. 1093-1099, 2004.
- JUNIOR, V. F. V.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura. **Química nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.
- KEARNS, D. B. et al. A master regulator for biofilm formation by *Bacillus subtilis*. **Molecular microbiology**, v. 55, n. 3, p. 739-749, 2005.
- KLEIN, A. L.; FELIPPE, G. M. Germinação de ervas invasoras: escarificação e luz. In: **Anais do 8º Congresso da SBSP**. p. 56. 1992.
- KLONOWSKA, Agnieszka et al. Biodiversity of *Mimosa pudica* rhizobial symbionts (*Cupriavidus taiwanensis*, *Rhizobium mesoamericanum*) in New Caledonia and their adaptation to heavy metal-rich soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 81, n. 3, p. 618-635, 2012.
- KLOPELL, F. C. et al. Nerolidol, an antiulcer constituent from the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 62, n. 7-8, p. 537-542, 2007.
- KRUIJT, M.; TRAN, H.; RAAIJMAKERS, J. M. Functional, genetic and chemical characterization of biosurfactants produced by plant growth-promoting *Pseudomonas putida* 267. **Journal of applied microbiology**, v. 107, n. 2, p. 546-556, 2009.
- KUMAZAWA, S. et al. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, Oxon, v.84, n.3, p.329-339, 2004.
- LAN, G. et al. Rhamnolipid production from waste cooking oil using *Pseudomonas* SWP-4. **Biochemical engineering journal**, v. 101, p. 44-54, 2015.
- LEITÃO, D. P. S. et al. Comparative evaluation of in-vitro effects of Brazilian green propolis and *Baccharis dracunculifolia* extracts on cariogenic factors of *Streptococcus mutans*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 11, p. 1834-1839, 2004.
- DE LIMA E SILVA, T. A. et al. Produção de biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens* UCP 1514 utilizando milhocina como substrato. **Exacta**, v. 8, n. 1, p. 19-26, 2010.
- LINDOW, S. E.; BRANDL, M. T. Microbiology of the phyllosphere. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. 4, p. 1875-1883, 2003.
- LOH, J. et al. Quorum sensing in plant-associated bacteria. **Current opinion in plant biology**, v. 5, n. 4, p. 285-290, 2002.
- LYKIDIS, A. et al. The complete multipartite genome sequence of *Cupriavidus necator* JMP134, a versatile pollutant degrader. **PLoS one**, v. 5, n. 3, p. e9729, 2010.
- MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MADHAIYAN, M. et al. *Microbacterium azadirachtae* sp. nov., a plant-growth-promoting actinobacterium isolated from the rhizoplane of neem seedlings. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 60, n. 7, p. 1687-1692, 2010.

MAIER, R. M.; SOBERON-CHAVEZ, G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, n. 5, p. 625-633, 2000.

MANI, P.; SIVAKUMAR, P.; BALAN, S. S. Economic production and oil recovery efficiency of a lipopeptide biosurfactant from a novel marine bacterium *Bacillus simplex*. **Achievements in the Life Sciences**, v. 10, n. 1, p. 102-110, 2016.

MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. **Trends in biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 558-565, 2012.

MARK, G. L. et al. Transcriptome profiling of bacterial responses to root exudates identifies genes involved in microbe-plant interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 48, p. 17454-17459, 2005.

MCCULLY, M. E. Niches for bacterial endophytes in crop plants: a plant biologist's view. **Functional Plant Biology**, v. 28, n. 9, p. 983-990, 2001.

MEHANNI, M. M.; SAFWAT, M. S. A. Endophytes of medicinal plants. In: **XIII International Conference on Medicinal and Aromatic Plants 854**. 2009. p. 31-39.

MICALLEF, S. A.; SHIARIS, M. P.; COLÓN-CARMONA, A. Influence of *Arabidopsis thaliana* accessions on rhizobacterial communities and natural variation in root exudates. **Journal of experimental botany**, v. 60, n. 6, p. 1729-1742, 2009.

MONGODIN, E. F. et al. Secrets of soil survival revealed by the genome sequence of *Arthrobacter aurescens* TC1. **PLoS genetics**, v. 2, n. 12, p. e214, 2006.

MONTEIRO, R. A. et al. Herbaspirillum-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. **Plant and soil**, v. 356, n. 1-2, p. 175-196, 2012.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, p. 729, 2006.

MORIKAWA, M.; HIRATA, Y.; IMANAKA, T. A study on the structure–function relationship of lipopeptide biosurfactants. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1488, n. 3, p. 211-218, 2000.

NETO, M. R. N. et al. Estrutura e composição florística da comunidade arbustivo-arbórea de uma clareira de origem antrópica, em uma floresta estacional semidecídua motana, Lavras-MG, Brasil. **Cerne**, v. 6, n. 2, p. 79-94, 2000.

NEWTON, J. A.; FRAY, R. G. Integration of environmental and host-derived signals with quorum sensing during plant–microbe interactions. **Cellular microbiology**, v. 6, n. 3, p. 213-224, 2004.

NITSCHKE, M. et al. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

OKI, Y. et al. The influence of the endophytic fungi on the herbivores from *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). **Neotropical Biology and Conservation**, v. 4, n. 2, p. 83-88, 2009.

OKIGBO, R. N.; EME, U. E.; OGBOGU, S. Biodiversity and conservation of medicinal and aromatic plants in Africa. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v. 3, n. 6, p. 127-134, 2008.

ONGENA, M. et al. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. **Environmental microbiology**, v. 9, n. 4, p. 1084-1090, 2007.

ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in microbiology**, v. 16, n. 3, p. 115-125, 2008.

ONOFRE, S. B.; STEILMANN, P. Phenoloxidases produced by endophytic fungi isolated from *Baccharis Dracunculifolia* DC (Asteraceae). **Resources and Environment**, v. 2, n. 6, p. 271-274, 2012.

ÖZEN, A. I.; USSERY, D. W. Defining the *Pseudomonas* genus: where do we draw the line with *Azotobacter*?. **Microbial ecology**, v. 63, n. 2, p. 239-248, 2012.

PACWA-PLOCINICZAK, M. et al. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 1, p. 633-654, 2011.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 9, p. 2502-2506, 2002.

PAYNE, S. M. Detection, isolation, and characterization of siderophores. **Methods in enzymology**, v. 235, p. 329, 1994.

PEDRINHO, E. A. N. et al. Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho. **Bragantia**, p. 905-911, 2010.

PEIX, A. et al. Growth promotion of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a strain of *Burkholderia cepacia* under growth chamber conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, n. 14, p. 1927-1935, 2001.

PEREIRA, E. P. a L. et al. Avaliação da colonização nasal por *Staphylococcus* spp. resistente à oxacilina em alunos de enfermagem. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 5, p. 361-369, 2009.

PEREZ, K. J. et al. *Bacillus* spp. isolated from puba as a source of biosurfactants and antimicrobial lipopeptides. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 61, 2017.

PHILIPPOT, L. et al. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 11, p. 789, 2013.

PONTIN, K. et al. In vitro and in vivo antileishmanial activities of a Brazilian green propolis extract. **Parasitology research**, v. 103, n. 3, p. 487-492, 2008.

PRIYA, T.; USHARANI, G. Comparative study for biosurfactant production by using *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Botany Research International**, v. 2, n. 4, p. 284-287, 2009.

RAAIJMAKERS, J. M. et al. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. **FEMS microbiology reviews**, v. 34, n. 6, p. 1037-1062, 2010.

RASTOGI, G. et al. Leaf microbiota in an agroecosystem: spatiotemporal variation in bacterial community composition on field-grown lettuce. **The ISME journal**, v. 6, n. 10, p. 1812, 2012.

REASONER, D. J.; GELDREICH, E. E. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. **Applied and environmental microbiology**, v. 49, n. 1, p. 1-7, 1985.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Living inside plants: bacterial endophytes. **Current opinion in plant biology**, v. 14, n. 4, p. 435-443, 2011.

REN, H. et al. Advances in the reintroduction of rare and endangered wild plant species. **Science China Life Sciences**, v. 57, n. 6, p. 603-609, 2014.

RODRIGUES, L. et al. Biosurfactants: potential applications in medicine. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 609-618, 2006.

ROKHBAKHSH-ZAMIN, Farokh et al. Characterization of plant-growth-promoting traits of *Acinetobacter* species isolated from rhizosphere of *Pennisetum glaucum*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 6, p. 556-566, 2011.

ROMERO, D. et al. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, n. 4, p. 430-440, 2007.

RYAN, M. P.; ADLEY, C. C. *Ralstonia* spp.: emerging global opportunistic pathogens. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 33, n. 3, p. 291-304, 2014.

RYAN, Michael P.; PEMBROKE, J. Tony; ADLEY, Catherine C. *Ralstonia pickettii* in environmental biotechnology: potential and applications. **Journal of applied microbiology**, v. 103, n. 4, p. 754-764, 2007.

SACHDEV, D. P.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactants in agriculture. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 3, p. 1005-1016, 2013.

- SADEGHI, A. et al. Plant growth promoting activity of an auxin and siderophore producing isolate of *Streptomyces* under saline soil conditions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1503-1509, 2012.
- SANTANA, R. S. M. et al. Endophytic Microbiota Associated with the Root Tips and Leaves of *Baccharis dracunculifolia*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 59, 2016.
- SANTOYO, G.; OROZCO-MOSQUEDA, M. C.; GOVINDAPPA, M. Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. **Biocontrol Science and Technology**, v. 22, n. 8, p. 855-872, 2012.
- SCHEUBLIN, T. R. et al. Transcriptional profiling of Gram-positive *Arthrobacter* in the phyllosphere: induction of pollutant degradation genes by natural plant phenolic compounds. **Environmental microbiology**, v. 16, n. 7, p. 2212-2225, 2014.
- SCHEUBLIN, T. R.; LEVEAU, J. H. J. Isolation of *Arthrobacter* species from the phyllosphere and demonstration of their epiphytic fitness. **Microbiologyopen**, v. 2, n. 1, p. 205-213, 2013.
- SESSITSCH, A. et al. Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 25, n. 1, p. 28-36, 2012.
- SFORCIN, J. M. et al. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, n. 1, p. 243-249, 2000.
- SHAHALIYAN, F.; SAFAHIEH, A.; ABYAR, H. Evaluation of Emulsification Index in Marine Bacteria *Pseudomonas* sp. and *Bacillus* sp. Arabian **Journal for Science and Engineering**, v. 40, n. 7, p. 1849-1854, 2015.
- SHARMA, A.; JOHRI, B. N. Growth promoting influence of siderophore-producing *Pseudomonas* strains GRP3A and PRS 9 in maize (*Zea mays* L.) under iron limiting conditions. **Microbiological research**, v. 158, n. 3, p. 243-248, 2003.
- SHI, S. et al. Effects of selected root exudate components on soil bacterial communities. **FEMS microbiology ecology**, v. 77, n. 3, p. 600-610, 2011.
- SHIMIZU, M. Endophytic actinomycetes: biocontrol agents and growth promoters. In: *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses*. **Springer Berlin Heidelberg**, 2011. p. 201-220.
- SILVA, D. S. e et al . Antiviral activity of a *Bacillus* sp: P34 peptide against pathogenic viruses of domestic animals. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo , v. 45, n. 3, p. 1089-1094, 2014.
- SIMÕES, L. M. C. et al. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. **Journal of ethnopharmacology**, v. 94, n. 1, p. 59-65, 2004.
- SNOOK, M. E. et al. Isolation and characterization of Leu7-surfactin from the endophytic

bacterium *Bacillus mojavensis* RRC 101, a biocontrol agent for *Fusarium verticillioides*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 10, p. 4287-4292, 2009.

SOARES, K. A. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extrato de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) sobre bactérias gram negativas e gram positivas. **Ensaio e Ciência: C. Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 17, n. 4, 2015.

STOPNISEK, N. et al. Genus-wide acid tolerance accounts for the biogeographical distribution of soil *Burkholderia* populations. **Environmental microbiology**, v. 16, n. 6, p. 1503-1512, 2014.

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

SUMI, Chandra Datta et al. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics. **Canadian journal of microbiology**, v. 61, n. 2, p. 93-103, 2014.

TAGO, K. et al. A fine-scale phylogenetic analysis of free-living *Burkholderia* species in sugarcane field soil. **Microbes and environments**, v. 29, n. 4, p. 434-437, 2014.

TEIXEIRA, Manoel Araújo et al. Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovarietades em três estados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 43-49, 2007.

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.

TOUCHON, M. et al. The genomic diversification of the whole *Acinetobacter* genus: origins, mechanisms, and consequences. **Genome biology and evolution**, v. 6, n. 10, p. 2866-2882, 2014.

TRUYENS, S. et al. Bacterial seed endophytes: genera, vertical transmission and interaction with plants. **Environmental Microbiology Reports**, v. 7, n. 1, p. 40-50, 2015.

TSAVKELOVA, E. A.; CHERDYNTSEVA, T. A.; NETRUSOV, A. I. Auxin production by bacteria associated with orchid roots. **Microbiology**, v. 74, n. 1, p. 46-53, 2005.

TSAVKELOVA, E. A. et al. Orchid-associated bacteria produce indole-3-acetic acid, promote seed germination, and increase their microbial yield in response to exogenous auxin. **Archives of Microbiology**, v. 188, n. 6, p. 655-664, 2007.

TULEVA, B. K.; IVANOV, G. R.; CHRISTOVA, N. E. Biosurfactant production by a new *Pseudomonas putida* strain. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 57, n. 3-4, p. 356-360, 2002.

TURNER, T. R.; JAMES, E. K.; POOLE, P. S. The plant microbiome. **Genome biology**, v. 14, n. 6, p. 209, 2013.

VANDENKOORNHUYSE, P. et al. The importance of the microbiome of the plant

holobiont. **New Phytologist**, v. 206, n. 4, p. 1196-1206, 2015.

VAZ, M. H. M. C. et al. Estudo do papel do gene Rv1358 no estabelecimento e maturação dos biofilmes formados por bactérias do complexo *Mycobacterium Tuberculosis*. Tese de Doutorado. 2016. Biologia Molecular e Genética, **Universidade de Lisboa**, Faculdade de Ciências, 2016.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.

VERMA, P. et al. Molecular diversity and multifarious plant growth promoting attributes of Bacilli associated with wheat (*Triticum aestivum* L.) rhizosphere from six diverse agro-ecological zones of India. **Journal of basic microbiology**, v. 56, n. 1, p. 44-58, 2016.

VERMA, V. C.; GANGE, A. C. *Advances in Endophytic Research*. **Springer**, 2014.

VIAL, L. et al. Burkholderia diversity and versatility: an inventory of the extracellular products. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 17, n. 9, p. 1407-1429, 2007.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). **Microb. Genet. Bull**, v. 13, n. 4, p. 2-43, 1956.

WICKER, E. et al. Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA. **The ISME journal**, v. 6, n. 5, p. 961, 2012.

WOESE, Carl R. Bacterial evolution. **Microbiological reviews**, v. 51, n. 2, p. 221, 1987.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. 2002.

YANG, S.; WEI, D.; MU, B. Determination of the amino acid sequence in a cyclic lipopeptide using MS with DHT mechanism. **Journal of biochemical and biophysical methods**, v. 68, n. 1, p. 69-74, 2006.

YOUSSEF, N. H. et al. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, n. 3, p. 339-347, 2004.

ZHANG, L. et al. *Cellulomonas marina* sp. nov., isolated from deep-sea water. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 63, n. 8, p. 3014-3018, 2013.

ZHANG, Y.; QIU, S. Phylogenomic analysis of the genus *Ralstonia* based on 686 single-copy genes. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 109, n. 1, p. 71-82, 2016.

ZHAO, J. et al. Plant-derived bioactive compounds produced by endophytic fungi. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 11, n. 2, p. 159-168, 2011.

HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo. **Londrina: Embrapa Soja**, 2011.

COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. 2003

Biosurfactants Market by Type (Glycolipids (Sophorolipids, Rhamnolipids), Lipopeptides, Phospholipids, Polymeric Biosurfactants), Application (Detergents, Personal Care, Agricultural Chemicals, Food Processing), and Region - Global Forecast to 2022.

MARKETS AND MARKETS. 2017. Disponível em:<
<https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biosurfactant-market-163644922.html>>
Acesso em: 5 de julho de 2018.

SCHULZ, B. What are endophytes? En: B. Schulz, CJ Boyle and TN Sieber.(eds.). Microbial root endophytes. **Springer, Berlin, Heidelberg**, v. 9, p. 13, 2006.

WEYENS, N. et al. Plant-associated bacteria and their role in the success or failure of metal phytoextraction projects: first observations of a field-related experiment. **Microbial biotechnology**, v. 6, n. 3, p. 288-299, 2013.

CASE, R. J. et al. Use of *16S rRNA* and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 1, p. 278-288, 2007.

JANDA, J. Michael; 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.

PACE, N. R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276: 734–740. 1997.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B. M.; PACE, N. R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of bacteriology**, v. 180, n. 18, p. 4765-4774, 1998

VAN DE PEER, Y.; CHAPELLE, S.; DE WACHTER, R. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. **Nucleic acids research**, v. 24, n. 17, p. 3381-3391, 1996.

BAKER, G. C.; SMITH, J. J.; COWAN, D. A. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. **Journal of microbiological methods**, v. 55, n. 3, p. 541-555, 2003.

CHENEBY, D. et al. 16S rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 34, n. 2, p. 121-128, 2000.

KEMBEL, Steven W. et al. Incorporating 16S gene copy number information improves estimates of microbial diversity and abundance. **PLoS computational biology**, v. 8, n. 10, p. e1002743, 2012.

DAS, S. et al. Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms. **Journal of microbiological methods**, v. 103, p. 80-100, 2014.

GEE, J. E. et al. Use of *16S rRNA* gene sequencing for rapid confirmatory identification of *Brucella* isolates. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 8, p. 3649-3654, 2004.

STALEY, J. T. The bacterial species dilemma and the genomic–phylogenetic species concept. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 361, n. 1475, p. 1899-1909, 2006.

DO NASCIMENTO, R. P. et al. *Microbiologia Industrial: Bioprocessos*. Elsevier Brasil, 2017.

GOTO, K. et al. Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus *Bacillus*. **The Journal of general and applied microbiology**, v. 46, n. 1, p. 1-8, 2000.

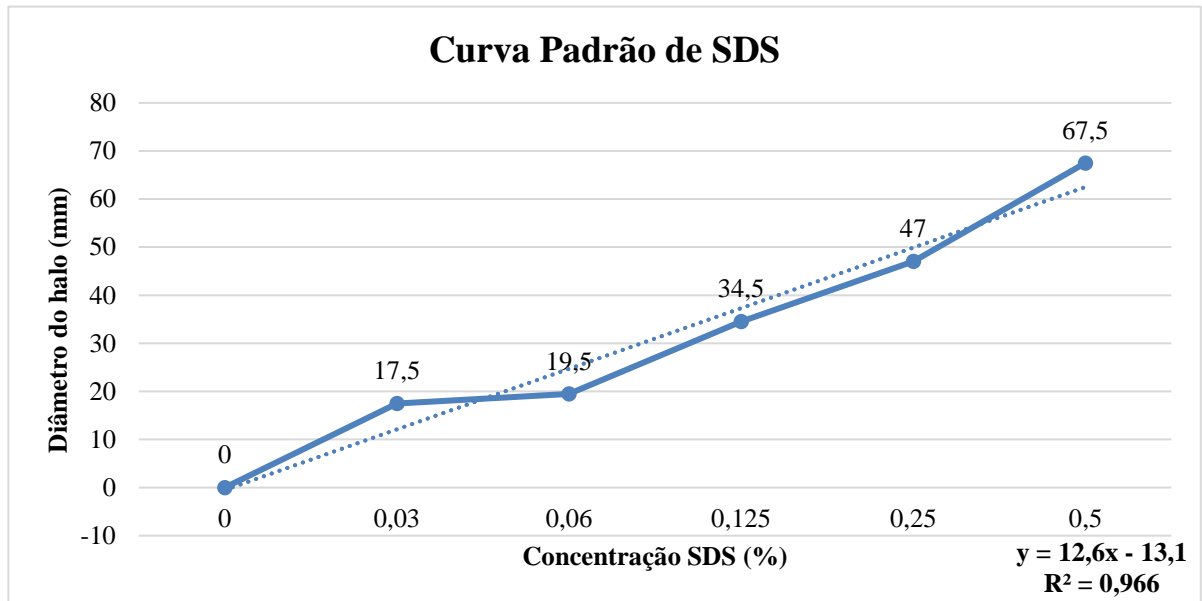
CAPORASO, J. G. et al. Global patterns of *16S rRNA* diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. Supplement 1, p. 4516-4522, 2011.

LIU, Z. et al. Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. **Nucleic acids research**, v. 35, n. 18, p. e120, 2007.

CLARRIDGE, J. E. Impact of *16S rRNA* gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clinical microbiology reviews**, v. 17, n. 4, p. 840-862, 2004.

TAMURA, K. et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular biology and evolution**, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, 2007.

ANEXOS



Anexo 1 - Curva padrão de dodecil sulfato de sódio (SDS), com linha de tendência e com R^2 (seu valor está entre 0 e 1, quanto maior o valor mais explicativo é o modelo).

Anexo 2 - Tabela com todos os isolados identificados com a classificação até o nível de gênero, identificação baseada no banco de dados RDP-Classifer (com a porcentagem de similaridade com o domínio Bacteria).

Isolado	Origem	Tamanho do fragmento (seqüência de bases)	RPD Classifier					Dominio Bacteria (%)
			Filo	Classe	Ordem	Familia	Gênero	
2	solo	30-997	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces</i>	100
5	solo	30-930	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	100
9	solo	30-966	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>	100
10	solo	30-917	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	100
13	solo	30-914	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	100
18	solo	30-898	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	100
19	solo	30-848	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	100
23	solo	30-1000	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	100
26	solo	30-858	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	100
27	solo	30-1002	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	100
28	solo	30-896	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	100
31	solo	30-953	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	100
34	solo	30-700	-	-	-	-	-	100
35	solo	30-813	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Mycobacteriaceae	<i>Mycobacterium</i>	100
37	solo	30-935	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	100
40	solo	30-971	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Cellulomonadaceae	<i>Cellulomonas</i>	100
41	solo	30-993	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	-	100
45	solo	30-931	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	100
48	solo	30-882	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	100
49	solo	30-809	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	100
50	solo	30-900	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	100
52	solo	30-976	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	100
54	solo	30-980	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	<i>Cupriavidus</i>	100
55	solo	30-1004	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	100
59	solo	30-840	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	<i>Cupriavidus</i>	100
63	solo	30-926	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	100
66	solo	30-865	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Microbacteriaceae	<i>Microbacterium</i>	100
67	solo	30-924	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	-	100
71	solo	30-936	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	100
72	solo	30-850	-	-	-	-	-	0
75	solo	30-768	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Micrococcaceae	<i>Micrococcus</i>	100
77	solo	30-930	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	100
79	solo	30-855	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	100
81	solo	30-927	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	100
85	rizosfera	30-883	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	100
87	rizosfera	30-905	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Intrasporangiaceae	<i>Terrabacter</i>	100
90	rizosfera	30-853	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	-	-	100
95	rizosfera	30-891	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	100
96	rizosfera	30-1003	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	100
104	endofítico	30-916	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	100
105	endofítico	30-917	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	100
107	endofítico	30-919	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	100
110	endofítico	30-876	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>	100
112	endofítico	30-1001	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Micrococcaceae	<i>Arthrobacter</i>	100
117	endofítico	30-874	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	<i>Burkholderia</i>	100
127	endofítico	30-803	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	100
129	endofítico	30-998	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	<i>Burkholderia</i>	100
130	endofítico	30-898	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	100
131	endofítico	30-921	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	<i>Ralstonia</i>	100
132	endofítico	30-1055	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	<i>Burkholderia</i>	100
133	endofítico	30-521	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	100
135	endofítico	30-900	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	100
137	endofítico	30-907	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>	100

Anexo 3 - Tabela com todos os isolados identificados com sugestões a nível de espécie, identificação baseada nos resultados obtidos com os bancos de dados Genbank NCBI-Blast (com o score, quantidade de bases compatíveis e nível de similaridade em %) e RDP-SequenceMatch (com S_ab e números de Matches).

Isolado	Origem	Fragmento (sequência de bases)	NCBI Blast			RPD Seqmatch		
			Espécie	Score	Identidade	Espécie	S_ab	Matches
2	solo	30-997	<i>Streptomyces atrovirens</i>	1664	949 (98%)	<i>Streptomyces griseorubens</i>	0.908	1371
5	solo	30-930	<i>Staphylococcus warneri</i>	1620	882 (99%)	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	0.943	1422
9	solo	30-966	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	1522	854 (98%)	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	0.875	1432
10	solo	30-917	<i>Bacillus aryabhatai</i>	1613	882 (99%)	<i>Bacillus aryabhatai</i>	0.974	1449
13	solo	30-914	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	1591	877 (99%)	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	0.970	1427
18	solo	30-898	<i>Bacillus toyonensis</i>	1605	869 (100%)	<i>Bacillus toyonensis</i>	1.000	1467
19	solo	30-848	<i>Bacillus aryabhatai</i>	1500	817 (99%)	<i>Bacillus aryabhatai</i>	0.989	1449
23	solo	30-1000	<i>Bacillus toyonensis</i>	1781	969 (99%)	<i>Bacillus toyonensis</i>	0.922	1467
26	solo	30-858	<i>Bacillus megaterium</i>	1491	821 (99%)	<i>Bacillus aryabhatai</i>	0.971	1449
27	solo	30-1002	<i>Staphylococcus warneri</i>	1705	945 (99%)	<i>Staphylococcus warneri</i>	0.942	1390
28	solo	30-896	<i>Bacillus toyonensis</i>	1591	865 (99%)	<i>Bacillus toyonensis</i>	0.996	1467
31	solo	30-953	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	1672	916 (99%)	<i>Bacillus safensis</i>	0.976	1354
34	solo	30-700	-	-	-	<i>Bacillus cereus</i>	0.212	1465
35	solo	30-813	<i>Mycobacterium parafortuitum</i>	1399	775 (99%)	<i>Mycobacterium parafortuitum</i>	0.963	1359
37	solo	30-935	<i>Bacillus toyonensis</i>	1655	903 (99%)	<i>Bacillus toyonensis</i>	0.984	1467
40	solo	30-971	<i>Cellulomonas chitinilytica</i>	1637	918 (98%)	<i>Cellulomonas chitinilytica</i>	0.932	1387
41	solo	30-993	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	1463	816 (98%)	<i>Bacillus safensis</i>	0.885	1354
45	solo	30-931	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	1591	865 (99%)	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	0.948	1427
48	solo	30-882	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	1543	847 (99%)	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	0.969	1427
49	solo	30-809	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	1415	773 (99%)	<i>Bacillus safensis</i>	0.976	1354
50	solo	30-900	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	1609	871 (100%)	<i>Bacillus safensis</i>	1.000	1354
52	solo	30-976	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	1657	909 (99%)	<i>Bacillus safensis</i>	0.953	1354
54	solo	30-980	<i>Cupriavidus taiwanensis</i>	1633	905 (99%)	<i>Cupriavidus taiwanensis</i>	0.885	1448
55	solo	30-1004	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	1722	937 (99%)	<i>Bacillus safensis</i>	0.968	1354
59	solo	30-840	<i>Cupriavidus numazuensis</i>	1437	801 (99%)	<i>Cupriavidus necator</i>	0.943	1275
63	solo	30-926	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	1652	897 (99%)	<i>Bacillus safensis</i>	0.998	1354
66	solo	30-865	<i>Microbacterium trichothecenolyticum</i>	1441	797 (99%)	<i>Microbacterium trichothecenolyticum</i>	0.912	1382
67	solo	30-924	<i>Bacillus aryabhatai</i>	1472	806 (99%)	<i>Bacillus aryabhatai</i>	0.900	1449
71	solo	30-936	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	1616	888 (99%)	<i>Pseudomonas montelii</i>	0.978	1415
72	solo	30-850	-	-	-	<i>Pseudomonas otitidis</i>	0.206	1444
75	solo	30-768	<i>Micrococcus luteus</i>	1264	716 (98%)	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	0.908	1351
77	solo	30-930	<i>Bacillus aryabhatai</i>	1600	890 (99%)	<i>Bacillus aryabhatai</i>	0.953	1449
79	solo	30-855	<i>Bacillus velezensis</i>	1363	774 (97%)	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0.897	1452
81	solo	30-927	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1615	882 (99%)	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	0.977	1462
85	rizosfera	30-883	<i>Bacillus wiedmannii</i>	1504	820 (99%)	<i>Bacillus toyonensis</i>	0.970	1467
87	rizosfera	30-905	<i>Terrabacter terrigena</i>	1555	854 (99%)	<i>Terrabacter korensis</i>	0.932	1333
90	rizosfera	30-853	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	1194	726 (92%)	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0.900	1453
95	rizosfera	30-891	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	1578	860 (99%)	<i>Bacillus safensis</i>	0.989	1354
96	rizosfera	30-1003	<i>Staphylococcus hominis</i>	1773	968 (99%)	<i>Staphylococcus hominis</i>	0.984	1462
104	endofítico	30-916	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	1583	877 (99%)	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	0.957	1427
105	endofítico	30-917	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	1565	854 (99%)	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	0.950	1427
107	endofítico	30-919	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	1587	880 (99%)	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	0.962	1427
110	endofítico	30-876	<i>Acinetobacter oleivorans</i>	1526	841 (99%)	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	0.973	1432
112	endofítico	30-1001	<i>Paenarthrobacter nicotinovorans</i>	1742	964 (99%)	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>	0.965	1382
117	endofítico	30-874	<i>Burkholderia diffusa</i>	1526	839 (99%)	<i>Burkholderia plantarii</i>	0.947	1448
127	endofítico	30-803	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	1417	772 (99%)	<i>Bacillus safensis</i>	0.984	1354
129	endofítico	30-998	<i>Burkholderia lata</i>	1731	960 (99%)	<i>Burkholderia lata</i>	0.965	1437
130	endofítico	30-898	<i>Bacillus subtilis</i>	1572	862 (99%)	<i>Bacillus subtilis</i>	0.978	1423
131	endofítico	30-921	<i>Ralstonia pickettii</i>	1609	885 (99%)	<i>Ralstonia syzygii</i>	0.939	1310
132	endofítico	30-1055	<i>Burkholderia diffusa</i>	1788	1009 (98%)	<i>Burkholderia diffusa</i>	0.937	1404
133	endofítico	30-521	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	883	490 (99%)	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	0.950	1462
135	endofítico	30-900	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1583	864 (99%)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.000	1407
137	endofítico	30-907	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	1561	863 (99%)	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	0.930	1307