

LEONARDO EMANUEL DE OLIVEIRA COSTA

**DIVERSIDADE GENÉTICA, ANTAGONISMO MICROBIANO E
PRODUÇÃO DE FITASES POR BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE
FOLHAS DE FEJJOEIRO COMUM (*Phaseolus vulgaris*)**

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola, para
obtenção do título de *Doctor
Scientiae*

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

LEONARDO EMANUEL DE OLIVEIRA COSTA

**DIVERSIDADE GENÉTICA, ANTAGONISMO MICROBIANO E
PRODUÇÃO DE FITASES POR BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE
FOLHAS DE FEIJOEIRO COMUM (*Phaseolus vulgaris*)**

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola, para
obtenção do título de *Doctor
Scientiae*.

APROVADA: 29 de outubro de 2010.

Prof. Antônio Galvão do Nascimento

Prof. Marcos Rogério Tótola

Prof. Hilário Cuquetto Mantovani

Prof. João Lúcio de Azevedo

Prof^a. Marisa Vieira de Queiroz
(Orientadora)

Dedico a Deus.
À minha mãe.
Ao meu filho Nicolás
À Tia Luci.
À avó Desnia.

AGRADECIMENTO

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola do Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realização do curso de Doutorado em Microbiologia Agrícola.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), pelo apoio financeiro.

À professora Marisa Vieira de Queiroz, pela dedicação e orientação nos trabalhos de pesquisa.

Aos professores Arnaldo Chaer Borges, Célia Alencar de Moraes e Elza Fernandes de Araújo, pelas dicas e aconselhamentos.

Aos demais professores do Departamento de Microbiologia que, de alguma forma, contribuíram para minha formação.

À professora e amiga Rosângela Abreu Monteiro de Barros que me orientou em minha iniciação científica durante meus anos de graduação.

À Deniete, por ter me dado o “bem” mais precioso da minha vida: meu filho Nicolas.

Ao amigo de sempre João Júlio, pela amizade, pelas conversas, pelas ajudas e por ter aceitado ser padrinho do meu filho.

Ao amigo de república Pedro, pelas conversas e pela ajuda nos meses finais do doutorado.

Ao amigo Tiago do Laboratório de Genética, pelas conversas oportunas sobre endofíticos, PCR e tantas outras...

À Alice, Andréia, Casley, Fábio, Leandro, Pedro, Ralf, Regina, Rodrigo, Tiago por me ajudarem a desmontar os experimentos realizados em casa de vegetação.

À Thamy, Ralf e Regina, pela ajuda nas últimas semanas de experimento no laboratório.

Aos amigos dos laboratórios de Genética de Microrganismos e Ecologia Microbiana, pela acolhida durante os experimentos.

Aos amigos dos demais laboratórios do Departamento de Microbiologia.

Aos funcionários do Danilo, Evandro, Paulo e Toninho, do Departamento de Microbiologia, pelo auxílio constante.

À Nilcea, pelo apoio, pelo carinho e pelas conversas na secretaria.

Aos demais funcionários do Departamento de Microbiologia e de outros departamentos da UFV que, de alguma forma, fizeram parte do meu dia a dia no decorrer de qualquer uma das etapas do meu doutorado.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Leonardo Emanuel de Oliveira Costa, filho de Lucymar de Oliveira Costa, nasceu no dia primeiro de novembro de 1979, em Juiz de Fora.

Em março de 1998, ingressou na Universidade Federal de Juiz de Fora, no Curso de Farmácia e Bioquímica.

Em março de 2002, concluiu o curso de Farmácia. Em março de 2003 e fevereiro de 2004, concluiu as habilitações em Análises Clínicas e Indústria, respectivamente.

No período de setembro de 2000 a julho de 2001, foi bolsista de iniciação científica do BIC/UFJF, sob orientação da professora Rosângela Abreu M. de Barros. No período de setembro de 2003 a fevereiro de 2004 foi bolsista de extensão da UFJF, sob orientação do professor Márcio Tavares Rodrigues.

Em agosto de 2004, ingressou no Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa, obtendo o título de mestre em setembro de 2006.

Em outubro de 2006 ingressou no Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1. Feijoeiro	1
2. Bactérias endofíticas	2
2.1. Potencial biotecnológico	6
2.2. Metabólitos de interesse	7
2.3. Sideróforos	8
2.4. Controle Biológico	8
2.5. Promoção de Crescimento	11
2.6. Fitase	12
3. Referências Bibliográficas	14
Capítulo 1 - Bactérias endofíticas isoladas das folhas de três cultivares de <i>Phaseolus vulgaris</i> do Brasil	23
Resumo	24
1. Introdução	25
2. Material e Métodos	26
2.1. Material da planta	26
2.2. Preparação da amostra	27
2.3. Isolamento de bactérias	27
2.4. Identificação das bactérias endofíticas e análises filogenéticas	28
2.5. Rarefação, índice de diversidade e perfil de diversidade	30
3. Resultados	30
3.1. Isolamento e identificação das bactérias endofíticas	30
3.2. Identificação das bactérias endofíticas e análise filogenética	30
3.3. Rarefação, Índice de Diversidade e Perfil de Diversidade	34
4. Discussão	37
5. Referências	42
Capítulo 2 - Potencial de bactérias endofíticas para o controle biológico de patógenos que infectam o feijoeiro comum.....	48

Resumo.....	49
1.Introdução.....	50
2.Material e Métodos.....	51
2.1.Isolados.....	51
2.2.Produção de enzimas líticas.....	51
2.2.1.Celulase.....	51
2.2.2.Pectinase.....	52
2.2.3.Protease.....	52
2.3.Produção de sideróforos.....	52
2.4.Teste de antibiose <i>in vitro</i>	52
2.4.1.Teste de antagonismo - fungos fitopatogênicos.....	52
2.4.2.Teste de antagonismo - bactérias.....	53
2.5.Extração de DNA e BOX PCR.....	53
3.Resultados.....	54
3.1.Produção de enzimas líticas.....	54
3.1.1.Celulase.....	55
3.1.2.Pectinases.....	55
3.1.3.Proteases.....	55
3.2.Produção de sideróforos.....	56
3.3.Teste de antagonismo <i>in vitro</i>	56
3.3.1.Fungos fitopatogênicos.....	56
3.3.2.Bactérias.....	60
3.4.Avaliação do perfil de marcadores Box PCR.....	60
4.Discussão.....	62
5.Referências.....	66

Capítulo 3 - Caracterização da Atividade de Fitase de Bactérias Endofíticas de *Phaseolus vulgaris* 70

Resumo.....	71
1.Introdução.....	72
2.Material e Métodos.....	74
2.1.Isolados.....	74
2.2.Triagem dos isolados para a produção de fitase.....	74
2.3.Avaliação da atividade de Fitase.....	74
2.3.1.Condições de cultivo.....	74
2.3.2.Determinação das proteínas totais.....	74
2.3.3.Atividade inicial de degradação do fítico.....	75
2.3.4.Determinação da temperatura ótima de atividade.....	75
2.3.5.Determinação do pH ótimo de atividade.....	75
2.3.6.Teste de especificidade do substrato.....	75
2.3.7.Análises estatísticas.....	76
3. Resultados.....	76
3.1.Triagem dos isolados para produção de fitase.....	76
3.2.Avaliação da atividade de Fitase.....	77
3.2.1.Determinação das proteínas totais.....	77
3.2.2.Atividade inicial de degradação do fítico.....	77
3.2.3.Determinação da temperatura ótima de atividade.....	78
3.2.4.Determinação do pH ótimo de atividade.....	79
3.2.5.Teste de especificidade do substrato.....	80
4.Discussão.....	80
5.Referências.....	83

Conclusões Gerais 86

Anexos 87

RESUMO

COSTA, Leonardo Emanuel de Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2010. **Diversidade genética, antagonismo microbiano e produção de fitases por bactérias endofíticas de folhas de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*).** Orientadora: Marisa Vieira de Queiroz. Co-orientadores: Arnaldo Chaer Borges, Célia Alencar de Moraes e Elza Fernandes de Araújo

O feijão é uma das leguminosas mais importantes para a alimentação humana e pouco se conhece sobre as bactérias endofíticas associadas com as folhas desta planta. Objetivou-se com este trabalho: (i) caracterizar as bactérias endofíticas cultiváveis das folhas do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) de três cultivares diferentes (Vermelhinho, Talismã e Ouro negro), plantadas sob as mesmas condições de campo; (ii) avaliar a produção de sideróforos e enzimas líticas (pectinase, celulase e protease) destes isolados, bem como o potencial de antagonismo contra os fungos fitopatogênicos *Colletotrichum lindemuthianum*, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum*, agentes causais da antracnose, podridão-radicular e murcha-de-fusário-do-feijoeiro, respectivamente; e (iii) avaliar a capacidade dos isolados de produzir fitases e caracterizar estas enzimas. Foram obtidos 158 isolados, sendo que 36,7 %, 32,9 %, 29,7

% e 0,6 % pertencem aos Filos Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria e Bacteroidetes, respectivamente. Baseado nas sequências do gene rDNA 16S, 23 gêneros e 45 espécies diferentes foram isolados. As três cultivares de *P. vulgaris* mostraram diferenças na diversidade das classes Actinobacteria, Alphaproteobacteria e Bacilli, sendo que os isolados da cultivar Talismã apresentaram menor diversidade do que os isolados das outras duas cultivares. Estes resultados indicam que a cultivar influencia a estrutura das comunidades endofíticas associadas ao feijoeiro comum. Dentre os 158 isolados analisados, 20 isolados produzem celulase, oito produzem pectinases e 96 produzem proteases. Adicionado a isso, 49 isolados apresentaram algum nível de antagonismo contra pelo menos um dos fungos analisados. Dois isolados do gênero *Pseudomonas* e quatro isolados do gênero *Stenotrophomonas* apresentaram resultados mais promissores. Dezesesseis isolados são produtores de sideróforos, sendo este o primeiro relato de produção de sideróforos por uma linhagem da espécie *Agromyces mediolanus*. Quarenta e cinco isolados são produtores de fitase, sendo que quatro foram selecionados para caracterização da atividade da enzima. As fitases dos quatro isolados apresentaram atividade de fosfatase com outros substratos como ATP, ADP, pirofosfato e β -glicerofosfato, porém sua maior atividade foi observada em presença de fitato. Outra característica incomum das fitases analisadas é a presença de mais de um pH ótimo de atividade. Este é o primeiro relato de produção de fitase por bactérias do gênero *Rhodococcus* e *Microbacterium*. Os gêneros *Bacillus*, *Delftia*, *Paenibacillus*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Staphylococcus* e *Stenotrophomonas* estão presentes nas três cultivares avaliadas, evidenciando a adaptação destes gêneros a diferentes cultivares. O estudo dos microrganismos endofíticos do feijoeiro se mostrou promissor para obtenção de bactérias com potencial para o controle biológico de patógenos e bactérias produtoras de fitase.

ABSTRACT

COSTA, Leonardo Emanuel de Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2010. **Genetic diversity, microbial antagonism and production of phytases by endophytic bacteria from leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris*)**. Adviser: Marisa Vieira de Queiroz. Co-Advisers: Arnaldo Chaer Borges, Celia Alencar de Moraes and Elza Fernandes de Araújo

Common beans are one of the most important legume for human diet and little is known about the endophytic bacteria associated with their leaves. The objective of this work were: (i) characterize the cultivable endophytic bacteria from leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris*) from three different cultivars (Vermelhinho, Talismã and Ouro Negro) growing in the same field conditions in Brazil, (ii) evaluate the production of siderophores and lytic enzymes (pectinase, cellulase and protease) of these isolates, as well as, the potential for antagonism against the phytopathogenic fungi *Colletotrichum lindemuthianum*, *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*, causal agent of anthracnose, root rot and fusarium wilt-of-bean, respectively, (iii) evaluate the ability of isolates to produce phytases and characterize these enzymes. Of the 158 isolates obtained 36.7%, 32.9%, 29.7% and 0.6% respectively belong to the phyla Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria and Bacteroidetes. Based on 16S rDNA

sequences, 23 different genera were obtained. The three cultivars *P. vulgaris* cultivars showed differences in the diversity of the classes Actinobacteria, Alphaproteobacteria and Bacilli, and the isolates from the cultivar Talismã were less diversity than isolates from other cultivars. Thus, the present results indicated that the cultivar of the plant contributes to the endophytic community structure associated with the common bean. Among the 158 isolates analyzed, 20 microorganisms produce cellulase, 8 produce pectinase and 96 secreted proteases. Additionally, 49 isolates showed some degree of antagonism against at least one of the fungi tested, among these, two isolates of genus *Pseudomonas* and four isolates of the genus *Stenotrophomonas* showed promising results against the fungi analyzed. Sixteen isolates produced siderophores and this is the first report of siderophore production by a strain of the species *Agromyces mediolanus*. Among all the isolates 45 produce phytase and four were selected for characterization of phytase activity. The phytases of the four isolates showed phosphatase activity with other substrates such as ATP, ADP, pyrophosphate and β -glycerophosphate, but its highest activity occurs in the presence of phytate. Another unusual feature of the phytases examined is the presence of other peaks of activity beyond the optimum pH of activity. This is the first report of phytase production by bacteria of the genus *Rhodococcus* and *Microbacterium*. The genera *Bacillus*, *Delftia*, *Paenibacillus*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Staphylococcus* and *Stenotrophomonas* are present in all three cultivars, demonstrating the adaptation of these genera to different cultivars. The study of endophytic microorganisms of common bean is promising for obtaining bacteria with potential for Biol. Contr. of plant pathogens and for obtaining bacteria that produce phytase.

INTRODUÇÃO GERAL

1. Feijoeiro

O feijoeiro é uma planta pertencente à família Fabaceae anteriormente denominada Leguminosae. A família Fabaceae possui 970 gêneros e mais de 19.400 espécies (Lewis et al., 2005). A tribo Phaseoleae é composta, entre outras espécies, pelo feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*), pelo feijão-fradinho (*Vigna unguiculata*) e pela soja (*Glycine max*), sendo o grupo economicamente mais importante dentro das leguminosas, correspondendo a 75% dos legumes comercializados no mundo (Broughton et al., 2003).

O Brasil é o maior produtor de feijão, porém o rendimento da cultura é inferior ao obtido em países como a China e os Estados Unidos (FAO, 2009). A cultura do feijoeiro é a quinta cultura mais importante da agricultura brasileira, tendo sido a produção de 2008 superior a 3,4 mil toneladas, com uma receita equivalente a R\$ 7,16 bilhões (IBGE, 2009). O estado do Paraná destaca-se como o maior produtor brasileiro,

com 22,3 % da produção total, seguido pelo Estado de Minas Gerais com 16,9 % da produção nacional de 2008 (IBGE 2009).

As doenças que acometem a cultura do feijoeiro constituem uma das principais causas da sua baixa produtividade no Brasil (Vieira et al., 2006). Entre os principais agentes causadores de doenças das partes aéreas do feijoeiro destacam-se os fungos *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. E Magn.) Scrib, responsável pela antracnose, doença especialmente encontrada em feijoeiros nas regiões serranas do sul e sudeste (Rava et al., 1994), *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk (fase sexual de *Rhizoctonia solani* Kühn), causador da mela ou murcha-da-teia-micélica e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Schl.) Kend. & Snyder, agente etiológico da murcha-de-fusarium ou fusariose (Vieira et al., 2006). As bactérias também são importantes como agentes etiológicos de doenças que acometem a parte aérea do feijoeiro, como o crestamento bacteriano, causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith) Vauterin et al. e por sua variante *fuscans* e a murcha-de-curtobacterium cuja responsável é a bactéria *Curtobacterium flaccumfasciens* pv. *flaccumfasciens* (Hedges) Collins & Jones.

2. Bactérias endofíticas

As plantas são os maiores contribuintes para a fixação de CO₂ atmosférico no planeta. A energia capturada da luz solar permite às plantas reduzir o carbono contido na molécula de CO₂ e sintetizar diversos compostos à base de carbono. Estes compostos representam diversas fontes de carbono, nitrogênio e energia para os microrganismos heterotróficos associados às plantas (Hardoim et al., 2008). Sendo assim, as plantas são muito atraentes como reservatório de nutrientes para diversos microrganismos. No entanto, para a vasta maioria dos microrganismos, o interior e até mesmo o exterior das plantas constituem território inacessível por causa de compostos antimicrobianos como

terpenoides, flavonoides e isoflavonoides produzidos e secretados por estas mesmas plantas, especialmente na rizosfera (Bais et al., 2006). Em contrapartida, algumas plantas requerem a presença de bactérias para seu crescimento e para se estabelecer em determinados ecossistemas (Leifert et al., 1989). Um exemplo bem documentado na literatura de interação mutualística entre plantas e microrganismos é a interação entre Rizóbio e leguminosas (Denison and Kiers, 2004). Desta forma, microrganismos que se associam com as plantas podem aproveitar os nutrientes, enquanto as plantas podem se beneficiar dos promotores de crescimento e da redução do estresse (Hardoim et al., 2008). Alguns autores acreditam que este tipo de associação entre planta e microrganismos deve ter emergido como resultado de uma pressão seletiva exercida sobre estas associações (Thrall et al., 2007).

As bactérias endofíticas são conhecidas há mais de 120 anos (Hardoim et al., 2008). A definição atual mais aceita de microrganismos endofíticos é: microrganismos que podem ser isolados de tecidos de plantas desinfestados superficialmente e que não causam danos visíveis para o hospedeiro (Hallmann et al., 1997). Desta forma, alguns pesquisadores defendem a inclusão de formas avirulentas de patógenos como endofíticos, diferentemente das formas virulentas destes organismos, que mesmo sendo encontradas no interior da planta, não devem ser classificadas como endofíticos (Hardoim et al., 2008).

Em relação à estratégia de vida, uma bactéria endofítica pode ser classificada como endofítica obrigatória ou facultativa. As bactérias endofíticas obrigatórias são estritamente dependentes da planta hospedeira para o seu crescimento e sobrevivência. A transmissão de bactérias endofíticas obrigatórias ocorre verticalmente ou por meio da veiculação de um vetor. Já os microrganismos endofíticos facultativos podem ser caracterizados como bifásicos, alternando entre as plantas e o ambiente. A diversidade

microbiana endofítica encontrada nas plantas pode ser explicada pela capacidade de diversos endofíticos facultativos de entrar e persistir no interior da planta (Rosenblueth & Martinez-Romero, 2006).

As bactérias endofíticas podem originar-se de sementes (Mundt & Hinkle, 1976; Pleban et al. 1995), propagação vegetativa (Dong et al., 1994; Sturz, 1995), solo rizosférico (Mahafee & Kloepper, 1997) e do filoplano (Beattie & Lindow, 1995).

No geral, a entrada de microrganismos no tecido da planta pode ocorrer pelos estômatos, lenticelas, lesões e áreas emergentes de raízes laterais e das radículas germinativas (Huang, 1986). No entanto, a principal porta de entrada para bactérias endofíticas parece que são as lesões que ocorrem naturalmente, como resultado do crescimento da planta, ou pelos pelos radiculares, ou ainda, pelas junções epidermais (Sprent and Faria, 1988). Contudo, as lesões e as raízes laterais não são essenciais para a entrada de bactérias endofíticas, uma vez que algumas bactérias endofíticas demonstram penetração ativa em tecidos de plantas. Esta hipótese é suportada pela produção de enzimas celulolíticas e pectinolíticas por *Azoarcus* sp. (Hurek et al., 1994), *Azospirillum irakense* (Khammas and Kaiser, 1991) e *Pseudomonas fluorescens* (Benhamou et al., 1996).

Uma vez dentro do tecido da planta, bactérias endofíticas podem permanecer localizadas em um tecido específico da planta, como o córtex da raiz, ou colonizar a planta de forma sistêmica pelo transporte através dos elementos condutores ou apoplastos. A dispersão sistêmica foi demonstrada para as bactérias endofíticas *Erwinia* sp. em algodão (Misaghi and Donndelinger, 1990) e *Pseudomonas aureofaciens*, que foi capaz de colonizar as partes aéreas de milho após ter sido inoculada nas raízes da planta (Lamb et al., 1996). A colonização de tecidos específicos de plantas por bactérias parece ser espécie específica. Geralmente, bactérias endofíticas colonizam o espaço intercelular

(Reinhold and Hurek, 1988; Ruppel et al., 1992; Dong et al., 1994; Hinton and Bacon, 1995; Quadt-Hallmann and Kloepper, 1996), sendo poucos os relatos demonstrando a colonização intracelular (Frommel et al., 1991; Gantar et al., 1991; Hurek et al., 1994; Quadt-Hallmann and Koepper, 1996). A colonização do sistema vascular por bactérias também já foi reportada (Gardner et al., 1982; Hurek et al., 1994; Lamb et al., 1996).

Os padrões de colonização de bactérias endofíticas em tecidos de plantas são fortemente dependentes de fatores bióticos e abióticos que interagem entre si (Hallmann et al., 1997). Um dos fatores bióticos mais importantes é a presença de outros organismos associados à planta, como outras bactérias, vírus, fungos e nematoides (Hallmann et al., 1997; Hallmann et al., 1998). Como o espaço e os nutrientes fornecidos pela planta são fatores limitantes, os endofíticos e os patógenos devem competir por eles, sendo vários os cenários de interação que devem existir entre microrganismos como competição, antibiose, exclusão de nicho, simbiose e mutualismo (Hallmann et al., 1997).

Outro fator biótico importante é o genótipo da planta. As diferenças nas populações de endofíticos já foram verificadas em frutos de tomate para diferentes cultivares (Samish et al., 1963) e também relatados em diferentes cultivares de algodão (Bird, 1982). No entanto, a comparação da colonização de bactérias endofíticas entre duas cultivares de uvas com diferentes graus de resistência à coroa de galo demonstrou que o genótipo das plantas não influenciou a população de bactérias endofíticas presentes no xilema (Bell et al., 1995).

Os tecidos internos das plantas proveem um ambiente mais uniforme e protetor para os microrganismos do que a superfície das plantas, em que exposições a condições ambientais variáveis como temperatura, potencial osmótico, radiação ultravioleta e competição microbiana são fatores limitantes para sobrevivência a longo prazo das

populações bacterianas (Hallmann et al., 1997). Sendo assim, os fatores que afetam a colonização das bactérias no filoplano e na rizosfera, também influenciam a colonização e sobrevivência de bactérias endofíticas indiretamente, uma vez possuem um efeito direto na planta hospedeira.

Características do solo, como o pH, a salinidade e a textura afetam bactérias endofíticas de forma indireta, visto que alteram a comunidade bacteriana da rizosfera, interferindo na fonte de bactérias endofíticas em potencial. Um exemplo da influência de fatores abióticos na população de bactérias endofíticas em plantas ocorre em sítios contaminados por metais pesados, petróleo, solventes, explosivos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e outros contaminantes orgânicos (Doty, 2008; Ryan et al., 2008). Plantas crescendo em solo contaminado com petróleo possuem preferência por bactérias endofíticas capazes de degradar este poluente, e esta preferência parece ser planta espécie-específica (Siciliano et al., 2001). Em outras palavras, algumas plantas possuem a capacidade de recrutar, ou aumentar de forma seletiva as bactérias necessárias à degradação de determinados poluentes (Doty, 2008).

2.1. Potencial biotecnológico

O estudo de microrganismos endofíticos é de grande interesse acadêmico, pois possibilita a descoberta de novas espécies de microrganismos, principalmente quando hospedeiros tropicais são investigados. Além disso, também é de interesse prático, visto que estes microrganismos podem conferir características importantes para a planta hospedeira, como resistência a condições de estresse, produção de fitohormônios, controle de fitopatógenos e pragas. Em adição, estes microrganismos também podem produzir compostos de grande interesse biotecnológico, como enzimas e outros compostos de interesse para a indústria farmacêutica (Azevedo et al., 2000).

Sendo assim, as bactérias endofíticas podem conferir alguns benefícios às plantas hospedeiras, promovendo o crescimento da planta mesmo em áreas poluídas (Bashan et al., 1989; Lalande et al., 1989; Van Peer and Shippers, 1989; Frommel et al., 1991; Hurek et al., 1994; Hinton and Bacon, 1995; Sturz, 1995; Barka et al., 2002; Kang et al., 2007), induzir os mecanismos de defesa sistêmicos destas (Bargabus et al., 2002; Mishra et al., 2006; Bakker et al., 2007), reduzir os sintomas de doenças causadas por vários patógenos (Frommel et al., 1991; Chen et al., 1995; Pleban et al., 1995; Coombs et al., 2004; Klopper et al., 2004; Senthilkumar et al., 2007), controlar insetos (Azevedo et al., 2000) e também nematoides (Hallman et al., 1997; Hallman et al., 1998). Além disso, podem produzir produtos anti-herbívoros (Scott, 2001; Sullivan et al., 2007), realizar a fixação biológica de nitrogênio (Stoltzfus et al., 1997; Martinez et al., 2003; Jha and Kumar, 2007) e aumentar a captação de minerais pela planta (Malinowski et al., 2000). Outro benefício atribuído a elas é o aumento da tolerância ao estresse, visto que plantas axênicas apresentam baixa tolerância a diferentes tipos de estresse (Hallmann et al., 1997).

2.2. Metabólitos de interesse

Dentre os metabólitos de interesse produzidos por microrganismos endofíticos destacam-se os sideróforos, as enzimas, os antimicrobianos, os antioxidantes e os antitumorais. Espécies de microrganismos endofíticos produzem substâncias que são capazes de inibir ou matar uma vasta variedade de agentes causadores de doenças (bactérias, fungos, vírus ou protozoários) que acometem diferentes hospedeiros como as plantas, os animais e o homem (Strobel, 2002; Strobel & Daisy, 2003). Adicionadas a isso estão as, enzimas líticas também produzidas por microrganismos endofíticos. Dentre elas, destacam-se as quitinases, as β -1,3-glicanases, as celulases, as lipases e as

proteases, que são capazes de degradar constituintes das paredes de fungos fitopatogênicos (Barraquio et al., 1997; Chin-A-Woeng et al., 2003).

2.3. Sideróforos

O ferro é um elemento importante e essencial na nutrição tanto de plantas como de microrganismos. Consideradas a importância do Fe^{+3} e sua baixa disponibilidade, ele pode ser um fator limitante para o crescimento de plantas e microrganismos. Alguns microrganismos são capazes de sequestrar o ferro por meio da produção de sideróforos. Os sideróforos são compostos de baixa massa molecular que possuem alta afinidade por Fe^{3+} , sendo responsáveis pela solubilização e transporte deste elemento até as células dos microrganismos que os produzem (Sharma & Johri, 2003). Algumas plantas também são capazes de produzir substâncias análogas denominadas fitosideróforos. Sharma & Johri (2003) afirmaram que a produção de sideróforos por microrganismos associados com plantas é benéfica para o hospedeiro. Segundo estes autores, a produção de sideróforos inibe o crescimento do patógeno por interferir com a disponibilidade de ferro. No entanto, os resultados de Paulitz & Loper (1991) com *Pseudomonas putida* contra o agente causal do tombamento de mudas de pepino contradizem esta teoria. Os autores compararam linhagens mutantes de *P. putida* não-produtoras de sideróforos com o tipo selvagem e observaram que ambos tiveram o mesmo desempenho no controle do *Pythium ultimum*. Pelo exposto, os sideróforos parecem ser importantes no controle de determinados fitopatógenos, porém além de não ser o único mecanismo utilizado por microrganismos capaz de promover o controle biológico de fitopatógenos, ele pode não ser um mecanismo efetivo quando presente.

2.4. Controle Biológico

As doenças fúngicas de plantas, usualmente, são controladas pela combinação de manejos da cultura, uso de fungicidas e resistência do hospedeiro à doença (Jayaswal et

al., 1990). O uso de fungicidas é o meio primário de controle de doenças, porém seu uso é controverso em razão de o patógeno desenvolver mecanismos de tolerância ou resistência aos fungicidas, e também aos efeitos deletérios causados ao ambiente (Jayaswal et al., 1990; Hwang et al., 1996; Kim et al., 1999). Desta forma, o uso de agroquímicos, em plantações, embora diminua os ataques de insetos e microrganismos fitopatogênicos, ainda representa um grande risco para trabalhadores no campo e os consumidores destes alimentos. Em adição, em alguns casos o uso de agroquímicos é economicamente inviável. O controle de pestes e doenças por processos biológicos é uma alternativa para reduzir o uso de produtos químicos na agricultura e neste contexto foi demonstrado que os microrganismos endofíticos são capazes de proteger a planta hospedeira contra fitopatógenos, insetos-praga e até mesmo herbívoros domésticos como a ovelha e o gado (Azevedo et al., 2000; Melnick et al., 2008).

Diversos mecanismos têm sido descritos para explicar a supressão de doenças em plantas por meio de microrganismos, como: produção de sideróforos, (Buysens et al., 1996; Davison, 1998; Tokala et al., 2002), produção de antibióticos (Davison, 1988, Fravel, 1988; Vincent et al., 1991, Weller, 1988) e a secreção de enzimas líticas capazes de degradar a parede celular do patógeno (El-Tarabily, 2003). A capacidade das bactérias endofíticas em estimular respostas de defesa do hospedeiro, como a indução de resistência sistêmica, também é um mecanismo relacionado ao controle biológico (Zdor and Anderson, 1992; Kobayashi and Palumbo, 2000, citado por Hsieh et al. 2005; Jetiyanon, 2007).

A produção de celulasas e pectinases por microrganismos endofíticos é vista como um mecanismo para auxiliar a colonização da planta hospedeira. Este tipo de penetração ativa em vez do acesso às plantas pelas aberturas naturais ou feridas que ocorrem durante o crescimento da planta, pode ser capaz de ativar a resistência

sistêmica do hospedeiro, o que é considerado como outro mecanismo de ação dos agentes de controle biológico (Hallmann et al., 1997). Reinhold-Hurek et al. (2006) demonstraram que uma linhagem endofítica de *Azoarcus* sp., isolada de arroz, produz uma endoglucanase que permite a entrada ativa deste endofítico na planta hospedeira. Apesar de *Azoarcus* sp. degradar a parede do hospedeiro, ela é incapaz de utilizar os produtos da degradação desta endoglucanase para seu crescimento. Esta incapacidade de usar os produtos de degradação da celulose provavelmente é uma das características que diferenciam microrganismos endofíticos de patogênicos.

A pesquisa do controle de doenças de plantas por agentes de controle biológico (**Biol. Contr. Agents, BCAs**) aplicados na filosfera tem gerado grande quantidade de informações sobre fungos e bactérias com potencial para o controle de doenças envolvendo folhas, flores e frutos. Pesquisas sobre o modo de ação e adaptação ecológica contribuíram de forma crucial para o aumento da utilização comercial destes BCAs em todo o mundo (Bailey et al., 2006). No entanto, o controle biológico de doenças de plantas na filosfera ainda é um grande desafio. Este desafio se deve, em grande parte, ao fato de que a filosfera é um ambiente hostil para microrganismos introduzidos devido às suas características: (i) pouca disponibilidade de nutrientes (Beattie and Lindow, 1999; Mercier and Lindow, 2000); (ii) variações da disponibilidade de água (Beattie and Lindow, 1995); (iii) exposição direta à radiação ultravioleta e infravermelha (Sundin, 1999); e (iv) competição com outros microrganismos residentes da filosfera. Também é importante compreender que estes fatores são influenciados pela idade da folha, pelas variações de características físicas do ambiente e pela genética da planta hospedeira (Bailey et al., 2006).

Os mecanismos de controle biológico podem ser divididos em diretos e indiretos. No entanto, a classificação mais utilizada leva em conta apenas os mecanismos de controle, como pode ser visualizado na Figura 1.

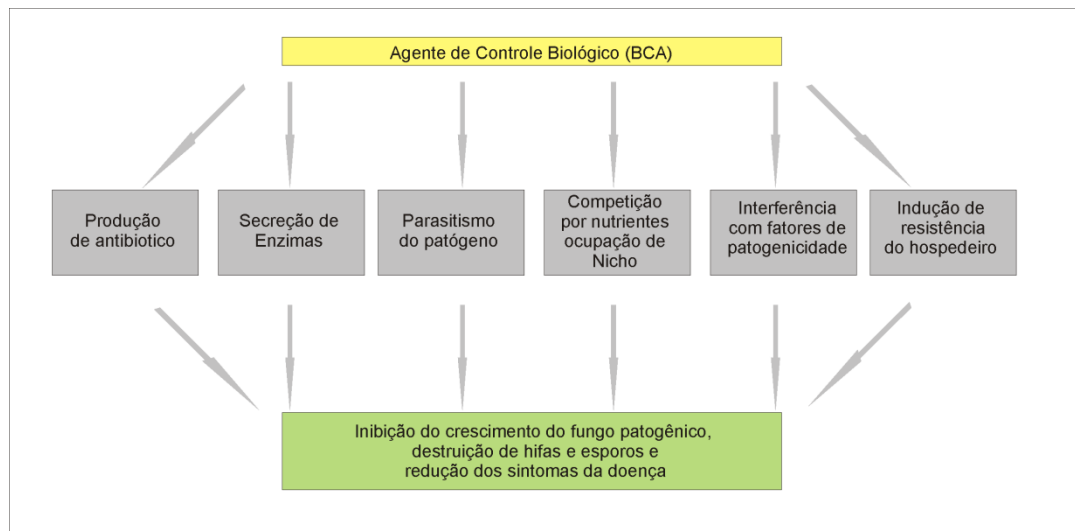


Figura 1. Mecanismo de biocontrole dos BCAs. (Adaptado de Punja et al., 2003).

A Figura 2 mostra um esquema dos estágios de desenvolvimento do fitopatógeno e os possíveis pontos de atuação dos microrganismos endofíticos e epifíticos para controlar estes microrganismos.

2.5. Promoção de Crescimento

Diversos processos que ocorrem em vegetais, tais como crescimento, divisão celular, floração, amadurecimento dos frutos e dormência das gemas, são regulados por hormônios. Os principais hormônios vegetais são as auxinas, as giberelinas, o ácido abscísico e o etileno (Rolcik et al., 2005). Algumas linhagens de *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Staphylococcus*, *Azotobacter* e *Azospirillum* produzem substâncias reguladoras de crescimento de planta como etileno, auxinas ou citocininas (Bashan and Holguin, 1997; Leifert et al., 1994).

O ácido indol acético (AIA) é o principal representante de substâncias de crescimento dos vegetais do grupo das auxinas. Ele pode ser encontrado em baixas concentrações em plantas e microrganismos. Além de ter sido a primeira auxina isolada,

o AIA, é responsável pela regulação de processos de crescimento e desenvolvimento nos vegetais como: dominância apical, crescimento de brotos, divisão e alongação celular (Wurst, 1984)

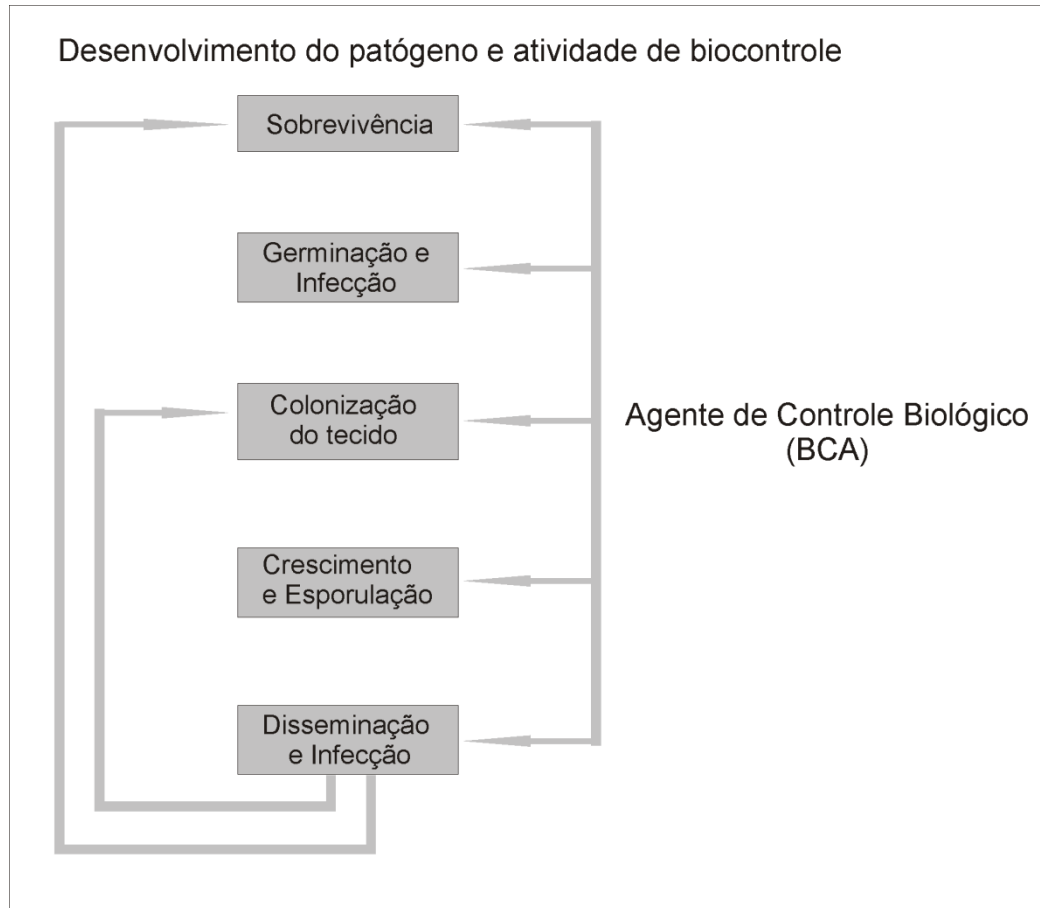


Figura 2. Os vários estágios de desenvolvimento de um fitopatógeno e os diferentes estágios em que os BCAs podem atuar no controle biológico. (Adaptado de Punja et al., 2003).

2.6. Fitase

O ácido fítico (mio-inositol 1,2,3,4,5,6 hexafosfato) e a mistura de seus sais catiônicos, que são designados de forma geral como fitatos, representam um grupo de compostos orgânicos fosfatados amplamente encontrados na natureza. O fitato é um abundante constituinte das plantas, compreendendo de 1 a 5 % (p/p) dos legumes comestíveis, cereais, sementes oleaginosas, pólen e nozes (Cheryan, 1980). Estima-se que, do fósforo orgânico do solo, 30 a 50 % se apresentam na forma de fitato, sendo

mais abundante nos solos ricos em matéria orgânica. Portanto, o fitato é a principal fonte de P orgânico presente no solo (Turner et al., 2003). O ácido fítico e os fitatos podem ser interessantes fontes de fósforo (P) para plantas, visto que o P é considerado um nutriente essencial para o crescimento vegetal. O aumento da capacidade das plantas de usar os fitatos como fonte de P pode diminuir os custos com o uso de fertilizantes fosfatados inorgânicos em sistemas agro-pastoris (Jorquera et al., 2008), o que vem ao encontro das preocupações atuais sobre o impacto de P liberado no ambiente. Nos solos utilizados na agricultura, grande parte do P aplicado como fertilizante (> 90%) não é absorvido prontamente pelas plantas, porque rapidamente se torna não disponível, devido a interações com os constituintes do solo. Além disso, o ácido fítico e o fitato presentes no solo, principalmente naqueles próximos a corpos de água, são indesejáveis por causa de seu potencial de lixiviação. A lixiviação do fitato para estes corpos de água pode contribuir para o processo de eutrofização (Turner and Haygarth, 2000).

Adicionado a isso, o fitato presente na dieta de animais atua como um fator anti-nutricional, complexando cátions metálicos divalentes como Zn^{2+} , $Fe^{2+/3+}$, Ca^{2+} , Mg^{+2} , Mn^{2+} e Cu^{2+} , prevenindo a absorção de minerais no trato digestivo de animais (Urbano et al., 2000). Animais monogástricos, como os suínos e as aves domésticas, são incapazes de degradar o fitato presente no alimento, pois possuem baixa ou nenhuma atividade de fitase em seus tratos digestivos (Schroder et al., 1996). Por causa disso, 70 % do P adicionado nas dietas de animais monogástricos é excretado para o ambiente, criando impacto ambiental em grandes áreas produtivas (Turner et al., 2002).

Pelo exposto acima, enzimas capazes de degradar o ácido fítico e/ou fitato podem ter aplicações biotecnológicas, ambientais e nutricionais. Fitase é um termo genérico usado para descrever enzimas fosfotransferases que catalisam a liberação sequencial dos ortofosfatos inorgânicos do ácido fítico e dos fitatos. As fitases têm sido

classificadas como 3-fitase (EC 3.1.3.8), 6-fitase (EC 3.1.3.26) e 5-fitase (EC 3.1.3.72), baseado na posição específica da hidrólise inicial do fitato. As fitases podem ser produzidas por diferentes fontes incluindo plantas, tecido animal e microrganismos (Konietzny and Greiner, 2002; Vohra and Satyanarayana, 2003)

No entanto, não existe uma única enzima que possua todas as características desejáveis para cada tipo de aplicação. Por exemplo, as fitases a serem utilizadas como aditivos alimentares devem possuir certas propriedades para efetiva mineralização do fitato no trato digestivo do animal. Em suínos, o principal sítio para a atividade de fitase é o estômago, assim, uma enzima resistente à pepsina e com pH ótimo ácido é desejável (Konietzny and Greiner, 2004). Por outro lado, enzimas a serem aplicadas em aves domésticas devem possuir pH ótimo em torno de 5,0-6,0 para serem efetivas (Selle & Ravindran, 2007). Estudos indicam que fitases bacterianas são uma alternativa a fitases fúngicas devido à sua maior especificidade pelo substrato, maior resistência à proteólise e melhor eficiência catalítica (Rodrigues et al., 1999; Wyss et al., 1999; Kim et al., 2003). Neste contexto, as bactérias endofíticas podem ser fontes promissoras de fitases com características desejáveis.

3. Referências Bibliográficas

- Ansari, K.I., Palacios, N., Araya, C., Langin, T., Egan, D., Doohan, F.M., 2004. Pathogenic and genetic variability among *Colletotrichum lindemuthianum* isolates of different geographic origins. *Plant Pathol* 53: 635-642.
- Azevedo, J.L., Maccheroni Jr, W., Pereira, J.O., Araújo, W.L., 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electron J Biotechnol* 3: 40-65.
- Bailey, M.J., Lilley, A.K., Timms-Wilson, T.M., Spencer-Phillips, P.T.N., 2006. Microbial Ecology of aerial plant surfaces. CABI International.

- Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S., Vivanco, J.M., 2006. The Role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organism. *Annu Rev Plant Biol* 57: 233-266.
- Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J., van Loon, L.C., 2007. Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp.. *Phytopathology* 97: 239-243.
- Bargabus, R.L., Zidack, N.K., Sherwood, J.E., Jacobsen, B.J., 2002. Characterisation of systemic resistance in sugar beet elicited by a non-pathogenic, phyllosphere-colonizing *Bacillus mycoides* biological control agent. *Physiol Mol Plant Pathol* 61: 289-298.
- Barka, E.A., Gognies, S., Nowak, J., Audran, J.-C., Belarbi, A., 2002. Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. *Biol Contr* 24: 135-142.
- Barraquio, W.L., Revilla, L., Ladha, J.K., 1997. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. *Plant Soil* 194: 15-24.
- Bashan, Y., Holguin, G., 1997. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Can J Microbiol* 43: 103-121.
- Bashan, Y., Ream, Y., Levanony, H.A.S., 1989. Non-specific responses in plant growth, yield, and root colonization of noncereal crop plants to inoculation with *Azospirillum brasiliense* Cd. *Can J Bot* 67: 1317-1324.
- Beattie, G.A., Lindow, S.E., 1995. The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. *Annu Rev Phytopathology* 33: 145-172.
- Beattie, G.A., Lindow, S.E., 1999. Bacterial Colonization of leaves: a spectrum of strategies. *Phytopathology* 89: 353-359.
- Bell, C.R., Dickie, G.A., Harvey, W.L.G., Chan, J.W.Y.F., 1995. Endophytic bacteria in grapevine. *Can J Microbiol* 41: 46-53.
- Benhamou, N., Bélanger, R.R., Paulitz, T.C., 1996. Pre-inoculation of Ri T-DNA-transformed pea roots with *Pseudomonas fluorescens* inhibits colonization by *Pythium ultimum* Trow: an ultrastructural and cytochemical study. *Planta* 199: 105-117.
- Bird, L.S., 1982. The MAR (multi-adversity resistance) system of genetic improvement of cotton. *Plant Dis* 66: 172-176.
- Broughton, W.J., Hernández, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., Vanderleyden, J., 2003. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. *Plant Soil* 252: 55-128.

- Buysens, S., Heungens, K., Poppe, J., Hofte, M., 1996. Involvement of pyochelin and pyoverdine in suppression of *Pythium*-induced damping-off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa* TNSK2. *Appl Environ Microbiol* 62: 865-871.
- Chen, C., Bauske, E.M., Musson, G., Rodriguezkabana, R., Kloepper, J.W., 1995. Biological control of *Fusarium* wilt on cotton by use of endophytic bacteria. *Biol Contr* 5: 83-91.
- Cheryan, M., Rackis, J.J., 1980. Phytic acid interactions in food systems. *Crit Rev Food Sci Nutr* 13: 297 - 335.
- Chin-A-Woeng, T.F.C., Bloemberg, G.V., Lugtenberg, B.J.J., 2003. Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. *New Phytol* 157: 503-523.
- Coombs, J.T., Michelsen, P.P., Franco, C.M.M., 2004. Evaluation of endophytic actinobacteria as antagonists of *Gaeumannomyces graminis* var. tritici in wheat. *Biol Contr* 29: 359-366.
- Davison, J., 1988. Plant beneficial bacteria. *Nat Biotechnol* 6: 282-286.
- Denison, R.F., Kiers, E.T., 2004. Lifestyle alternatives for rhizobia: mutualism, parasitism, and forgoing symbiosis. *FEMS Microbiol Lett* 237: 187-193.
- Dong, Z., Canny, M.J., McCully, M.E., Roboredo, M.R., Cabadilla, C.F., Ortega, E., Rodes, R., 1994. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems (a new role for the apoplast). *Plant Physiol* 105: 1139-1147.
- Doty, S.L., 2008. Enhancing phytoremediation through the use of transgenics and endophytes. *New Phytol* 179: 318-333.
- El-Tarabily, K.A., 2003. An endophytic chitinase-producing isolate of *Actinoplanes missouriensis*, with potential for biological control of root rot of lupin caused by *Plectosporium tabacinum*. *Aust J Bot* 51: 257-266.
- FAO, 2009. FAOSTAT. Food and agriculture organization of the united nations. <http://faostat.fao.org/> ultimo acesso em 16/10/2010.
- Fravel, D.R., 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant Diseases. *Annu Rev Phytopathology* 26: 75-91.
- Frommel, M. I., Nowak, J., Lazarovits, G., 1991. Growth enhancement and developmental modifications of in vitro grown potato (*Solanum tuberosum* spp. *tuberosum*) as affected by a nonfluorescent *Pseudomonas* sp. *Plant Physiol* 96: 928-936.
- Gantar, M., Kerby, N.W., Rowell, P., 1991. Colonization of wheat (*Triticum vulgare* L.) by N₂-fixing cyanobacteria: II. An ultrastructural study. *New Phytol*: 118, 485-492.

- Gardner, J.M., Feldman, A.W., Zablotowicz, R.M., 1982. Identity and behavior of xylem-residing bacteria in rough lemon roots of florida citrus tree. *Appl Environ Microbiol* 43: 1335-1342.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahafee, W.F., Kloepper, J., 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can J Microbiol*: 43: 895-914.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Rodriguez-Kabana, R., Kloepper, J.W., 1998. Interactions between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in cotton and cucumber. *Soil Biol Biochem* 30: 925-937.
- Hardoim, P.R., van Overbeek, L.S., van Elsas, J.D., 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol* 16: 463-471.
- Hinton, D.M., Bacon, C.W., 1995. *Enterobacter cloacae* is an endophytic symbiont of corn. *Mycopathologia* 129: 117-125.
- Hsieh, T.F., Huang, H.C., Erickson, R.S., 2005. Biological control of bacterial wilt of bean using a bacterial endophyte, *Pantoea agglomerans*. *J Phytopathology* 153: 608-614.
- Huang, J., 1986, Ultrastructure of bacterial penetration in plants. *Annu Rev Phytopathology* 24: 141-157.
- Hurek, T., Reinhold-Hurek, B., Van Montagu, M., Kellenberger, E., 1994. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain bh72 in grasses. *J Bacteriol* 176: 1913-1923.
- Hwang, B.K., Lee, J.Y., Kim, B.S., Moon, S.S., 1996. Isolation, structure elucidation, and antifungal activity of a manumycin-type antibiotic from *Streptomyces flaveus*. *J Agr Food Chem*: 44: 3653-3657.
- IBGE 2009. PAM - Produção agrícola municipal - 2008 (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística).
- Jayaswal, R.K., Fernandez, M.A., Schroeder, R.G., III, 1990. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* strain that restricts growth of various phytopathogenic fungi. *Appl Environ Microbiol* 56: 1053-1058.
- Jetiyanon, K., 2007. Defensive-related enzyme response in plants treated with a mixture of *Bacillus* strains (IN937a and IN937b) against different pathogens. *Biol Contr* 42: 178-185.
- Jha, P.N., Kumar, A., 2007. Endophytic colonization of *Typha australis* by a plant growth-promoting bacterium *Klebsiella oxytoca* strain GR-3. *J Appl Microbiol* 103: 1311-1320.

- Jorquera, M., Martinez, O., Maruyama, F., Marschner, P., de la Luz Mora, M., 2008. Current and future biotechnological applications of bacterial phytases and phytase-producing bacteria. *Microb Environ* 23: 182-191.
- Kang, S.H., Cho, H.S., Cheong, H., Ryu, C.M., Kim, J.F., Park, S.H., 2007. Two bacterial endophytes eliciting both plant growth promotion and plant defense on pepper (*Capsicum annuum* L.). *J Microbiol Biotechnol* 17: 96-103.
- Khammas, K., Kaiser, P., 1991. Characterization of a pectinolytic activity in *Azospirillum irakense*. *Plant Soil* 137: 75-79.
- Kim, B.S., Moon, S.S., Hwang, B.K., 1999. Isolation, antifungal activity, and structure elucidation of the glutarimide antibiotic, streptimidone, produced by *Micromonospora coerulea*. *J Agr Food Chem* 47: 3372-3380.
- Kim, H., Kim, Y., Lee, J., Kim, K., Kim, Y., 2003. Isolation and characterization of a phytase with improved properties from *Citrobacter braakii*. *Biotechnol Lett* 25: 1231-1234.
- Kloepper, J.W., Ryu, C.M., Zhang, S., 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94: 1259-1266.
- Konietzny, U., Greiner, R., 2004. Bacterial phytase: potential application, in vivo function and regulation of its synthesis. *Braz J Microbiol* 35: 12-18.
- Lalande, R., Bissonnette, N., Coutlée, D., Antoun, H., 1989. Identification of rhizobacteria from maize and determination of their plant-growth promoting potential. *Plant Soil* 115: 7-11.
- Lamb, T.G., Tonkyn, D.W., Kluepfel, D.A., 1996. Movement of *Pseudomonas aureofaciens* from the rhizosphere to aerial plant tissue. *Can J Microbiol* 42: 1112-1120.
- Leifert, C., Morris, C.E., Waites, W.M., 1994. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field-grown plants: reasons for contamination problems *in vitro*. *Crit Rev Plant Sci* 13: 139 - 139.
- Lewis G, Schrire B, Mackinder B & Lock M 2005. *Legumes of the world*. Kew Publishing 592p.
- Mahafee, W.F., Kloepper, J.W., 1997. Bacterial communities of the rhizosphere and endorhiza associated with field-grown cucumber plants inoculated with a plant growth-promoting rhizobacterium or its genetically modified derivative. *Can J Microbiol* 43: 344-353.

- Malinowski, D., Alloush, G., Belesky, D., 2000. Leaf endophyte *Neotyphodium coenophialum* modifies mineral uptake in tall fescue. *Plant Soil* 227: 115-126.
- Martinez, L., Caballero-Mellado, J., Orozco, J., Martínez-Romero, E., 2003. Diazotrophic bacteria associated with banana (*Musa* spp.). *Plant Soil* 257: 35-47.
- Melnick, R.L., Zidack, N.K., Bailey, B.A., Maximova, S.N., Guiltinan, M., Backman, P.A., 2008. Bacterial endophytes: *Bacillus* spp. from annual crops as potential biological control agents of black pod rot of cacao. *Biol Contr* 46: 46-56.
- Mercier, J., Lindow, S.E., 2000. Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. *Appl Environ Microbiol* 66: 369-374.
- Misaghi, I.J., Donndelinger, C.R., 1990. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. *Phytopathology* 80: 808-811.
- Mishra, R., Singh, R., Jaiswal, H., Kumar, V., Maurya, S., 2006. Rhizobium-mediated induction of phenolics and plant growth promotion in rice (*Oryza sativa* L.). *Curr Microbiol* 52: 383-389.
- Mundt, J.O., Hinkle, N.F., 1976. Bacteria within ovules and seeds. *Appl Environ Microbiol* 32: 694-698.
- Paulitz, T.C., Loper, J.E., 1991. Lack of a role for fluorescent siderophore production in the biological control of *Pythium* damping-off of cucumber by a strain of *Pseudomonas putida*. *Phytopathology* 81: 930-935.
- Pleban, S., Ingel, F., Chet, I., 1995. Control of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* in the greenhouse using endophytic *Bacillus* spp. *Eur J Plant Pathol* 101: 665-672.
- Punja, Z.K., Utkhede, R.S., 2003. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends Biotechnol* 21: 400-407.
- Quadt-Hallmann, A., Kloepper, J.W., 1996. Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburiae* JM22 in different plant species. *Can J Microbiol* 42: 1144-1154.
- Rava, C.A., Purchio, A.F., Sartorato, A.S., 1994. Caracterização de patótipos de *Colletotricum Lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. *Fitopatol Bras* 19: 167-172.
- Reinhold, B., Hurek, T., 1988. Location of diazotrophs in the root interior with special attention to the kallar grass association. *Plant Soil* 110: 259-268.
- Rolcik, J.; Recinska, J.; Bartak, P.; Strnad, M.; Prinsen, E., 2005. Purification of 3-indolylacetic acid by solid phase extraction. *J Separ Sci* 28: 1370-1374.

- Rodriguez, E., Porres, J.M., Han, Y., Lei, X.G., 1999, Different sensitivity of recombinant *Aspergillus niger* phytase (r-PhyA) and *Escherichia coli* pH 2.5 acid phosphatase (r-AppA) to trypsin and pepsin *in vitro*. *Arch Biochem Biophys* 365: 262-267.
- Rosenblueth, M., Martinez-Romero, E., 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol Plant Microbe Interact* 19: 827-837.
- Ruppel, S., Hecht-Buchholz, C., Remus, R., Ortmann, U., Schmelzer, R., 1992. Settlement of the diazotrophic, phytoeffective bacterial strain *Pantoea agglomerans* on and within winter wheat: An investigation using ELISA and transmission electron microscopy. *Plant Soil* 145: 261-273.
- Ryan, R.P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D.J., Dowling, D.N., 2008, Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiol Lett* 278: 1-9.
- Samish, Z., Etinger-Tulczynska, R., Bick, M., 1963. The microflora within the tissue of fruits and vegetables. *J Food Sci* 28: 259-266.
- Schroder, B., Breves, G., Rodehutschord, M., 1996. Mechanisms of intestinal phosphorus absorption and availability of dietary phosphorus in pigs. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 103: 209-214.
- Scott, B., 2001. Epichloë endophytes: fungal symbionts of grasses. *Curr Opin Microbiol* 4: 393-398.
- Selle, P.H., Ravindran, V., 2007. Microbial phytase in poultry nutrition. *Ani Feed Sci Technol* 135: 1-41.
- Senthilkumar, M., Govindasamy, V., Annapurna, K., 2007. Role of antibiosis in suppression of charcoal rot disease by soybean endophyte *Paenibacillus* sp. HKA-15. *Curr Microbiol* 55: 25-29.
- Sharma, A., Johri, B.N., 2003. Growth promoting influence of siderophore-producing *Pseudomonas* strains GRP3A and PRS9 in maize (*Zea mays* L.) under iron limiting conditions. *Microbiol Res* 158: 243-248.
- Siciliano, S.D., Fortin, N., Mihoc, A., Wisse, G., Labelle, S., Beaumier, D., Ouellette, D., Roy, R., Whyte, L.G., Banks, M.K., Schwab, P., Lee, K., Greer, C.W., 2001. Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination. *Appl Environ Microbiol* 67: 2469-2475.
- Sprent, J., Faria, S., 1988. Mechanisms of infection of plants by nitrogen fixing organisms. *Plant Soil* 110: 157-165.

- Stoltzfus, J.R., So, R., Malarvithi, P.P., Ladha, J.K., de Bruijn, F.J., 1997. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. *Plant Soil* 194: 25-36.
- Strobel, G.A., 2002. Rainforest endophytes and bioactive products. *Crit Rev Biotechnol* 22: 315 - 333.
- Strobel, G., Daisy, B., 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol Mol Biol Rev* 67: 491-502.
- Sturz, A.V., 1995. The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization. *Plant Soil* 175: 257-263.
- Sundin, G.W., Jacobs, J.L., 1999. Ultraviolet radiation (UVR) sensitivity analysis and UVR survival strategies of a bacterial community from the phyllosphere of field-grown peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Microb Ecol* 38: 27-38.
- Sullivan, T.J., Rodstrom, J., Vandop, J., Librizzi, J., Graham, C., Schardl, C.L., Bultman, T.L., 2007. Symbiont-mediated changes in *Lolium arundinaceum* inducible defenses: evidence from changes in gene expression and leaf composition. *New Phytol* 176: 673-679.
- Thrall, P.H., Hochberg, M.E., Burdon, J.J., Bever, J.D., 2007. Coevolution of symbiotic mutualists and parasites in a community context. *Trends Ecol Evol* 22: 120-126.
- Tokala, R.K., Strap, J.L., Jung, C.M., Crawford, D.L., Salove, M.H., Deobald, L.A., Bailey, J.F., Morra, M.J., 2002. Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Appl Environ Microbiol* 68: 2161-2171.
- Turner, B.L., Haygarth, P.M., 2000. Phosphorus forms and concentrations in leachate under four grassland soil types. *Soil Sci Soc Am. J.* 64: 1090-1099.
- Turner, B.L., Mahieu, N., Condron, L.M., 2003. Quantification of myo-inositol hexakisphosphate in alkaline soil extracts by solution ³¹P Nmr spectroscopy and spectral deconvolution. *Soil Sci* 168: 469-478.
- Turner, B.L., Papházy, M.J., Haygarth, P.M., Mckelvie, I.D., 2002. Inositol phosphates in the environment. *Phil Trans Roy Soc Lond B Biol Sci* 357: 449-469.
- Van Peer, R., Shippers, B., 1989. Plant growth responses to bacterization with selected *Pseudomonas* spp. strains and rhizosphere microbial development in hydroponic cultures. *Can J Microbiol* 35: 456-463.
- Vieira, C., Paula Junior, T.J.d., Bórem, A., 2006, Feijão, 2. ed. Edition. Editora UFV, Viçosa, 600 p.

- Vincent, M.N., Harrison, L.A., Brackin, J.M., Kovacevich, P.A., Mukerji, P., Weller, D.M., Pierson, E.A., 1991. Genetic analysis of the antifungal activity of a soilborne *Pseudomonas aureofaciens* strain. *Appl Environ Microbiol* 57: 2928-2934.
- Vohra, A., Satyanarayana, T., 2003. Phytases: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Crit Rev Biotechnol* 23: 29-60.
- Weller, D.M., 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu Rev Phytopathology* 26: 379-407.
- Wurst, M.; Prikryl, Z.; Vokoun, J., 1984. High-performance liquid chromatography of plants hormones: II. Determination of plant hormones of the indole type. *J Chrom:* 286: 237-245.
- Wyss, M., Brugger, R., Kronenberger, A., Remy, R., Fimbel, R., Oesterheld, G., Lehmann, M., van Loon, A.P.G.M., 1999. Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): catalytic properties. *Appl Environ Microbiol* 65: 367-373.
- Zdor, R.E., Anderson, A.J., 1992. Influence of root colonizing bacteria on the defense responses of bean. *Plant Soil* 140: 99-107.

**Capítulo 1 - Bactérias endofíticas isoladas das folhas de três cultivares
de *Phaseolus vulgaris* do Brasil**

Resumo

O feijoeiro é uma das leguminosas mais importantes para a alimentação humana e muito pouco se conhece sobre as bactérias endofíticas associadas com as folhas desta planta. Objetivou-se com este trabalho identificar as bactérias endofíticas cultiváveis, das folhas do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*), de três cultivares diferentes (Vermelhinho, Talismã e Ouro negro) cultivadas nas mesmas condições de campo. A densidade de populações endofíticas recuperadas em meio TSA 10% variou de $4,5 \times 10^2$ a $2,8 \times 10^3$ UFC g⁻¹ de massa fresca. Do total de 158 isolados, 36,7 % pertencem aos Filos Proteobacteria, 32,9% ao Firmicutes, 29,7% ao Actinobacteria e 0,6% ao Bacteroidetes. As três cultivares de *Phaseolus vulgaris* mostraram diferenças na diversidade das classes Actinobacteria, Alphaproteobacteria e Bacilli. Baseado nas sequências do gene rDNA 16S, 23 gêneros diferentes foram isolados, compreendendo bactérias comumente associadas com solo e plantas. Os gêneros *Bacillus*, *Delftia*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Paenibacillus*, *Staphylococcus* e *Stenotrophomonas* foram isolados de todas as três cultivares. Para acessar e comparar a estrutura das comunidades, os índices de diversidade foram calculados e o perfil de diversidade plotado. Os isolados da cultivar Talismã apresentaram menor diversidade do que as outras duas cultivares. Os resultados deste trabalho indicam que a cultivar da planta influencia na estrutura das comunidades endofíticas associadas às plantas do feijoeiro comum. Estudos futuros determinarão o potencial destes isolados no controle biológico, na promoção de crescimento e na produção de enzimas para aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: Microrganismos endofíticos, feijoeiro, rDNA 16S, diversidade.

1. Introdução

A filosfera é o habitat de uma grande diversidade de microrganismos. Embora as bactérias sejam os microrganismos predominantes da filosfera, outros microrganismos como os fungos filamentosos também são importantes neste habitat. Os microrganismos na filosfera podem ser encontrados tanto na superfície das plantas, os epifíticos, como no interior do tecido das plantas, os endofíticos (Arnold et al., 2000; Lindow & Brandl, 2003; Monier & Lindow, 2004). Microrganismos endofíticos podem ser definidos como microrganismos que podem ser isoladas do tecido sadio de plantas desinfestadas superficialmente, e que ao mesmo tempo não causam prejuízos para a planta hospedeira (Hallmann et al., 1997).

A densidade populacional de bactérias endofíticas pode variar de 10^2 a 10^9 UFC g^{-1} (Jacobs et al., 1985; Misaghi & Donndelinger, 1990; Bell et al., 1995; Chi et al., 2005; Overbeek & Elsas, 2008), dependendo de vários fatores. Estes fatores incluem a planta em estudo, a parte da planta em análise (Lamb et al., 1996; QuadtHallmann & Kloepper, 1996), o estágio de desenvolvimento da planta (Hallmann et al., 1997; Overbeek & Elsas, 2008), a cultivar da planta (genótipo) (Fromin et al., 2001; Overbeek & Elsas, 2008), a interação com outros organismos e outros fatores relacionados com as condições ambientais (Hallmann et al., 1997).

A interação entre as bactérias endofíticas e suas plantas hospedeiras ainda não é totalmente compreendida, porém vários isolados demonstram efeitos benéficos para seus hospedeiros (Ulrich et al., 2008). Estes efeitos benéficos podem incluir a promoção do crescimento do hospedeiro e o controle biológico de fitopatógenos (Hallmann et al., 1997; Hardoim et al., 2008).

O feijoeiro é uma das leguminosas mais importantes na dieta humana, sendo uma importante fonte de proteínas (Broughton et al., 2003). A relação entre *Rhizobium* e outras bactérias fixadoras de nitrogênio, nos nódulos das raízes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) tem sido estudada extensivamente (Cocking, 2003; Martinez-Romero, 2003; Martinez-Romero, 2009). López-López et al. (2010) isolaram bactérias endofíticas das sementes e das raízes de três cultivares de *P. vulgaris* obtendo 24 gêneros e mais de 50 espécies. No entanto, existe pouco conhecimento sobre as bactérias endofíticas das partes aéreas do feijoeiro. Portanto, objetivou-se com este trabalho identificar as bactérias endofíticas cultiváveis, das folhas do feijoeiro comum de três cultivares diferentes crescendo nas mesmas condições de campo. Este é o primeiro relato de bactérias endofíticas das folhas destas três cultivares do feijoeiro comum.

2. Material e Métodos

2.1. Material da planta

Amostras foram coletadas de três cultivares do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) Talismã (TAL), Ouro Negro (ONG) e Vermelhinho (VER) no inverno de 2007 (Tabela 1). As cultivares foram plantadas no campo experimental da cidade de Coimbra – MG (altitude: 690 m; latitude: 20° 45' S; longitude 42° 51' W em quadrado triplo latino (8 x 8), com parcelas de duas linhas de dois metros de comprimento, espaçadas em 0,5 m, com densidade de 15 sementes por metro. No plantio, foram aplicados 350 kg ha⁻¹ da formulação 8-28-16 de NPK e, aos 25 dias após a emergência das plantas, 150 Kg ha⁻¹ de sulfato de amônio em cobertura. Não foi realizado o controle de doenças, o déficit hídrico foi controlado por irrigações suplementares e o controle de pragas e de plantas daninhas foi realizado de acordo com o recomendado

para a cultura. As folhas da porção superior das plantas foram coletadas na fase vegetativa, 45 dias após o plantio.

Tabela 1 – Origem e características dos cultivares utilizados no isolamento de bactérias endofíticas das folhas de feijoeiro

Cultivar	Origem	Características
BRSMG Talismã	Brasil (2002)	Grão tipo carioca; peso médio de 100 sementes de 26-27 g; porte prostrado; ciclo médio; resistente ao mosaico-comum e à antracnose.
Ouro Negro	Honduras (1991)	Grão tipo preto; peso médio de 100 sementes de 25-27 g; porte prostrado; ciclo normal; alta capacidade de fixação simbiótica de nitrogênio; resistente à ferrugem e à antracnose; tolerante ao frio.
Vermelhinho	Brasil	Grão tipo vermelho; peso médio de 100 sementes de 23.7; porte prostrado; ciclo normal; susceptível a antracnose, ferrugem e mancha-angular.

2.2. Preparação da amostra

As folhas foram lavadas em água corrente e selecionadas para a exclusão daquelas que apresentassem qualquer ferimento superficial a olho nu. Cada procedimento de isolamento foi feito em triplicata para cada cultivar. Cada triplicata foi composta por aproximadamente 2 g de folhas pertencentes a duas plantas diferentes tendo sido avaliadas seis plantas por cultivar. As folhas foram desinfestadas superficialmente pelo seguinte protocolo: álcool 70% por 1 min, hipoclorito de sódio por 4 min, etanol 30 s, seguido por 3 lavagens em água destilada estéril. Para confirmar o protocolo de desinfestação, alíquotas da água estéril utilizadas para a lavagem final foram plaqueadas em TSA 10% (triptona 1,5 g/l, peptona de soja 0,5 g/l; NaCl 1,5 g/l; Agar 15 g/L; pH 7,3). As placas foram incubadas a 28 °C por 15 dias.

2.3. Isolamento de bactérias

Inicialmente, as folhas foram trituradas em 6 ml de solução aquosa de NaCl 0,90 % com pistilo e almofariz previamente esterilizados. O extrato do tecido foi incubado a 28 °C por 3 horas. Para o isolamento de bactérias endofíticas, o extrato dos tecidos foi diluído em solução aquosa NaCl 0,90% e as diluições 10^{-1} e 10^{-2} foram plaqueadas em TSA 10%. As placas foram incubadas por até 15 dias a 28 °C. Foram selecionadas colônias nos dias 2, 5, 10 e 15 de incubação, que foram purificadas em TSA 10%. Para

cada placa de Petri avaliada, as colônias foram selecionadas de acordo com o tempo de crescimento e a morfologia (cor, tamanho e forma). Após 15 dias de incubação, as colônias foram contadas e expressas em UFC por grama de tecido fresco.

2.4. Identificação das bactérias endofíticas e análises filogenéticas

O DNA de cada isolado foi extraído segundo Kuklinsky-Sobral (2003). Aproximadamente 1,5 ml de amostra de uma cultura bacteriana cultivada durante 48 horas foi centrifugada por 5 minutos a 14000 g e as células foram ressuspensas em 1 ml de tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0), centrifugadas a 14000 g por 5 min. e novamente as células foram ressuspensas em 500 µl de tampão TE adicionado de 0,5 g de pérolas de vidro de 0,1 mm de diâmetro (Sigma) e 15 µl de SDS 20%. As células foram homogeneizadas por 30 s em vórtex (AP56 - Phoenix). Foram adicionados 500 µl de fenol tamponado, e a solução foi misturada e centrifugada por 5 min. a 14000 g, a fase aquosa foi extraída uma vez com fenol-clorofórmio (1:1) e uma vez com clorofórmio. Em seguida, foram adicionados 20 µl de NaCl 5 M, e o DNA foi precipitado com isopropanol (5 min. a temperatura ambiente) e coletado por centrifugação (10 min. a 14000 g). O pelete foi lavado com etanol 70%, secado ao ar e ressuspendido em 30 µl de água ultrapura autoclavada.

A amplificação do rDNA 16S foi realizada em uma reação com volume final de 25 µl contendo 1 µl (0,5-10 ng) de DNA total, 2,5 µl (0,2 µM) do oligonucleotídeo iniciador P027F (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTAG-3'), 2,5 µl (0,2 µM) do oligonucleotídeo iniciador 1378R (5'-CGGTGTGTACSSGGCCCGGAACG-3'), 1,6 µl (200 µM) de cada dNTP, 2,5 µl tampão IB 5X (Phoneutria; Belo Horizonte, Brasil); 1µl (1U) Taq DNA polimerase (Phoneutria; Belo Horizonte, Brasil) e 2,5 µl (25 µg) de BSA (Promega). Um controle negativo (mistura do PCR sem o DNA) foi incluído em todos os experimentos de PCR. As condições da reação de PCR foram as seguintes: 94

°C por 4 min., seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 63 °C por 1 min. e extensão a 72°C por 1 min., seguida por uma extensão final a 72 °C por 7 min. A amplificação dos fragmentos foi conferida pela observação do DNA após eletroforese em gel de agarose a 1,2% (p/v) contendo brometo de etídeo (0,2 µg/ml). O produto de PCR foi purificado e sequenciado (Macrogen, Coreia do Sul).

A identificação dos isolados foi realizada na base de dados Ribossomal Database Project (Wang et al., 2007; Cole et al., 2009). Foi utilizado o aplicativo Sequence Match para verificar a similaridade das sequências com as sequências depositadas nos bancos de dados (Cole et al., 2009) e classificá-las em nível de espécie.

A sequência de DNA de 34 linhagens de referência (“type strain”), de duas outras linhagens obtidas na base de dados Ribossomal Database Project, juntamente com as sequências de DNA de 34 representantes dos isolados foram alinhadas no Ribossomal Database Project. As árvores filogenéticas foram construídas usando o algoritmo Neighbor-Joining (NJ) no MEGA versão 4 (Tamura et al., 2007), o algoritmo de Máxima Parcimônia (MP) e o algoritmo de Máxima verossimilhança (ML) no Paup* (Swofford, 2003), e algoritmo da Análise de Bayesiana (MB) no MrBayes 3.1 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). O método de Neighbor-Joining foi corrigido pelo modelo de múltiplas substituições de base Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993) e pela distribuição GAMA (0.4899) estabelecida pelo Modeltest 3.7. Os parâmetros para a Máxima Verossimilhança (GTR+I+G) foram selecionados por AIC no Modeltest 3.7 (Posada & Crandall, 1998). Os parâmetros de Bayesiana (GTR+I+G) foram selecionados por AIC no MrModeltest 2.3 (Nylander, 2004). Foram utilizadas 1000 replicações para os testes de bootstrap para os métodos de NJ e MP e 100 replicações para o teste de ML. A MB foi realizada com duas corridas independentes com quatro Cadeias Markovianas de Monte Carlo (MCMC), sendo rodadas 10.000.000 gerações,

com as árvores sendo amostradas a cada 1000 gerações e descartando as primeiras 1.000.000 árvores obtidas. As árvores não enraizadas foram calculadas usando a sequência do rDNA 16S de *Methanocaldococcus jannaschii* DSM 2661 como grupo externo. As sequências do rDNA 16S de cada isolado foi depositada no banco de dados do NCBI GENBANK sob os números de acesso HM355592 a HM355749.

2.5. Rarefação, índice de diversidade e perfil de diversidade

Para comparar a estrutura das comunidades dos três cultivares com base nos isolados obtidos, foi realizada a rarefação dos dados. Para isto, cada gênero foi considerado um *taxa*, e o número de isolados de cada gênero de cada cultivar foi utilizado para construir as tabelas utilizadas nas análises de rarefação, índice de diversidade e perfil de diversidade. A riqueza por curva de rarefação dos dados para cada cultivar foi calculado no programa R versão 2.11.1 (www.r-project.org/ - R Development Core Team 2010) utilizando a livreria Vegan (Jari Oksanen et al., 2010). Os índices de diversidade, a rarefação individual e o perfil de diversidade foram calculados utilizando o programa PAST versão 2.01 (Hammer et al., 2001).

3. Resultados

3.1. Isolamento e identificação das bactérias endofíticas

A densidade de populações endofíticas recuperadas em meio TSA 10% variou de $4,5 \times 10^2$ a $2,8 \times 10^3$ UFC g⁻¹ de massa fresca. Foi obtido um total de 158 isolados. Deste total, 30,25% (49) foram isolados da cultivar Talismã; 37,03% (59), da cultivar Ouro Negro; e 32,72% (50), da cultivar Vermelhinho.

3.2. Identificação das bactérias endofíticas e análise filogenética

O gene rDNA 16S de todos os 158 isolados foi sequenciado. Com base na sequência de bases, os isolados foram atribuídos a 23 gêneros diferentes e 45 espécies

diferentes. (Tabela 2). A maioria dos isolados pertence a gêneros comumente encontrados em associações com plantas ou a gêneros presentes no solo. A maioria dos isolados pertence ao Filo Proteobacteria (36,7% do número total de isolados), seguido pelo Firmicutes (32,9%) e pelo Actinobacteria (29,7%). Os isolados do Filo Bacteroidetes compreenderam apenas 0,6% do total, com um único isolado pertencente à Sphingobacteria (Sphingobacteriaceae) do gênero *Sphingobacterium*. A classe Bacilli possui o maior número de isolados (32,9%), compreendendo bactérias das famílias Staphylococcaceae (17,7%), Bacillaceae (10,1%), Paenibacillaceae (3,8%) e Planococcaceae (1,3%). A segunda classe em número de isolados foi a Actinobacteria (29,7%), a qual inclui Microbacteriaceae (24,7%), Micrococcaceae (3,1%), Nocardiaceae (0,6%) e Dietziaceae (0,6%). Entre os isolados do Filo Proteobacteria, a classe dominante na coleção de isolados foi a Gammaproteobacteria (17,7%), com isolados pertencentes às famílias Xanthomonadaceae (12,0%), Enterobacteriaceae (2,5%), Pseudomonadaceae (1,9%) e dois isolados da família Moraxellaceae. Isolados da Alphaproteobacteria (16,5%) compreendem representantes das famílias Methylobacteriaceae (11,4%), Rhizobiaceae (3,2%), Sphingomonadaceae (1,3%) e um isolado da família Caulobacteraceae. A classe Betaproteobacteria (2,5%) foi representada apenas por membros da família Comamonadaceae (2,5%). A identidade das sequências dos isolados com as sequências depositadas no banco de dados (Ribossomal Database Project) pode ser visualizada na Tabela Suplementar 1.

A composição relativa dos isolados bacterianos divididos por cultivar, de acordo com a classe à qual pertencem, é mostrado na Figura 1. Houve diferença nas proporções das classes Actinobacteria, Alphaproteobacteria e Bacilli nas três cultivars de *P. vulgaris*. Bactérias da classe Sphingobacteria só foram isoladas da cultivar Vermelhinho e esta cultivar também mostrou diferença nas proporções de isolados pertencentes à

Gammaproteobacteria comparativamente às outras duas cultivares. A proporção de Betaproteobacteria foi similar em todas as cultivares e todos os isolados desta classe pertencem ao gênero *Delftia*. A Figura 2 mostra os gêneros isolados das três cultivares e sua distribuição entre as cultivares.

Tabela 2. Isolados endofíticos obtidos das três cultivares de *Phaseolus vulgaris*

Taxum identificado	Cultivar*		
	TAL	ONG	VER
Actinobacteria	25	13	9
Actinobacteria (class)	25	13	9
<i>Agromyces</i>	0	2	3
<i>Dietzia</i>	0	0	1
<i>Frigoribacterium</i>	0	3	0
<i>Kocuria</i>	1	0	0
<i>Microbacterium</i>	20	7	5
<i>Micrococcus</i>	4	0	0
<i>Rhodococcus</i>	0	1	0
Bacteroidetes	0	0	1
Sphingobacteria	0	0	1
<i>Sphingobacterium</i>	0	0	1
Firmicutes	11	23	18
Bacilli	11	22	18
<i>Bacillus</i>	7	3	5
<i>Brevibacillus</i>	0	1	1
<i>Paenibacillus</i>	1	2	1
<i>Pasteuriaceae Incertae Sedis</i>	0	0	1
<i>Sporosarcina</i>	0	1	1
<i>Staphylococcus</i>	3	16	9
Proteobacteria	13	23	22
Alphaproteobacteria	5	14	7
<i>Brevundimonas</i>	1	0	0
<i>Methylobacterium</i>	3	8	7
<i>Rhizobium</i>	1	4	0
<i>Sphingomonas</i>	0	2	0
Betaproteobacteria	1	2	1
<i>Delftia</i>	1	2	1
Gammaproteobacteria	7	7	14
<i>Acinetobacter</i>	0	0	2
<i>Enterobacter</i>	4	0	0
<i>Stenotrophomonas</i>	2	7	10
<i>Pseudomonas</i>	1	0	2
Total	49	59	50

* TAL = Talismã; ONG = Ouro Negro; VER = Vermelhinho

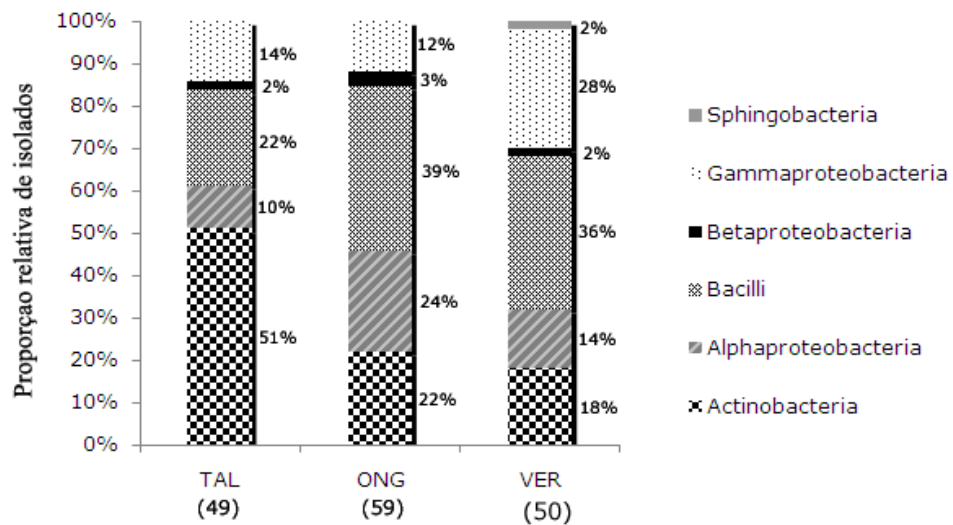


Figura 1. Distribuição das classes bacterianas dos isolados endofíticos cultiváveis obtidos das três cultivares de *Phaseolus vulgaris*. Cultivar Talismã (TAL); Cultivar Ouro Negro (ONG); Cultivar Vermelho (VER)

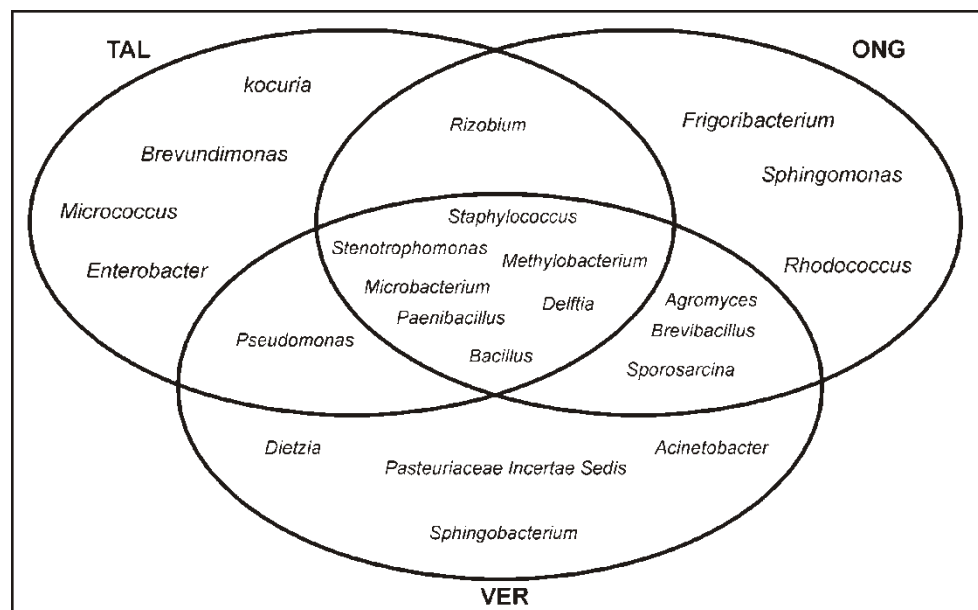


Figura 2. Distribuição de bactérias cultiváveis entre as três cultivares de *Phaseolus vulgaris* estudadas: cultivar Talismã (TAL), cultivar Ouro Negro (ONG) e cultivar Vermelho (VER)

As sequências do gene rDNA 16S dos isolados obtidos, juntamente com as sequências retiradas da base de dados do Ribossomal Database Project, foram usadas para a construção de árvores filogenéticas usando quatro métodos diferentes (Neighbor-Joining, Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança e Bayesiana). A árvore obtida

pelo método de Bayesiana é mostrada na Figura 3. Houve formação de dois clados principais, com uma probabilidade a posteriori de 0,50: o primeiro composto pelas bactérias Gram positivas e o segundo pelas bactérias Gram negativas. Os nós terminais que contêm os isolados BAC2078, BAC3048 obtiveram valores de bootstrap menores que 90 pelo método de ML, e o nó terminal que contém o isolado BAC3114 obteve valores de bootstrap menores que 90 pelos métodos de ML e NJ. O nó terminal que contém o isolado BAC2073 obteve valores de bootstrap menores que 90 para os métodos MP, ML e NJ. O filo Bacteroidetes não ficou bem definido alinhando-se com as bactérias do filo Proteobacteria.

3.3. Rarefação, Índice de Diversidade e Perfil de Diversidade

Os índices de diversidade calculados no programa PAST e o número de genótipos esperados para cada cultivar calculado no programa R podem ser visualizados na Tabela 3. O índice D (*Dominance*) mostra que a diversidade dos isolados foi maior para a cultivar VER e menor para a cultivar TAL, ou seja, uma ou mais espécie estavam mais presentes do que as demais na cultivar TAL. Da mesma forma, o índice Berger-Parker mostra o domínio de uma ou mais espécies na cultivar TAL. Os índices H (*Shannon*), 1-D (*Simpson*), *Menhinick*, e *Margalef* mostram que a diversidade dos isolados obtidos da cultivar VER foi maior e que a diversidade dos isolados obtidos da cultivar TAL foi menor. Os índices e^H/S (*Evenness*) e J (*Equitability*) indicam que a diversidade dos isolados obtidos da cultivar ONG foi maior, porém os valores destes dois índices para a cultivar VER foram muito próximos da cultivar ONG.

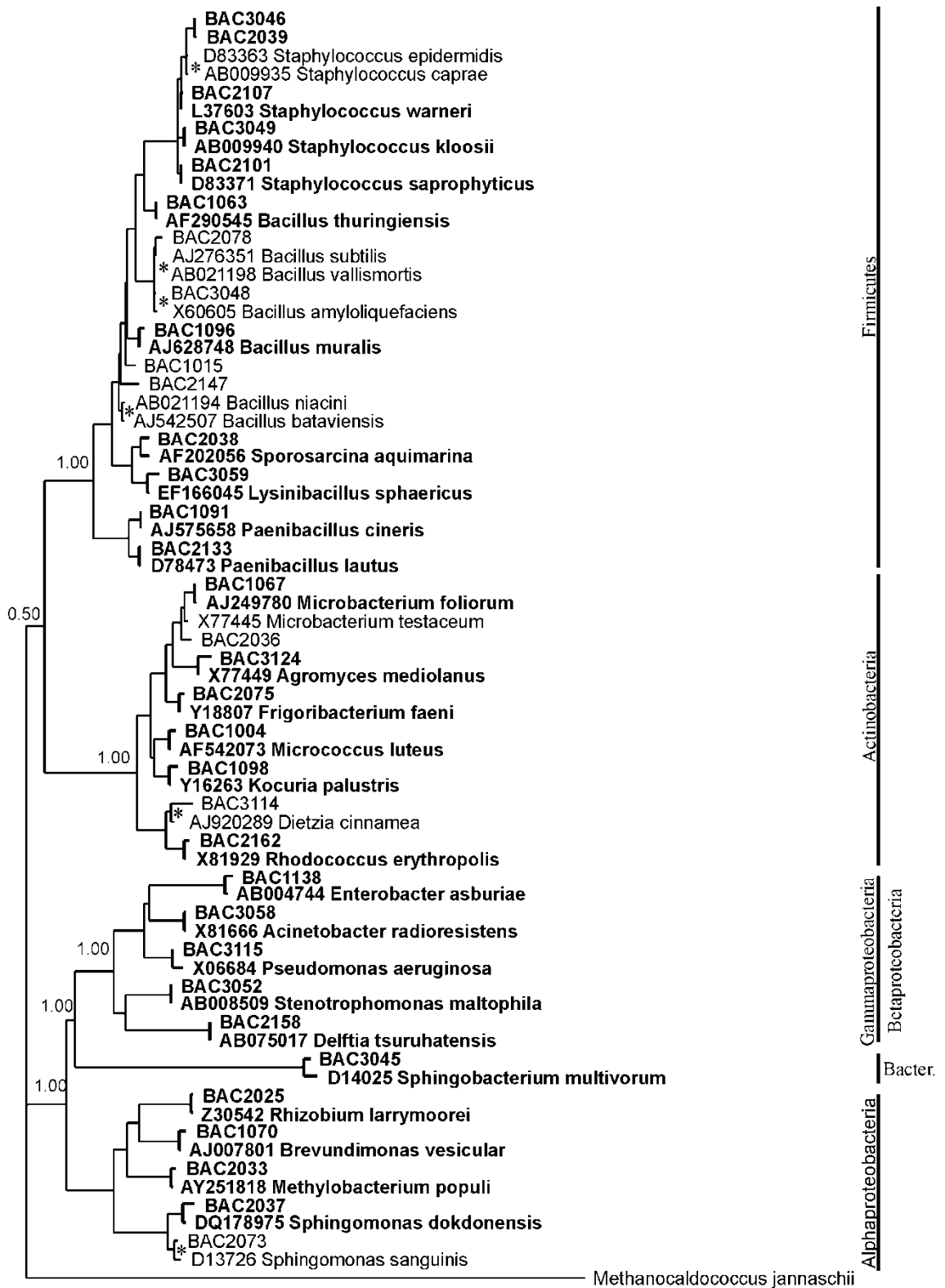


Figura 3. Arvore Filogenética mostrando a relação das seqüências do gene rDNA 16S de isolados representativos das bactérias endofíticas obtidas das três variedades de *P. vulgaris*. Nós terminais que tiveram valores de bootstrap maior ou igual a 94 nos três métodos utilizados (NJ, MP, ML) e que apresentaram uma probabilidade a posteriori maior ou igual a 0,99 estão em negrito. Os nós terminais com probabilidade a posteriori igual a 1,00 e com valores de bootstrap menores que 90 em alguma dos outros três métodos estão marcados com *. Bact.= Bacteroidetes.

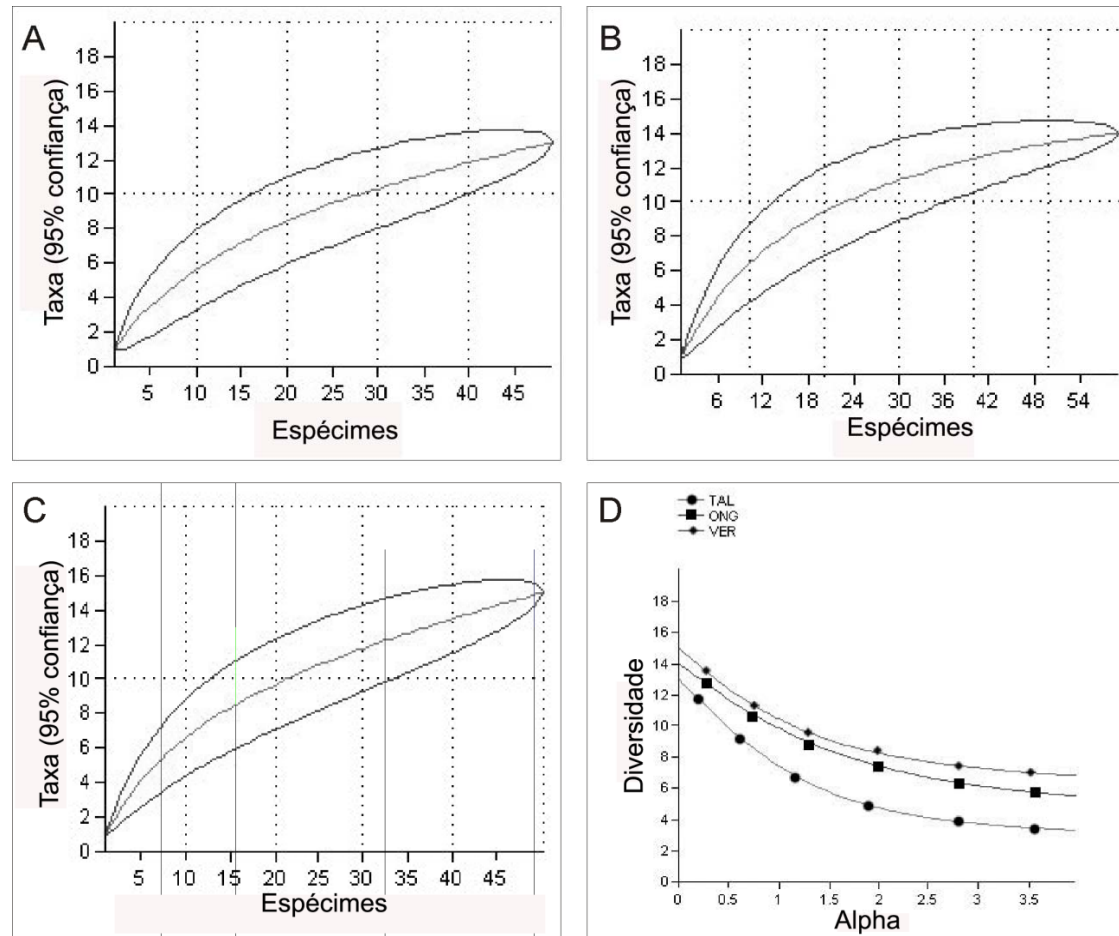


Figura 4. Rarefação individual e perfil de diversidade de isolados bacterianos endofíticos de três cultivares de feijoeiro comum. A - Rarefação individual dos isolados da cultivar Talismã; B - Rarefação individual dos isolados da cultivar Ouro Negro; C - Rarefação individual dos isolados da cultivar Vermelho; D - Perfil de Diversidade: alpha 0 = número total de gêneros; alpha 1 = índice proporcional ao índice de Shannon (H); alpha 2 = índice que se comporta como o índice de Simpson

Tabela 3. Número de taxa, indivíduos, índice de diversidade e número de genótipos esperados de cada cultivar

Índice de diversidade/Parâmetros	Cultivar		
	TAL	ONG	VER
Taxa_S	13	14	15
Indivíduos	49	59	50
Dominance_D	0,212	0,135	0,122
Shannon_H	2,002	2,282	2,340
Simpson_1-D	0,788	0,865	0,878
Evenness_e ^H /S	0,570	0,700	0,692
Menhinick	1,857	1,823	2,121
Margalef	3,083	3,188	3,579
Equitability_J	0,781	0,865	0,864
Fisher_alpha	5,781	5,801	7,265
Berger-Parker	0,408	0,271	0,200
Número de genótipos esperados*	13	13,38	14,86

* Calculado no programa R versão 2.11.1

As curvas de rarefação para as três cultivares e o perfil de diversidade são mostrados na Figura 4. O número de genótipos esperados calculado pelo programa R (Tabela 3) e as curvas de rarefação mostram que embora o número de isolados não tenha atingido o platô, ele pode ser considerado representativo, além disso, o número de isolados das três cultivares e os índices de diversidade podem ser comparados entre si, assim como o Perfil de Diversidade dos isolados. No gráfico do perfil de diversidade $\alpha = 0$ corresponde ao número total de gêneros observados, enquanto $\alpha = 1$ corresponde a um índice que é proporcional ao índice de *Shannon* e $\alpha = 2$ corresponde a um índice que se comporta como o índice de *Simpson*.

4. Discussão

Neste estudo, foram feitos o isolamento e a identificação de bactérias endofíticas das folhas do feijoeiro comum (*P. vulgaris*) de três cultivares mantidas em condições de campo em Minas Gerais na safra de inverno. Nossos resultados mostram uma densidade

populacional de bactérias cultiváveis variando de $4,5 \times 10^2$ a $2,8 \times 10^3$ UFC g⁻¹ de massa fresca. Kuklinsky-Sobral et al. (2005) isolaram bactérias endofíticas de diferentes partes da soja (*Glycine max*) tendo sua densidade de variado de 10^2 a 10^4 UFC g⁻¹. O estudo destes autores mostrou que a densidade dos isolados obtidos das folhas de soja crescendo em solo sem herbicida foi similar aos valores encontrados neste trabalho para folhas de feijoeiro.

Todos os isolados identificados correspondem a gêneros comumente isolados da rizosfera ou de bactérias associadas com plantas usadas na agricultura ou florestais. Espécies dos gêneros *Agromyces*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Delftia*, *Dietzia*, *Enterobacter*, *Methylobacterium*, *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus*, *Sphingobacterium* e *Stenotrophomonas* já foram isoladas de solos rizosféricos em vários trabalhos (Hallmann et al., 1999; Takeuchi and Hatano, 2001; Idris et al., 2004; Vivas et al., 2006; Kuffner et al., 2008; Tian et al., 2009). Adicionalmente, espécies dos gêneros *Acinetobacter*, *Agromyces*, *Bacillus*, *Brevundimonas*, *Delftia*, *Dietzia*, *Enterobacter*, *Frigoribacterium*, *Kocuria*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus*, *Sphingobacterium*, *Sphingomonas*, *Sporosarcina*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas* já foram reportados em estudos de bactérias endofíticas cultiváveis e não-cultiváveis (Hallmann et al., 1999; Surette et al., 2003; Kuklinsky-Sobral et al., 2004; Rivas et al., 2004; Berg et al., 2005; Kuklinsky-Sobral et al., 2005; Azanza et al., 2006; Barzanti et al., 2007; Kang et al., 2007; Rijavec et al., 2007; Sun et al., 2008; Ulrich et al., 2008).

Os gêneros *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Kocuria*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Rhizobium*, *Sphingomonas* e *Staphylococcus* foram reportados em sementes e/ou raízes de *P. vulgaris* por López-

López et al. (2010). Porém, a maioria das espécies relatadas nestes gêneros não são as mesmas encontradas neste trabalho. As espécies em comum com o trabalho reportado por López-López et al. (2010) são *Acinetobacter radioresistens*; *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *Kocuria palustris* e *Micrococcus luteus*. A presença destas espécies em diferentes cultivares são evidências de que elas estão adaptadas a diferentes cultivares de *P. vulgaris*. Os gêneros isolados ainda não reportados para *P. vulgaris* nestes trabalho são *Agromyces*, *Brevibacillus*, *Brevundinomonas*, *Delftia*, *Dietzia*, *Frigoribacterium*, *Lysinibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Sphingobacterium*, *Sporosarcina*, *Stenotrophomonas*.

Dos 158 isolados obtidos, a maioria pertence aos gêneros *Microbacterium* (19,0% do total de isolados), *Staphylococcus* (17,1%), *Stenotrophomonas* (11,4%) e *Methylobacterium* (11,4%). Diferenças na composição das comunidades endofíticas obtidas de acordo com a cultivar ou a partir de diferentes clones de uma planta foram documentadas para plantas cítricas, álamo, batata, salgueiro e soja (Araujo et al., 2002; Kukllinsky-Sobral et al., 2004; Cambours et al., 2005; Moore et al., 2006; Overbeek & Elsas, 2008; Ulrich et al., 2008), e os resultados deste trabalho confirmam que a cultivar de plantas de feijoeiro tem efeito sobre a estrutura das comunidades endofíticas a elas associadas. Determinados gêneros só foram isolados em uma única cultivar estudada (Tabela 1 e Figura 2), e a análise dos isolados de cada cultivar também é um indicativo de que a cultivar da planta pode contribuir para a determinação das bactérias associadas a ela. A maioria dos isolados da cultivar Talismã pertence aos gêneros *Microbacterium* (11,%), *Bacillus* (4,4%), *Enterobacter* (2,5%) e *Micrococcus* (2,5%), enquanto a maioria dos isolados da cultivar Ouro Negro pertence aos gêneros *Staphylococcus* (9,5%), *Methylobacterium* (5,1%), *Microbacterium* (4,4%) e *Stenotrophomonas* (4,4%) e a maioria dos isolados da cultivar Vermelhinho pertence aos gêneros

Stenotrophomonas (5,7%), *Staphylococcus* (5,7%), *Methylobacterium* (4,4%) e *Microbacterium* (3,2%). As diferenças entre o número e tipo de isolados em cada cultivar sugerem uma comunidade endofítica distinta entre as cultivares. Além disso, as diferenças na diversidade das comunidades endofíticas das cultivares também podem ser evidenciadas pela comparação dos percentuais relativos apresentados na Figura 1.

Para visualizar melhor a estrutura das comunidades das três cultivares de feijoeiro avaliadas, alguns índices de diversidade (Tabela 4) foram calculados e o perfil de diversidade baseado no índice de Renyi foi plotado no gráfico apresentado na Figura 4 D. Os índices de diversidade obtidos na Tabela 3 bem como o perfil de diversidade apresentado na Figura 4 D mostram que a diversidade dos isolados bacterianos obtidos da cultivar Talismã foi menor do que a diversidade dos isolados obtidos das outras duas cultivares e que a diversidade dos isolados bacterianos da cultivar Vermelhinho foi maior. Além disso, os índices Dominance_D e Berger-Parker mostram claramente que um dos *taxa* isolados da cultivar Talismã é mais abundante na comunidade, e o número de isolados obtidos apresentado na Tabela 2 mostra que este é o gênero *Microbacterium*.

Bactérias comumente associadas com doenças foliares em *P. vulgaris* pertencem aos gêneros *Curtobacterium* (Hedges, 1922), *Pseudomonas* (Lindow et al., 1978) e *Xanthomonas* (Webster et al., 1983). Nenhum dos isolados pertence aos gêneros *Curtobacterium* ou *Xanthomonas*, e todos os isolados pertencentes ao gênero *Pseudomonas* se alinham com scores de 0,999 com diferentes linhagens de *Pseudomonas aeruginosa*. Linhagens de *P. aeruginosa* já foram isoladas da rizosfera de tabaco por Tian et al. (2009). Adicionalmente, De Meyer e Höfte (1997) demonstraram que o ácido salicílico produzido por algumas linhagens de *P. aeruginosa* de rizosfera é capaz de induzir a resistência a infecções foliares causadas por *Botrytis cinerea* em

feijoeiro. Ainda, Perneel et al. (2008) avaliaram a produção de metabólitos produzidos pela linhagem PNA1 de *P. aeruginosa*, no controle biológico de *Pythium splendens* em feijoeiro e *Pythium myriotylum* em taioba (*Xanthosoma sagittifolium* L Schott).

Algumas espécies de *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Methylobacterium* e *Enterobacter* já foram descritas na literatura como fixadoras de nitrogênio e formadoras de nódulos em raízes de várias leguminosas (Sy et al., 2001; Martínez-Romero, 2003; Benhizia et al., 2004; Jourand et al., 2004). Além disso, foi proposta a renomeação do gênero *Agrobacterium*, que apresenta bactérias patogênicas de plantas, para o gênero *Rhizobium* por Young et al. (2001), incluindo a espécie *Agrobacterium larrymoorei* (Young, 2004).

As cinco culturas do gênero *Rhizobium* isoladas neste estudo alinharam com sequências da espécie *Rhizobium larrymoorei*. A espécie *R. larrymoorei* foi originalmente isolada de tumores das partes aéreas de *Ficus benjamina* (Bouzar & Jones, 2001). Espécies bacterianas consideradas patogênicas para determinadas espécies vegetais têm sido isoladas como endofíticas em outras plantas (Bell et al., 1995; Araújo et al., 2002; Vega et al., 2005; Ulrich et al., 2008). Se estas espécies endofíticas realmente conferem algum benefício para a planta hospedeira ou se elas apenas utilizam o hospedeiro como uma estratégia de sobrevivência no ambiente, para, de alguma forma, alcançar as plantas nas quais elas desenvolvem a doença, ainda é algo que não foi esclarecido.

Os isolados do gênero *Enterobacter* obtidos foram atribuídos às espécies *E. asburiae* e *E. hormaechei*. Ambas as espécies foram isoladas do caule de batata doce no Japão (Jr & Adachi, 2004). Todos os isolados do feijoeiro do gênero *Methylobacterium* se alinharam com linhagens de *Methylobacterium populi*, espécie endofítica que foi primeiramente isolada de *Populus deltoidesxnigra* (Van Aken et al., 2004).

O estudo dos microrganismos endofíticos é importante para a compreensão da interação entre estes microrganismos e sua planta hospedeira, além disso, microrganismos endofíticos podem ter aplicações biotecnológicas. O potencial das bactérias endofíticas isoladas na promoção de crescimento do feijoeiro e o potencial para biocontrole de algumas doenças que acometem as partes aéreas desta leguminosa tão importante para a alimentação humana são os próximos estudos a serem realizados.

5. Referências

- Araujo, W.L., Marcon, J., Maccheroni, W., Jr., van Elsas, J.D., van Vuurde, J.W.L., and Azevedo, J.L. 2002. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4906-4914.
- Arnold, A.E., Maynard, Z., Gilbert, G.S., Coley, P.D., and Kursar, T.A. 2000. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecol. Lett.* 3: 267-274.
- Azanza, M., Azanza, R., Vargas, V., and Hedreyda, C. 2006. Bacterial endosymbionts of *Pyrodinium bahamense* var. *compressum*. *Microb. Ecol.* 52: 756-764.
- Barzanti, R., Ozino, F., Bazzicalupo, M., Gabbrielli, R., Galardi, F., Gonnelli, C., and Mengoni, A. 2007. Isolation and characterization of endophytic bacteria from the nickel hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii*. *Microb. Ecol.* 53: 306-316.
- Bell, C.R., Dickie, G.A., Harvey, W.L.G., and Chan, J. 1995. Endophytic bacteria in grapevine. *Can. J. Microbiol.* 41: 46-53.
- Benhizia, Y., Benhizia, H., Benguedouar, A., Muresu, R., Giacomini, A., and Squartini, A. 2004. Gamma Proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. *Syst. Appl. Microbiol.* 27: 462-468.
- Berg, G., Krechel, A., Ditz, M., Sikora, R.A., Ulrich, A., and Hallmann, J. 2005. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.* 51: 215-229.
- Bouzar, H., and Jones, J. 2001. *Agrobacterium larrymoorei* sp. nov., a pathogen isolated from aerial tumours of *Ficus benjamina*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1023-1026.

- Broughton, W.J., Hernández, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., and Vanderleyden, J. 2003. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. *Plant Soil* 252: 55-128.
- Cambours, M.A., Nejad, P., Granhall, U., and Ramstedt, M. 2005. Frost-related dieback of willows. Comparison of epiphytically and endophytically isolated bacteria from different *Salix* clones, with emphasis on ice nucleation activity, pathogenic properties and seasonal variation. *Biomass Bioenergy* 28: 15-27.
- Chi, F., Shen, S.-H., Cheng, H.-P., Jing, Y.-X., Yanni, Y.G., and Dazzo, F.B. 2005. Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7271-7278.
- Cocking, E.C. 2003. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. *Plant Soil* 252: 169-175.
- Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R.J. et al. 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 37(S1): D141-145.
- De Meyer, G., and Höfte, M. 1997. Salicylic acid produced by the Rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean. *Phytopathology* 87: 588-593.
- Fromin, N., Achouak, W., Thiéry, J.M., and Heulin, T. 2001. The genotypic diversity of *Pseudomonas brassicacearum* populations isolated from roots of *Arabidopsis thaliana*: influence of plant genotype. *FEMS Microbiol. Ecol.* 37: 21-29.
- Hallmann, J., QuadtHallmann, A., Mahaffee, W.F., and Kloepper, J.W. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* 43: 895-914.
- Hallmann, J., Rodríguez-Kábana, R., and Kloepper, J.W. 1999. Chitin-mediated changes in bacterial communities of the soil, rhizosphere and within roots of cotton in relation to nematode control. *Soil Biol. Biochem.* 31: 551-560.
- Hardoim, P.R., van Overbeek, L.S., and Elsas, J.D.v. 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol.* 16: 463-471.
- Hammer, Ø.; Harper, D. A. T.; Ryan, P. D. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for education and data analysis. *Palaeontol. Electronica* 4: 4- 9. Available from http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm.
- Hedges, F. 1922. A bacterial wilt of the bean caused by *Bacterium flaccumfaciens* nov. sp. *Science* 55: 433-434.

- Huelsenbeck, J.P., and Ronquist, F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754-755.
- Idris, R., Trifonova, R., Puschenreiter, M., Wenzel, W., and Sessitsch, A. 2004. Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. *Appl. and Environ. Microbiol.* 70: 2667-2677.
- Jacobs, M.J., Bugbee, W.M., and Gabrielson, D.A. 1985. Enumeration, location, and characterization of endophytic bacteria within sugar-beet roots. *Can. J. Bot.* 63: 1262-1265.
- Jourand, P., Giraud, E., Bena, G., Sy, A., Willems, A., Gillis, M. et al. 2004. *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic, facultatively methylotrophic, legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 2269-2273.
- Jr, C.A.A., and Adachi, K. 2004. Isolation of endophytic diazotroph *Pantoea agglomerans* and nondiazotroph *Enterobacter asburiae* from sweet potato stem in Japan. *Lett. Appl. Microbiol.* 38: 19-23.
- Kang, S., Cho, H., Cheong, H., Ryu, C., Kim, J., and Park, S. 2007. Two bacterial entophytes eliciting both plant growth promotion and plant defense on pepper (*Capsicum annuum* L.). *J. Microbiol. Biotechnol.* 17: 96-103.
- Kuffner, M., Puschenreiter, M., Wieshammer, G., Gorfer, M., and Sessitsch, A. 2008. Rhizosphere bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating willows. *Plant Soil* 304: 35-44.
- Kuklinsky-Sobral, J. 2003. A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (*Glycine max*) e estudo da interação endófitos-planta (Doutorado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Kuklinsky-Sobral, J., Araújo, W.L., Mendes, R., Geraldi, I.O., Pizzirani-Kleiner, A.A., and Azevedo, J.L. 2004. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environ. Microbiol.* 6: 1244-1251.
- Kuklinsky-Sobral, J., Araújo, W.L., Mendes, R., Pizzirani-Kleiner, A.A., and Azevedo, J.L. 2005. Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. *Plant Soil* 273: 91-99.

- Lamb, T.G., Tonkyn, D.W., and Kluepfel, D.A. 1996. Movement of *Pseudomonas aureofaciens* from the rhizosphere to aerial plant tissue. *Can. J. Microbiol.* 42: 1112-1120.
- Lindow, S.E., and Brandl, M.T. 2003. Microbiology of the phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1875-1883.
- Lindow, S.E., Arny, D.C., and Upper, C.D. 1978. Distribution of ice nucleation-active bacteria on plants in nature. *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 831-838.
- López-López A., Rogel M.A., Ormeño-Orrillo E., Martínez-Romero J., Martínez-Romero E.. 2010. *Phaseolus vulgaris* seed-borne endophytic community with novel bacterial species such as *Rhizobium endophyticum* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 33: 322-327
- Martínez-Romero, E. 2003. Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. *Plant Soil* 252: 11-23.
- Martínez-Romero, E. 2009. Coevolution in Rhizobium-legume symbiosis? *DNA Cell Biol.* 28: 361-370.
- Misaghi, I.J., and Donndelinger, C.R. 1990. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. *Phytopathology* 80: 808-811.
- Monier, J.-M., and Lindow, S.E. 2004. Frequency, size, and localization of bacterial aggregates on bean leaf surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 346-355.
- Moore, F.P., Barac, T., Borremans, B., Oeyen, L., Vangronsveld, J., van der Lelie, D. et al. 2006. Endophytic bacterial diversity in poplar trees growing on a BTEX-contaminated site: The characterisation of isolates with potential to enhance phytoremediation. *Syst. Appl. Microbiol.* 29: 539-556.
- Nylander, J.A.A. 2004. MrModeltest 2.3. Program distributed by the author. In: Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Jari Oksanen, F. Guillaume Blanchet, Roeland Kindt, Pierre Legendre, R. B. O'Hara, Gavin L. Simpson, Peter Solymos, M. Henry H. Stevens and Helene Wagner 2010. vegan: Community Ecology Package. R package version 1.17-3. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Overbeek, L.v., and Elsas, J.D.v. 2008. Effects of plant genotype and growth stage on the structure of bacterial communities associated with potato (*Solanum tuberosum* L.). *FEMS Microbiol. Ecol.* 64: 283-296.

- Perneel, M., D'hondt, L., Maeyer, K.D., Adiobo, A., Rabaey, K., and Höfte, M. 2008. Phenazines and biosurfactants interact in the biological control of soil-borne diseases caused by *Pythium* spp. *Environ. Microbiol.* 10: 778-788.
- Posada, D., and Crandall, K. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.
- QuadtHallmann, A., and Kloepper, J.W. 1996. Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburiae* JM22 in different plant species. *Can. J. Microbiol.* 42: 1144-1154.
- R Development Core Team 2010. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Rijavec, T., Lapanje, A., Dermastia, M., and Rupnik, M. 2007. Isolation of bacterial endophytes from germinated maize kernels. *Can. J. Microbiol.* 53: 802-808.
- Rivas, R., Trujillo, M., Mateos, P., Martinez-Molina, E., and Velaquez, E. 2004. *Agromyces ulmi* sp nov., a xylanolytic bacterium isolated from *Ulmus nigra* in Spain. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1987-1990.
- Sun, L., Qiu, F., Zhang, X., Dai, X., Dong, X., and Song, W. 2008. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. *Microb. Ecol.* 55: 415-424.
- Surette, M., Sturz, A., Lada, R., and Nowak, J. 2003. Bacterial endophytes in processing carrots (*Daucus carota* L. var. sativus): their localization, population density, biodiversity and their effects on plant growth. *Plant Soil* 253: 381-390.
- Swofford, D.L. 2003. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). In. Sunderland, Massachusetts.: Sinauer Associates.
- Sy, A., Giraud, E., Jourand, P., Garcia, N., Willems, A., de Lajudie, P. et al. 2001. Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *J. Bacteriol.* 183: 214-220.
- Takeuchi, M., and Hatano, K. 2001. *Agromyces luteolus* sp nov., *Agromyces rhizosphaerae* sp nov and *Agromyces brachium* sp nov., from the mangrove rhizosphere *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1529-1537.
- Tamura, K., and Nei, M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10: 512-526.

- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.
- Tian, F., Ding, Y., Zhu, H., Yao, L., and Du, B. 2009. Genetic diversity of siderophore-producing bacteria of tobacco rhizosphere. *Braz. J. Microbiol.* 40: 276-284.
- Ulrich, K., Ulrich, A., and Ewald, D. 2008. Diversity of endophytic bacterial communities in poplar grown under field conditions. *FEMS Microbiol. Ecol.* 63: 169-180.
- Van Aken, B., Peres, C.M., Doty, S.L., Yoon, J.M., and Schnoor, J.L. 2004. *Methylobacterium populi* sp. nov., a novel aerobic, pink-pigmented, facultatively methylotrophic, methane-utilizing bacterium isolated from poplar trees (*Populus deltoides*xnigra DN34). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1191-1196.
- Vega, F.E., Pava-Ripoll, M., Posada, F., Buyer, J.S., 2005, Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. *J Basic Microbiol.* 45: 371-380.
- Vivas, A., Biró, B., Ruíz-Lozano, J.M., Barea, J.M., and Azcón, R. 2006. Two bacterial strains isolated from a Zn-polluted soil enhance plant growth and mycorrhizal efficiency under Zn-toxicity. *Chemosphere* 62: 1523-1533.
- Walker, R., Powell, A.A., Seddon, B., 1998, *Bacillus* isolates from the spermosphere of peas and dwarf French beans with antifungal activity against *Botrytis cinerea* and *Pythium* species. *J. Appl. Microbiol.* 84: 791-801.
- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., and Cole, J.R. 2007. Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. and Environ. Microbiol.* 73: 5261-5267.
- Webster, D.M., Atkin, J.D., and Cross, J.E. 1983. Bacterial blights of snap beans and their control. *Plant Dis.* 67: 935-940.
- Young, J., Kuykendall, L., Martinez-Romero, E., Kerr, A., and Sawada, H. 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 89-103.
- Young, J.M. 2004. Renaming of *Agrobacterium larrymoorei* Bouzar and Jones 2001 as *Rhizobium larrymoorei* (Bouzar and Jones 2001) comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 149-149.

Capítulo 2 - Potencial de bactérias endofíticas para o controle biológico de patógenos que infectam o feijoeiro comum.

Resumo

As bactérias endofíticas podem produzir uma série de compostos e enzimas que contribuem para a atividade de controle biológico. Neste trabalho foi avaliada a produção de sideróforos e enzimas líticas (pectinase, celulase e protease) de 158 bactérias previamente isoladas da folha de três variedades do feijoeiro comum (*Phaseous vulgaris*), bem como o potencial de antagonismo contra os fungos fitopatogênicos *Colletotrichum lindemuthianum*, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseolis*, agentes causais da antracnose, podridão-radicular e murcha-de-fusário-do-feijoeiro, respectivamente. Dentre os 158 isolados analisados, vinte isolados produziram celulase, oito produziram pectinases e 96 produzem proteases. Enzimas líticas produzidas por bactérias são capazes de degradar constituintes da parede celular de fungos, enquanto a produção de sideróforos complexa com o Fe presente no ambiente impedindo sua utilização pelo fitopatógeno. Quarenta e nove isolados apresentaram algum nível de antagonismo contra pelo menos um dos fungos analisados, dentre os quais, dois isolados do gênero *Pseudomonas* e quatro isolados do gênero *Stenotrophomonas* apresentaram forte antagonismo contra *C. lindemuthianum* e *F. oxysporum* e antagonismo moderado contra *R. solani*. Entre os 49 isolados que apresentaram algum nível de antagonismo, sete produziram celulase, um produziu pectinase, 34 produziram proteases e sete produziram sideróforos. Onze dos quarenta e nove isolados com atividade de antagonismo não apresentaram resultado positivo para as enzimas ou para a produção de sideróforos. O emprego de marcadores Box-PCR mostrou baixa diversidade entre os isolados de *Stenotrophomonas*. Os gêneros produtores de sideróforos foram *Agromyces*, *Bacillus*, *Delftia*, *Enterobacter*, *Microbacterium*, *Sporosarcina* e *Stenotrophomonas*. Este é o primeiro relato de produção de sideróforos por uma linhagem da espécie *Agromyces mediolanus*.

Palavras-chave: Bactérias endofíticas; feijoeiro comum; *Phaseolus vulgaris*, controle biológico, sideróforo, celulase, pectinase, protease.

1. Introdução

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) é uma planta importante em termos nutricionais e econômicos (Broughton et al., 2003). A associação do feijoeiro, bem como de outras leguminosas, com bactérias formadoras de nódulos em suas raízes (nodulação) é um fato bem conhecido e que tem sido muito estudado (Cocking, 2003; Martínez-Romero, 2003). No entanto, a associação do feijoeiro com bactérias endofíticas é pouco conhecida. Recentemente, López-López et al. (2010) descreveram o isolamento de mais de 50 espécies das sementes e raízes de três cultivares de *P. vulgaris*, duas plantadas na Colômbia e uma plantada no México e propuseram uma nova espécie de rizóbio denominada *Rhizobium endophyticum*.

Bactérias endofíticas podem ser definidas como microrganismos que podem ser isolados do tecido sadio de plantas desinfestadas superficialmente e que ao mesmo tempo não causam prejuízos para a planta hospedeira (Hallmann et al., 1997). Além de não causarem prejuízos aos hospedeiros, as bactérias endofíticas podem conferir alguns benefícios como promoção de crescimento (Ait Barka et al., 2002; Kang et al., 2007), controle biológico de doenças (Chen et al., 1995; Pleban et al., 1995; Coombs et al., 2004; Senthilkumar et al., 2007), de insetos (Azevedo et al., 2000) de nematoides (Hallman et al., 1998) e ainda auxiliar na recuperação de áreas poluídas (Siciliano et al. 2001; Doty, 2008).

Diversos mecanismos têm sido descritos para explicar a supressão de doenças em plantas por microrganismos como: produção de sideróforos (Buysens et al., 1996; Davison, 1998), produção de antibióticos (Davison, 1988, Fravel, 1988) e secreção de enzimas líticas. Entre as enzimas líticas produzidas por microrganismos endofíticos destacam-se as quitinases, as β -1,3-glicanases, as celulases, as lipases e as proteases, que são capazes de degradar constituintes da parede celular de fungos fitopatogênicos (Barraquio et al., 1997; Chin-A-Woeng et al., 2003; El-Tarabily, 2003). Outros tipos de enzimas produzidas por microrganismos endofíticos são as pectinases. As pectinases formam um grupo heterogêneo de enzimas que hidrolizam compostos pécnicos (Alkorta et al., 1998). Estas enzimas são classificadas com base no seu modo de ação, no qual a enzima pode atuar na cadeia da molécula de pectina pelas extremidades (exo) ou de forma aleatória (endo) no interior da cadeia. Dentre as pectinases, destacam-se aquelas

que despolimerizam a cadeia principal da pectina. Estas enzimas podem quebrar as ligações glicosídicas α -(1,4) entre os monômeros galacturônicos tanto pela hidrólise (poligalacturonases) quanto pela β -eliminação (pectina liases) (Jayani et al., 2005).

Os objetivos desse trabalho foram avaliar a capacidade de isolados endofíticos de folhas de três cultivares de feijoeiro de produzir enzimas líticas (celulase, pectinase e protease) e sideróforos e a capacidade de antagonismo *in vitro* contra fungos e bactérias fitopatogênicas.

2. Material e Métodos

2.1. Isolados

Foram utilizados os 158 isolados obtidos das folhas das variedades Talismã, Ouro Negro e Vermelho do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) descritas no Capítulo 1.

2.2. Produção de enzimas líticas

Para todos os testes foram conduzidos três experimentos independentes. Um isolado foi considerado positivo para cada parâmetro avaliado se o seu resultado foi positivo nestes três experimentos independentes.

2.2.1. Celulase

A atividade de celulase foi avaliada em meio mínimo M9 (Araújo et al., 2010) contendo 0,5 % de extrato de levedura e 1 % de carboximetilcelulose (CMC) (p/v). Após a formação das colônias, foram adicionados 10 mL do corante Vermelho Congo às placas e estas foram lavadas após 15 minutos com NaCl 5 M, segundo Teather e Wood (1982). Foram considerados positivos para produção de celulase, os isolados que apresentaram halo amarelado ou incolor ao redor da colônia.

2.2.2. Pectinase

A atividade de pectinase foi avaliada em meio mínimo M9 contendo 0,5 % de extrato de levedura e 1 % de pectina (p/v). O pH do meio foi ajustado para 8,0 e 5,0 para diferenciação entre a produção de pectato liase e poligalacturonase, respectivamente. Após o crescimento bacteriano foram adicionados 10 mL de lugol, seguido de lavagem com água. Foram consideradas positivas as colônias que apresentaram halo incolor ao redor da colônia (Araújo et al., 2010).

2.2.3. Protease

A atividade de protease, indicada pela degradação de caseína, foi determinada pela formação de halo ao redor das colônias após 3 dias de crescimento a 30 °C no meio descrito por Shin et al. (2007).

2.3. Produção de sideróforos

A produção de sideróforos foi avaliada em meio sólido MM9 (Shin et al., 2001) adicionado de solução contendo *Chrome azurol S*(CAS), Fe³⁺ e brometo de hexadecil trimetil amônio (HDTMA), conforme descrito por Silva-Stenico et al. (2005).

2.4. Teste de antibiose *in vitro*

2.4.1. Teste de antagonismo - fungos fitopatogênicos

Uma estria de 1,5 cm de largura do isolado bacteriano foi inoculada no centro de uma placa de Petri (9 cm de diâmetro) contendo o meio GPYECH (Ansari et al., 2004). Os fungos fitopatogênicos foram cultivados em meio GPYECH a 28 °C para *R. solani* e *F. oxysporum* e 22 ° para *C. lindemuthianum*. Os inóculos fúngicos para o teste *in vitro* consistiram de discos em agar (6 mm diâmetro) da margem de crescimento das colônias. Dois disco miceliais foram colocados a distância de 2 cm de ambos os lados da estria bacteriana. As placas foram incubadas a 22° C para o fungo *Colletotrichum lindemuthianum* e a 28°C para os fungos *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum*.

Todos os isolados foram avaliados em três experimentos independentes. Como controle foi inoculada uma placa sem a estria bacteriana. O antagonismo foi avaliado quando as duas colônias fúngicas do controle se encontraram. A distância entre a colônia fúngica e a estria bacteriana foi medida, sendo o antagonismo caracterizado como fraco (+) moderado (++) e forte (+++) para zonas de inibição entre 1 a 5 mm, 6 a 10 mm e >10 mm, respectivamente.

2.4.2. Teste de antagonismo - bactérias

O teste de antibiose contra bactérias foi realizado pelo protocolo descrito por Silva et al. (2008) com modificações. As bactérias foram incubadas em meio TSA 10% líquido por até 5 dias, repicadas em agar TSA 10% em quatro pontos equidistantes e incubadas a 30 °C por 48 horas. Após as colônias apresentarem crescimento evidente, as placas foram invertidas, sendo 1 mL de clorofórmio colocado em cada tampa de placa por 30 minutos. Para terminar a volatilização do clorofórmio, as placas foram entreabertas e deixadas assim por 30 minutos. Cada placa recebeu uma sobrecamada de meio TSA 10% semi-sólido, contendo 0,1 mL de uma suspensão de *Xanthomonas axonopodis* ou de *Curtobacterium flaccumfasciens* ajustada para DO600 0,5. O halo de inibição foi avaliado após a incubação por 48 h a 28 °C. Como controle positivo, foi utilizada uma linhagem de *Brevibacillus* previamente isolada em nosso laboratório e que possui atividade antimicrobiana. Para cada bactéria fitopatogênica testada, os isolados foram avaliados em três experimentos independentes.

2.5. Extração de DNA e BOX PCR

A análise de Box PCR foi realizada em 19 bactérias endofíticas do gênero *Stenotrophomonas*. A extração do DNA total dos isolados foi realizada segundo o protocolo descrito anteriormente (Capítulo 1). A amplificação foi realizada em uma reação com volume final de 25 µl contendo 1,0 µl (50 ng) de DNA total, 1,0 µl (0,4

mM) do oligonucleotídeo BOXA1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'), 1,6 µl (200,0 µM) de cada dNTP, 5,0 µl tampão Flexi[®] (PROMEGA[®]); 2,5 µl (2,5 mM) de MgCl₂ 0,2µl (1U) GoTaq[®]. Um controle negativo (mistura do PCR sem o DNA) foi incluído em todos os experimentos de PCR. As condições da reação de PCR foram as seguintes: 95 °C por 7 min., seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 3s, 92°C por 30s anelamento a 50 °C por 1 min. e extensão a 72°C por 8 min., seguida por uma extensão final a 72 °C for 8 min. Os amplicons foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v) contendo brometo de etídeo (0,2 µg/ml) em tampão TBE 1X. Como marcador, foi utilizado o 1 Kb DNA Ladder (PROMEGA[®]). O perfil de bandas foi analisado no programa Bionumerics[®], versão 6.0 (Applied Maths). A Matriz de similaridade foi construída baseada no cálculo das curvas densitométricas, utilizando-se o coeficiente de correlação de Pearson. O agrupamento foi realizado utilizando-se o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean), sendo a correlação expressa como porcentagem de similaridade. A semelhança mínima a um nível de 60% entre os isolados foi utilizada como o critério para definir os agrupamentos principais, e a similaridade de 80% foi usada para se definir uma OTU (Operational Taxonomic Unit). A qualidade dos ramos foi acessada pelo cálculo da relação cofenética.

3. Resultados

3.1. Produção de enzimas líticas

A Figura 1 apresenta o resultado dos testes de produção de enzimas líticas de alguns isolados analisados. Os resultados da produção das enzimas de todos os isolados que apresentaram antagonismo contra os fungos fitopatogênicos avaliados estão resumidos na Tabela 1. Os resultados de todos os testes realizados podem ser visualizados na Tabela Suplementar 2.

3.1.1. Celulase

Vinte isolados foram capazes de hidrolisar a carboximetilcelulose. Os gêneros cujos representantes apresentaram produção de celulase foram *Agromyces*, *Bacillus*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Rhizobium*, *Sporosarcina*, *Staphylococcus* e *Stenotrophomonas*.

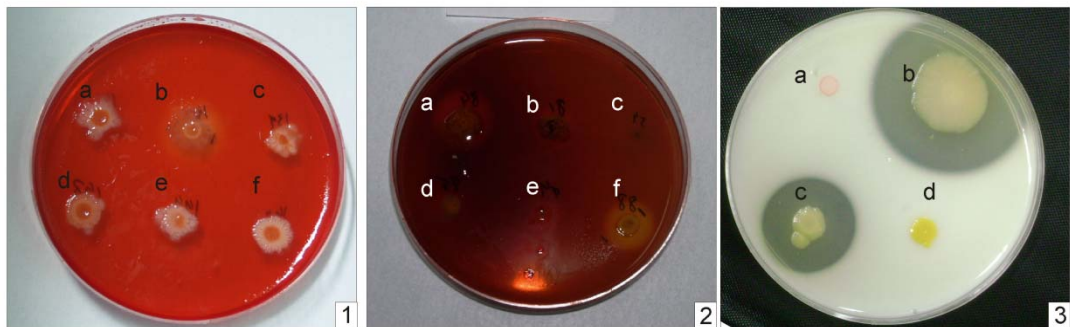


Figura 1. Testes para detecção das atividades de enzimas líticas secretadas. 1) Celulase: a. *B. thuringiensis* BAC1141 (-); b. *B. thuringiensis* BAC1140 (+); c. *E. hormaechei* BAC1139 (-); d. *S. maltophilia* BAC3148 (-), e. *Staphylococcus* sp. BAC2144 (-); f. *S. warneri* BAC2143 (-); 2) Pectinase: a. *P. cineris* BAC3084 (+); b. *B. agri* BAC3081 (+); c. *M. populi* BAC3054 (-); d. *M. phyllosphaerae* BAC1094 (-); e. *M. luteus* BAC1095 (-); f. *M. populi* BAC3088 (+); 3) Protease: a. *M. populi* BAC2028 (-); b. *S. maltophilia* BAC2031 (+); c. *M. testaceum* BAC2029 (+); d. *S. warneri* BAC2030(-)

3.1.2. Pectinases

Oito isolados foram capazes de hidrolisar a pectina adicionada ao meio M9 ajustado em pH 8, o que indica produção de pectato liase por estas bactérias. Nenhum isolado foi capaz de hidrolisar a pectina em meio ajustado em pH 5,0 o que indica produção de poligalacturonase. Os gêneros cujos representantes apresentaram produção de pectinase foram *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Delftia*, *Methylobacterium*, *Microbacterium* e *Paenibacillus*.

3.1.3. Proteases

Noventa e seis isolados apresentaram atividade de protease nas condições analisadas. Os gêneros cujos representantes apresentaram atividade de protease foram *Acinetobacter*, *Agromyces*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Delftia*, *Enterobacter*,

Frigoribacterium, *Kocuria*, *Lysinibacillus*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus*, *Sphingobacterium*, *Sphingomonas*, *Sporosarcina*, *Staphylococcus* e *Stenotrophomonas*.

3.2. Produção de sideróforos

Dezesseis isolados produziram sideróforos nas condições analisadas. A Figura 2 mostra o resultado de produção de sideróforos para alguns dos 158 isolados testados. O resultado para todos os isolados pode ser visualizado na Tabela Suplementar 2. O resultado para produção de sideróforos para os isolados com antagonismo contra os fungos fitopatogênicos analisados pode ser visualizado na Tabela 1. Os gêneros cujos representantes apresentaram produção de sideróforos foram *Agromyces*, *Bacillus*, *Delftia*, *Enterobacter*, *Kocuria*, *Microbacterium*, *Sporosarcina*, *Staphylococcus* e *Stenotrophomonas*.

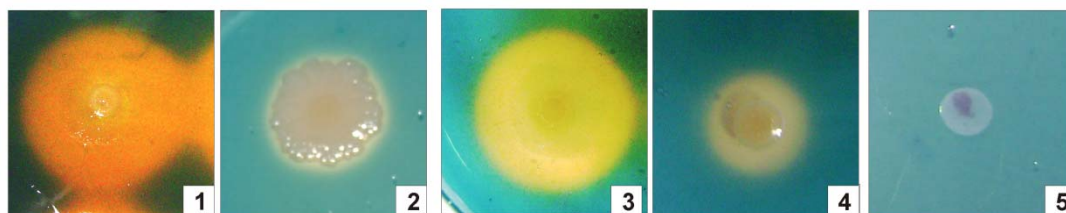


Figura 2. Produção de sideróforo: 1 a 4 mostram resultados considerados positivos, 5. mostra o resultado negativo. 1 *M. testaceum* strain BAC1099; 2. *B. subtilis* strain BAC2078; 3. *S. warneri* strain BAC1152; 4. *D. tsuruhatensis* strain BAC3159; 5. *M. testaceum* strain BAC2079.

3.3. Teste de antagonismo *in vitro*

3.3.1. Fungos fitopatogênicos

Os resultados dos testes de antagonismos contra os três fungos fitopatogênicos avaliados estão resumidos na Tabela 1. Quarenta e nove isolados apresentaram algum nível de antagonismo contra os três fungos avaliados. Entre eles, quarenta e cinco apresentaram algum nível de antagonismo contra *C. lindemuthianum*, sete apresentaram algum nível de antagonismo contra *R. solani* e onze apresentaram algum nível de

antagonismo contra *F. oxysporum*. Vinte e seis, onze e oito isolados apresentaram, respectivamente, antagonismo fraco (+), moderado (++) e forte (+++) contra *C. lindemuthianum*. Contra *R. solani*, dois isolados apresentaram antagonismo fraco (+) e cinco apresentaram antagonismo moderado (++)). Contra *F. oxysporum*, três, um e sete isolados apresentaram antagonismo fraco (+), moderado (++) e forte (+++), respectivamente. A análise de enzimas líticas e da produção de sideróforos dos isolados que apresentaram antagonismo contra os fungos fitopatogênicos mostra que sete são produtores de celulase, dois são produtores de pectinase, 34 são produtores de proteases e sete são produtores de sideróforos. Onze, dos 49 isolados com atividade de antagonismo, não apresentaram resultado positivo para as enzimas ou para a produção de sideróforos. A Figura 3 apresenta o resultado dos testes de antagonismo para alguns isolados.

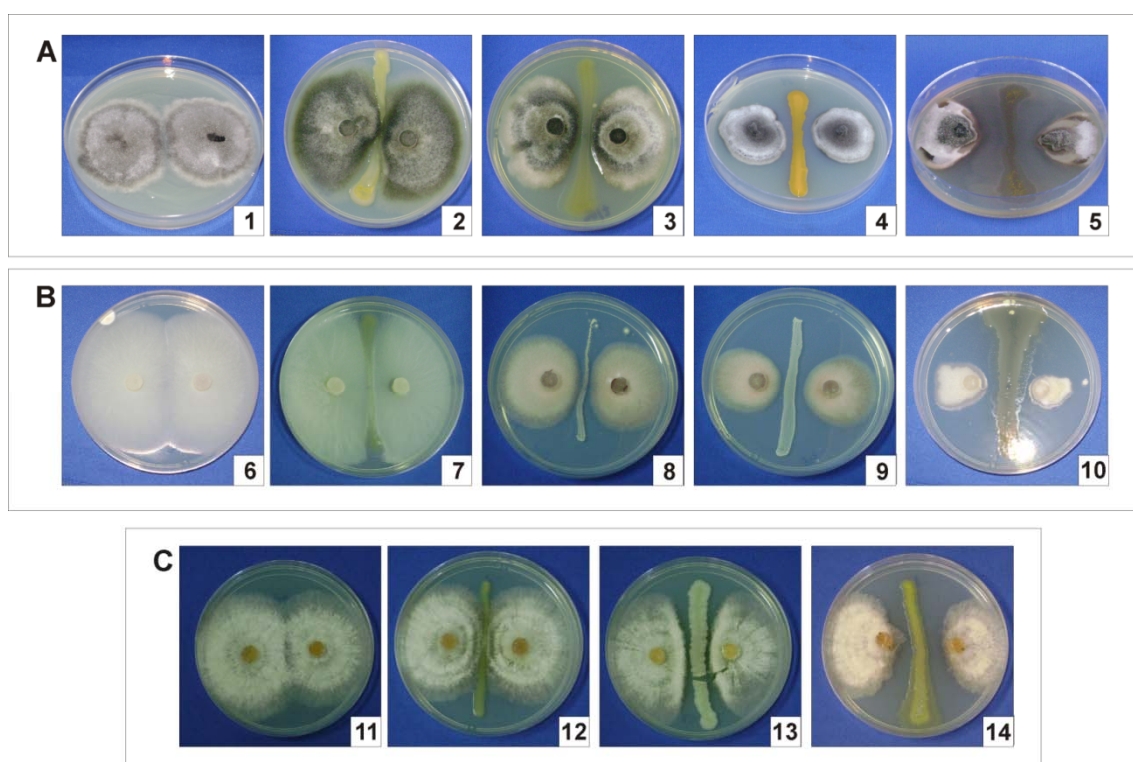


Figura 3. Teste de antagonismo contra fungo fitopatogênicos: **A)** *Colletotrichum lindemuthianum*: 1. Controle sem o inóculo, 2. *R. larrymoorei* strain BAC2142 (-), 3. *M. testaceum* strain BAC2153 (+), 4. *M. testaceum* strain BAC1019 (++), 5. *S. maltophilia* strain BAC2128 (+++); **B)** *Fusarium oxysporum*, 6. Controle sem o inóculo, 7. *S. maltophiliontrole* strain BAC1136 (-), 8. *P. aeruginosa* strain BAC1137 (+), 9. *S. warneri* strain BAC3089 (++), 10. *S. maltophilia* strain BAC2134 (+++); **C)** *Rhizoctonia solani*: 11. Controle sem inóculo, 12. *B. agri* strain BAC2027 (-), 13. *M. testaceum* strain BAC1092 (+), 14 - *P. aeruginosa* strain BAC3111 (++)

Tabela 1. Isolados com antagonismo contra os três fungos fitopatogênicos testados e suas características enzimáticas e metabólicas avaliadas *in vitro*.

Isolado	Número de acesso	Antagonismo <i>in vitro</i> †			Enzimas líticas††			Metabolito††
		<i>C. lindemuthianum</i>	<i>R.solani</i>	<i>F. oxysporum</i>	Celulase	Pectinase†††	Protease	Sideróforo
<i>Acinetobacter radioresistens strain</i> BAC3058	HM355649	+	-	-	-	-	-	-
<i>Acinetobacter sp. strain</i> BAC3057	HM355648	+	-	-	-	-	+	-
<i>Agromyces mediolanus strain</i> BAC2129	HM355718	+++	-	-	+	-	+	+
<i>Agromyces mediolanus strain</i> BAC3124	HM355713	+	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus muralis strain</i> BAC1096	HM355685	+	-	+++	-	-	-	-
<i>Bacillus sp. strain</i> BAC2106	HM355695	++	-	-	-	-	+	-
<i>Bacillus thuringiensis strain</i> BAC1140	HM355729	+	-	-	+	-	+	+
<i>Brevibacillus agri strain</i> BAC2027	HM355618	++	-	-	-	-	-	-
<i>Delftia tsuruhatensis strain</i> BAC1156	HM355744	+	-	-	-	-	+	-
<i>Delftia tsuruhatensis strain</i> BAC3159	HM355747	+++	-	-	-	+	-	+
<i>Enterobacter hormaechei strain</i> BAC1139	HM355728	-	-	+	-	-	-	+
<i>Kocuria palustris strain</i> BAC1098	HM355687	+	-	-	-	-	+	-
<i>Microbacterium foliorum strain</i> BAC3043	HM355634	++	-	-	-	-	-	-
<i>Microbacterium phyllosphaerae strain</i> BAC3050	HM355641	++	-	-	-	-	+	-
<i>Microbacterium testaceum strain</i> BAC1006	HM355597	+	-	-	-	-	-	-
<i>Microbacterium testaceum strain</i> BAC1008	HM355599	+	-	-	-	-	+	-
<i>Microbacterium testaceum strain</i> BAC1018	HM355609	+	-	-	-	-	+	+
<i>Microbacterium testaceum strain</i> BAC1019	HM355610	++	-	-	-	-	-	-
<i>Microbacterium testaceum strain</i> BAC1092	HM355681	++	+	-	-	-	+	-
<i>Microbacterium testaceum strain</i> BAC1093	HM355682	+	-	-	-	-	-	-
<i>Microbacterium testaceum strain</i> BAC1099	HM355688	+	-	-	-	-	-	-
<i>Microbacterium testaceum strain</i> BAC2126	HM355715	+	-	-	-	-	-	-
<i>Microbacterium testaceum strain</i> BAC2153	HM355741	+	-	-	-	-	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa strain</i> BAC1137	HM355726	-	-	+	-	-	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa strain</i> BAC3111	HM355700	+++	++	+++	-	-	+	-

Tabela 1 (cont.)

Isolado	Número de acesso	Antagonismo <i>in vitro</i> †			Celulase	Enzimas líticas††		Metabolito††	
		<i>C. lindemuthianum</i>	<i>R.solani</i>	<i>F. oxysporum</i>		Pectinase†††	Protease	Sideróforo	
<i>Pseudomonas aeruginosa strain</i> BAC3115	HM355704	+++	+	+++	-	-	+	-	
<i>Rhizobium larrymoorei strain</i> BAC1011	HM355602	+	-	-	-	-	+	-	
<i>Rhizobium larrymoorei strain</i> BAC2142	HM355731	-	-	+	-	-	+	-	
<i>Sphingobacterium multivorum strain</i> BAC3045	HM355636	+	-	-	-	-	+	-	
<i>Staphylococcus caprae strain</i> BAC2039	HM355630	+	-	-	-	-	+	-	
<i>Staphylococcus epidermidis strain</i> BAC1016	HM355607	+	-	-	-	-	+	-	
<i>Staphylococcus epidermidis strain</i> BAC2131	HM355720	++	-	-	-	-	+	-	
<i>Staphylococcus warneri strain</i> BAC2030	HM355621	+	-	-	-	-	-	+	
<i>Staphylococcus warneri strain</i> BAC3089	HM355678	-	-	++	-	-	+	-	
<i>Staphylococcus warneri strain</i> BAC3112	HM355701	+	-	-	-	-	+	-	
<i>Stenotrophomonas maltophilia strain</i> BAC1012	HM355603	+	-	-	-	-	-	-	
<i>Stenotrophomonas maltophilia strain</i> BAC1136	HM355725	+	-	-	-	-	+	-	
<i>Stenotrophomonas maltophilia strain</i> BAC2024	HM355615	+	-	-	-	-	+	-	
<i>Stenotrophomonas maltophilia strain</i> BAC2031	HM355622	++	-	-	-	-	+	-	
<i>Stenotrophomonas maltophilia strain</i> BAC2127	HM355716	++	-	-	+	-	+	-	
<i>Stenotrophomonas maltophilia strain</i> BAC2128	HM355717	+++	++	+++	+	-	+	-	
<i>Stenotrophomonas maltophilia strain</i> BAC2134	HM355723	+++	++	+++	+	-	+	-	
<i>Stenotrophomonas maltophilia strain</i> BAC2135	HM355724	+++	++	+++	+	-	+	-	
<i>Stenotrophomonas maltophilia strain</i> BAC3052	HM355643	+	-	-	-	-	+	-	
<i>Stenotrophomonas maltophilia strain</i> BAC3121	HM355710	++	-	-	-	-	+	-	
<i>Stenotrophomonas maltophilia strain</i> BAC3123	HM355712	++	-	-	-	-	+	-	
<i>Stenotrophomonas maltophilia strain</i> BAC3148	HM355736	+	-	-	-	-	+	-	
<i>Stenotrophomonas maltophilia strain</i> BAC3149	HM355737	+	-	-	-	-	-	+	
<i>Stenotrophomonas sp. strain</i> BAC3120	HM355709	+++	++	+++	+	-	+	-	

† + zona de inibição entre 1 a 5 mm; ++ zona de inibição entre 6 a 10 mm; +++ zona de inibição > 10 mm; ††: + produziu a enzima/metabólito; - não produziu a enzima ou metabólito; ††† resultados positivos de produção de pectinase em pH 8,0 (pectato liase).

3.3.2. Bactérias

Nenhum dos isolados testados apresentou halo de inibição contra as duas bactérias fitopatogênicas testadas, nas condições analisadas.

3.4. Avaliação do perfil de marcadores Box PCR

Quatorze dos 19 isolados do gênero *Stenotrophomonas* apresentaram algum nível de antagonismo contra os fungos avaliados e, entre eles, três isolados são particularmente promissores para o emprego em biocontrole. Foi realizada a caracterização destes isolados baseada em marcadores BOX PCR (Figura 4).

O dendrograma obtido a partir do BOX-PCR apresentou quatro OTUs (*Operation taxonomic units*) considerando o ponto de corte de 80 %. A primeira OTU foi composta por dois, três e sete isolados das cultivares Talismã, Ouro Nero e Vermelhinho, respectivamente. Dentre estes isolados, incluem-se isolados que não apresentaram antagonismo contra os fungos avaliados e isolados que apresentaram antagonismo leve a moderado contra apenas *C. lindemuthianum*. A segunda OTU foi composta por um único isolado da cultivar Vermelhinho, que apresentou antagonismo leve apenas contra *C. lindemuthianum*. A terceira OTU se agrupou com mais de 94 % de similaridade aos quatro isolados do gênero *Stenotrophomonas* mais promissores no teste de antagonismo (antagonismo forte contra *C. lindemuthianum* e *F. oxysporum* e antagonismo moderado contra *R. solani*). Dos isolados agrupados na OTU 3, *Stenotrophomonas* sp. strain BAC3120 foi isolado da cultivar Vermelhinho enquanto os demais foram isolados da cultivar Ouro Negro. A quarta OTU possui apenas o isolado *S. maltophilia* strain BAC2160, obtido da cultivar Ouro Negro, que não apresentou antagonismo contra os fungos estudados neste trabalho.

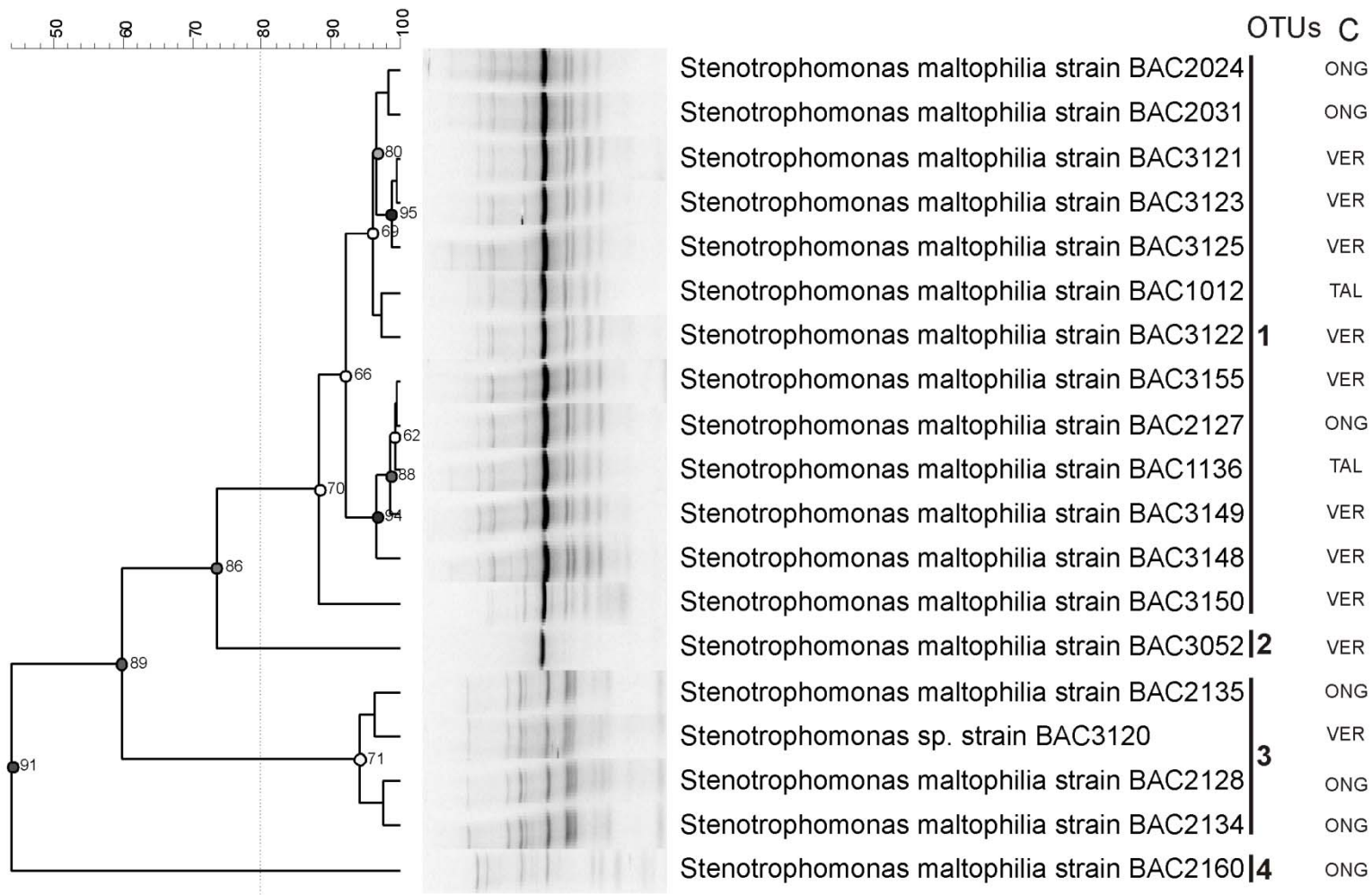


Figura 4. UPGMA dendrograma gerado a partir do fingerprinting das bandas obtidas por BOX-PCR de 19 isolados endofíticos do gênero *Stenotrophomonas*. Os números, indicados em cada ramo, correspondem aos valores encontrados no cálculo da correlação cofenética que foram diferentes de 1.0 (qualidade dos ramos). C = Cultivar; ONG = Ouro Negro; TAL = talismã; VER = Vermelhinho.

4. Discussão

Entre as 158 bactérias endofíticas de feijoeiro foram encontrados oito isolados capazes de inibir fortemente o fungo fitopatogênico *C. lindemuthianum*: dois são produtores de sideróforos, sete são produtores de proteases e cinco são produtores de celulases. Em microrganismos, a capacidade de produção de enzimas, antibióticos, sideróforos e outros produtos de interesse são linhagem específica. Um exemplo claro disto pode ser visualizado na Tabela 1, em que isolados da mesma espécie além de apresentaram diferentes graus de antagonismo contra *C. lindemuthianum*, também variaram quanto à produção de celulase, pectinase e sideróforos. Esses isolados serão futuramente testados para avaliar o controle de *C. lindemuthianum* em plantas de feijoeiro, um dos principais patógenos dessa cultura.

Apesar de a produção de sideróforos por bactérias ser apontada como um dos mecanismos envolvidos no controle biológico de fitopatógenos, (Buysens et al., 1996; Davison, 1998), nem todo isolado positivo para a produção deste metabólito apresentou algum nível de antagonismo contra os fungos fitopatogênicos avaliados. Dos 16 isolados que produzem sideróforo, seis apresentaram antagonismo contra *C. lindemuthianum*, porém é preciso ter cautela para propor que o mecanismo de antagonismo destas bactérias seja devido à produção deste metabólito. Na literatura, por exemplo, foi relatado que linhagens mutantes para a produção de sideróforos de *Pseudomonas putida* apresentam o mesmo nível de biocontrole que o tipo selvagem no tombamento de mudas de pepino (Paulitz & Loper, 1991).

Entre os isolados que apresentaram antagonismo contra os três fungos fitopatogênicos analisados, os mais promissores pertencem aos gêneros *Stenotrophomonas* e *Pseudomonas*. Nenhum destes isolados apresentou produção de sideróforos, embora bactérias do gênero *Pseudomonas* sejam comumente relatadas

como produtoras destes compostos (Hamdan et al. 1999; Jagadeesh et al., 2001; Chaiharn et al., 2009).

Bactérias dos gêneros *Delftia* e *Stenotrophomonas*, isoladas da rizosfera de tabaco, bem como bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Microbacterium* e *Sporosarcina* isoladas de *Saccharum ravennae* e uma bactéria endofítica pertencente ao gênero *Enterobacter*, isolada de *Allium macrostemon*, foram reportadas como produtoras de sideróforos (Sheng et al., 2008; Rau et al. 2009; Tian et al., 2009). Este é o primeiro relato de produção de sideróforos por uma linhagem da espécie *Agromyces mediolanus* (BAC2129). No entanto, com base nos resultados obtidos, não se pode considerar produção de sideróforos como único parâmetro para a triagem de bactérias promissoras para o controle biológico.

Algumas enzimas líticas produzidas por bactérias podem ser capazes de degradar constituintes das paredes de fungos, levando-os à morte. As quitinases, e em alguns casos as celulases desempenham papel importante na degradação das paredes celulares de fungos (Mitchell & Alexandre, 1963). A produção de protease (Dunne et al., 1997; 1998) e celulase (Chatterjee et al., 1995) como mecanismos de supressão de doenças de plantas é outro importante mecanismo de biocontrole. Dos oito isolados que inibiram fortemente *C. lindenuthianum*, seis também foram capazes de inibir fortemente *F. oxysporum* e são produtores de proteases. Destes, dois pertencem ao gênero *Pseudomonas* e quatro pertencem ao gênero *Stenotrophomonas*. Todos os quatro isolados de *Stenotrophomonas* (*Stenotrophomonas* sp. strain BAC3120; *S. maltophilia* strain BAC2128; *S. maltophilia* strain BAC2134, *S. maltophilia* strain BAC2135) são produtores de protease e celulase. *Stenotrophomonas maltophilia* Strain C3 foi relatada como agente no controle biológico de *Bipolaris sorokiniana* em gramínea (Zhang and Yuen, 1999), e *Stenotrophomonas maltophilia* W81 no controle do fitopatógeno

Pythium ultimum, sendo apontada a atividade proteolítica como um dos mecanismos de biocontrole (Dunne et al. 1997). Além disso, a atividade de celulase foi reportada como mecanismo de controle biológico em *Pseudomonas* (Fridlender et al., 1993).

A produção de celulase e pectinase por microrganismos endofíticos é vista como um mecanismo para auxiliar à colonização da planta hospedeira. Este tipo de penetração ativa em vez do acesso às plantas pelas aberturas naturais ou feridas que ocorrem durante o crescimento da planta, pode ser capaz de ativar a resistência sistêmica do hospedeiro, o que é considerado outro mecanismo de ação dos agentes de controle biológico (Hallmann et al., 1997). Reinhold-Hurek et al. (2006) demonstraram que uma linhagem endofítica de *Azoarcus* sp. isolada de arroz produz uma endoglucanase que permite a entrada ativa deste endofítico na planta hospedeira. Apesar de *Azoarcus* sp. degradar a parede do hospedeiro, ela é incapaz de utilizar os produtos da degradação desta endoglucanase para seu crescimento. Esta incapacidade de usar os produtos de degradação da celulose provavelmente é uma das características que diferenciam microrganismos endofíticos de patogênicos. Este mecanismo de entrada ativa e indução sistêmica de mecanismos de resistência na planta hospedeira devendo ser investigados para os isolados do gênero *Stenotrophomonas* que apresentaram potencial no controle dos fitopatógenos avaliados.

Como quatro isolados do gênero *Stenotrophomonas* foram os mais promissores no teste de antagonismo, foi realizada a análise de diversidade dos dezoito isolados deste gênero. A técnica de BOX-PCR foi escolhida por ser uma técnica rápida, de fácil execução e baixo custo, além de possuir uma alta capacidade discriminativa em nível de subespécie (Olive & Bean, 1999), produzindo resultados semelhantes àqueles obtidos pelas análises de pareamento DNA-DNA (Rademaker et al., 2000). Na análise dos perfis de BOX-PCR utilizou-se um protocolo baseado em curvas, que são mais

informativas do que somente o número e posição dos fragmentos no gel (Hane et al., 1993; Yang et al., 2004). Neste trabalho, a diversidade genética dos 19 isolados por Box-PCR permitiu agrupá-los em quatro diferentes OTUs. Os quatro isolados bacterianos do gênero *Stenotrophomonas* que apresentaram melhor resultado de antagonismo, agruparam-se formando a OTU 3, indicando que são da mesma subespécie. Adicionado a isso, estes isolados apresentaram o mesmo resultado para produção das enzimas líticas avaliadas e para a produção de sideróforo. Desta forma, os estudos futuros sobre antagonismos contra fungos fitopatogênicos podem ser realizados com apenas um destes quatro isolados. Embora *Stenotrophomonas* spp. seja ubiqüitária no ambiente, o solo e as plantas são o principal reservatório. Membros deste gênero possuem um papel ecológico importante nos ciclos do nitrogênio e do enxofre, e diversas espécies são benéficas para plantas. A espécie *S. maltophilia* também é um patógeno humano emergente responsável por infecções principalmente em imunocomprometidos. Nenhuma espécie do gênero *Stenotrophomonas* foi reportada como fitopatogênica (Ryan et al., 2009). Devido ao fato de *S. maltophilia* ser um patógeno oportunista e aliado ao fato de este gênero apresentar resistência a vários antibióticos comumente utilizados, o emprego destas bactérias no controle biológico deve ser cuidadosamente considerado.

Em resumo, o presente estudo permitiu evidenciar o potencial de alguns isolados endofíticos das folhas de *P. vulgaris* no controle biológico de fungos fitopatogênicos que acometem o feijoeiro. Futuramente estudos de antagonismo *in planta* e de outros possíveis mecanismos envolvidos no controle biológico permitirão uma melhor compreensão da interação destas bactérias com os fungos fitopatogênicos e, eventualmente, o desenvolvimento de um produto para controle biológico de algumas doenças que acometem o feijoeiro. Os resultados mostraram também que os isolados

endofíticos são produtores de enzimas líticas e sideróforos. As enzimas líticas avaliadas, além de possuírem papel no antagonismo dos fungos, poderão ser avaliadas futuramente quanto ao seu potencial para aplicações biotecnológicas.

5. Referências

- Ait Barka E., Gognies S., Nowak J., Audran J.C., Belarbi, A., (2002) Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. *Biol Contr* 24: 135-142.
- Alkorta, I., Garbisu, C., Llama, M.J., Serra, J.L., (1998) Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochem* 33: 21-28.
- Ansari K.I., Palacios N., Araya C, Langin T, Egan D., Doohan F.M., (2004) Pathogenic and genetic variability among *Colletotrichum lindemuthianum* isolates of different geographic origins. *Plant Pathol* 53: 635-642.
- Araújo, W.L., Lacava, P.T., Marcon, J., Lima, A.O.S., Kuklinsky-Sobral, J., Pizzirani-Kleiner, A.A., Azevedo, J.L., (2010) Guia prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos. CALO, Piracicaba, 117 p.
- Azevedo J.L., Maccheroni Jr. W., Pereira J. O., Araújo W.L. (2000) Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electron J Biotechnol* 3: 40-65.
- Barraquio W. L., Revilla L., Ladha J. K., (1997) Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. *Plant Soil* 194: 15-24.
- Broughton W.J., Hernández G., Blair M., Beebe S., Gepts P., Vanderleyden J., (2003) Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. *Plant Soil* 252: 55-128.
- Buysens S., Heungens K., Poppe J., Hofte, M., (1996) Involvement of pyochelin and pyoverdine in suppression of *Pythium*-induced damping-off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. *Appl Environ Microbiol* 62: 865-871.
- Chen C., Bauske E. M., Musson G., Rodriguezkabana, R., Kloepper J. W., (1995) Biological control of *Fusarium* Wilt on cotton by use of endophytic bacteria. *Biol Contr* 5: 83-91.
- Chin-A-Woeng, T.F.C., Bloemberg, G.V., Lugtenberg, B.J.J., (2003) Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. *New Phytol* 157: 503-523.

- Cocking E.C. (2003) Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. *Plant Soil* 252: 169-175.
- Coombs J.T., Michelsen P.P., Franco, C.M.M., (2004) Evaluation of endophytic actinobacteria as antagonists of *Gaeumannomyces graminis* var. tritici in wheat. *Biol Contr* 29: 359-366.
- Davison, J., (1988) Plant Beneficial Bacteria. *Nat Biotech* 6: 282-286.
- Doty S. L., (2008) Enhancing phytoremediation through the use of transgenics and endophytes. *New Phytol* 179: 318-333.
- Dunne, C., Crowley, J.J., Moenne-Loccoz, Y., Dowling, D.N., Bruijn, F.J., O'Gara, F., (1997) Biological control of *Pythium ultimum* by *Stenotrophomonas maltophilia* W81 is mediated by an extracellular proteolytic activity. *Microbiology* 143: 3921-3931.
- Dunne, C., Moëne-Loccoz, Y., McCarthy, J., Higgins, P., Powell, J., Dowling, D.N., O'Gara, F., (1998) Combining proteolytic and phloroglucinol-producing bacteria for improved biocontrol of *Pythium*-mediated damping-off of sugar beet. *Plant Pathol* 47: 299-307.
- El-Tarabily K. A., (2003) An endophytic chitinase-producing isolate of *Actinoplanes missouriensis*, with potential for biological control of root rot of lupin caused by *Plectosporium tabacinum*. *Aust J Bot* 51: 257-266.
- Fravel D. R., (1988) Role of antibiosis in the biocontrol of plant disease. *Ann. Rev Phytopathol* 26: 75-91.
- Fridlender, M., Inbar, J., Chet, I., (1993) Biological control of soilborne plant pathogens by a β -1,3 glucanase-producing *Pseudomonas cepacia*. *Soil Biol Biochem* 25: 1211-1221.
- Hallmann J., QuadtHallmann A., Mahaffee W. F., Kloepper J. W., (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can J Microbiol* 43: 895-914.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Rodriguez-Kábana R., Kloepper J. W., (1998) Interactions between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in cotton and cucumber. *Soil Biol Biochem* 30: 925-937.
- Häne, B.G., Jäger, K., Drexler, H.G., (1993), The Pearson product-moment correlation coefficient is better suited for identification of DNA fingerprint profiles than band matching algorithms. *Electrophoresis* 14: 967-972.
- Jayani, R.S., Saxena, S., Gupta, R., (2005) Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochem* 40: 2931-2944.

- Kang, S. H., Cho, H. S., Cheong, H., Ryu, C. M., Kim, J. F., Park, S. H. (2007) Two bacterial endophytes eliciting both plant growth promotion and plant defense on pepper (*Capsicum annuum* L.). *J Microbiol Biotechnol* 17: 96-103.
- López-López, A., Rogel, M. A., Ormeño-Orrillo, E., Martínez-Romero, J., Martínez-Romero, E., (2010) *Phaseolus vulgaris* seed-borne endophytic community with novel bacterial species such as *Rhizobium endophyticum* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* 33: 322-327.
- Martínez-Romero, E., (2003) Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. *Plant Soil* 252: 11-23.
- Mitchell, R., Alexander, M., (1963) Lysis of soil fungi by bacteria. *Can J Microbiol* 9: 168-177.
- Olive, D.M., Bean, P., (1999) Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* 37: 1661-1669.
- Pleban, S., Ingel, F., Chet, I., (1995) Control of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* in the greenhouse using endophytic *Bacillus* spp. *Eur J Plant Pathol* 101: 665-672.
- Paulitz, T.C, Loper, J.E., (1991) Lack of a role for fluorescent siderophore production in the biological control of *Pythium* damping-off of cucumber by a strain of *Pseudomonas putida*. *Phytopathology* 81: 930-935.
- Rademaker, J.L.W., Hoste, B., Louws, F.J., Kersters, K., Swings, J., Vauterin, L., Vauterin, P., de Bruijn, F.J., (2000) Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *Int J Syst Evol Microbiol* 50: 665-677.
- Rau, N., Mishra, V., Sharma, M., Das, M. K., Ahaluwalia, K., Sharma, R. S., (2009) Evaluation of functional diversity in rhizobacterial taxa of a wild grass (*Saccharum ravennae*) colonizing abandoned fly ash dumps in Delhi urban ecosystem. *Soil Biol Biochem* 41: 813-821.
- Reinhold-Hurek, B., Maes, T., Gemmer, S., Van Montagu, M. Hurek, T., (2006) An endoglucanase is involved in infection of rice roots by the not-cellulose-metabolizing endophyte *Azoarcus* sp. Strain BH72. *Mol. Plant Microbe Interact* 19: 181-188.
- Ryan, R.P., Monchy, S., Cardinale, M., Taghavi, S., Crossman, L., Avison, M.B., Berg, G., van der Lelie, D., Dow, J.M., (2009) The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nat Rev Micro* 7: 514-525.

- Senthilkumar, M., Govindasamy, V., Annapurna, K., (2007) Role of antibiosis in suppression of charcoal rot disease by soybean endophyte *Paenibacillus* sp. HKA-15. *Curr Microbiol* 55: 25-29.
- Sheng, X., Chen, X., He, L., (2008) Characteristics of an endophytic pyrene-degrading bacterium of *Enterobacter* sp. 12J1 from *Allium macrostemon* Bunge. *Int Biodeterior Biodegradation* 62: 88-95.
- Shin, S.H., Lim, Y., Lee, S. E., Yang, N. W., Rhee, J. H., (2001) CAS agar diffusion assay for the measurement of siderophores in biological fluids. *J Microbiol Methods* 44: 89-95.
- Shin D.S., Park., M.S., Jung, S., Lee, M.S., Lee, K. H., Bae, K. S., Kim, S. B. (2007) Plant growth-promoting potential of endophytic bacteria isolated from roots of coastal sand dune plants. *J Microbiol Biotechnol* 17: 1361-1368.
- Siciliano, S. D., Fortin, N., Mihoc, A., Wisse, G., Labelle, S., Beaumier, D., Ouellette, D., Roy, R., Whyte, L. G., Banks, M. K., Schwab, P., Lee, K., Greer, C.W., (2001) Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination. *Appl Environ Microbiol* 67: 2469-2475.
- Silva, J. R. C., Souza, R. M., Zacarone, A. B., Silva, L. H. C. P., Castro, A. M. S., (2008) Bactérias endofíticas no controle e inibição in vitro de *Pseudomonas syringae* pv tomato, agente da pinta bacteriana do tomateiro. *Ciênc agrotec* 32: 1062-1072.
- Silva-Stenico, M. E., Pacheco, F. T. H., Rodrigues, J. L. M., Carrilho, E., Tsai, S. M., (2005) Growth and siderophore production of *Xylella fastidiosa* under iron-limited conditions. *Microbiol Res* 160: 429-436.
- Teather, R.M., Wood, P.J., (1982) Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl Environ Microbiol* 43: 777-780.
- Tian, F., Ding, Y., Zhu, H., Yao, L., Du, B., (2009) Genetic diversity of siderophore-producing bacteria of tobacco rhizosphere. *Braz J Microbiol* 40: 276-284.
- Yang, H., Vinopal, R.T., Grasso, D., Smets, B.F., (2004) High diversity among environmental *Escherichia coli* isolates from a bovine feedlot. *Appl Environ Microbiol* 70: 1528-1536.
- Zhang, Z., Yuen, G.Y., (1999) Biological control. of *Bipolaris sorokiniana* on Tall Fescue by *Stenotrophomonas maltophilia* Strain C3. *Phytopathology* 89: 817-822.

**Capítulo 3 - Caracterização da Atividade de Fitase de Bactérias
Endofíticas de *Phaseolus vulgaris***

Resumo

O fitato está amplamente distribuído na natureza, e quando presente no solo, pode ser lixiviado para corpos de água, causando impactos ambientais, como a eutrofização. Quando presente na dieta de animais monogástricos, além de não ser hidrolisado, atua como anti-nutriente, complexando íons metálicos divalentes. O fitato também está presente nas sementes dos cereais e de leguminosas, sendo a primeira fonte de fósforo para a planta. Por estas e outras razões, as fitases são enzimas que possuem grande potencial para aplicações biotecnológicas. O total de 158 bactérias originalmente isoladas das folhas do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) foram avaliadas quanto à capacidade de secretar fitases em meio sólido. Dentre 45 isolados positivos, quatro isolados endofíticos pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Microbacterium* e *Rhodococcus* se destacaram. Os gêneros dos outros isolados produtores de fitase foram *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Delftia*, *Enterobacter*, *Methylobacterium*, *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Rhizobium*, *Sphingobacterium* e *Staphylococcus*. A atividade de fosfatase foi observada com outros substratos como ATP, ADP, pirofosfato e β -glicerofosfato, porém foi detectada maior atividade em presença de fitato. Além dessa característica incomum para fitases bacterianas, outra característica incomum foi a presença de mais de um pH ótimo de atividade apresentado por três dos quatro sobrenadantes avaliados. Este é o primeiro relato de produção de fitase por bactérias dos gêneros *Rhodococcus* e *Microbacterium*.

Palavras-chave: bactérias endofíticas; feijoeiro; fitase.

1. Introdução

O ácido fítico (mio-inositol hexafosfato) e a mistura de sais catiônicos do ácido fítico, que são designados de forma geral como fitatos, são um grupo de compostos orgânicos fosfatados amplamente distribuídos na natureza. O fitato é a principal forma de fósforo presente nos grãos de leguminosas como o feijoeiro (Coelho et al., 2002). Além disso, estima-se que do fósforo orgânico do solo, 30 a 50 % se apresentam na forma de fitato (Turner et al., 2003). O fitato presente no solo, principalmente dos solos próximos a corpos de água, pode ser lixiviado causando impactos nos corpos de água como a eutrofização (Turner & Haygarth, 2000). Outro ponto importante é o fitato presente na dieta de animais, visto que atua como um fator anti-nutricional complexando cátions metálicos divalentes como Zn^{2+} , $Fe^{2+/3+}$, Ca^{2+} , Mg^{+2} , Mn^{2+} e Cu^{2+} , prevenindo a absorção de minerais no trato digestivo de animais (Urbano et al., 2000). Animais monogástricos, como os suínos e as aves domésticas, são incapazes de degradar o fitato presente no alimento (Schroder et al., 1996), sendo assim, 70 % do P adicionado nas dietas de animais monogástricos é excretado para o ambiente. Esta excreção de grande quantidade de P no ambiente cria um impacto ambiental nas grandes áreas produtivas (Turner et al., 2002).

Neste contexto, as enzimas capazes de hidrolisar o fitato, conhecidas como fitases, são de grande interesse para aplicações em processos industriais de preparação de rações para suínos e aves e possuem grande potencial para tratamentos de impactos ambientais. As fitases podem ser obtidas de diferentes fontes como as plantas, os animais e os microrganismos (Konietzny & Greiner, 2002; Vohra & Satyanarayana 2003).

Existem basicamente dois tipos de fitases, as fitases ácidas, com pH ótimo em torno de 5,0, e as fitases alcalinas, com pH ótimo em torno de 8,0 (Konietzny &

Greiner, 2002). A maioria das fitases microbianas descritas na literatura pertence às fitases do tipo ácido e seu pH ótimo se encontra na faixa de pH entre 4,0 a 5,5. Algumas fitases bacterianas, como as produzidas por *Escherichia coli* e *Citrobacter braakii*, são mais resistentes a proteases como pepsina e pancreatina do que as fitases fúngicas produzidas por *Aspergillus niger* (Rodriguez et al., 1999; Kim et al., 2003). Esta resistência a proteases apresentada pelas enzimas bacterianas é uma característica de grande interesse para aplicações industriais destas enzimas.

López-López et al. (2010) relataram atividade de fitase em bactérias endofíticas isoladas da semente e raízes do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*). Os microrganismos endofíticos, ou seja, aqueles que podem ser isolados do tecido sadio de plantas desinfestadas superficialmente, e que ao mesmo tempo não causam prejuízos para a planta hospedeira (Hallmann et al., 1997), são considerados novas fontes promissoras de diversos compostos como antibióticos, antioxidantes, antitumorais e enzimas (Strobel & Daisy, 2003). Especula-se que a capacidade de fitase de bactérias endofíticas presentes na semente auxilie a planta a utilizar o fitato presente na semente (López-López et al. 2010). Desta forma, microrganismos endofíticos são fontes promissoras para a busca de fitases com novas características desejáveis para diversas aplicações. Sendo assim, objetivou-se com este trabalho realizar uma triagem das bactérias endofíticas previamente isolados das folhas de três variedades do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) quanto à capacidade de produção de fitase e verificar o potencial das fitases produzidas pelos isolados mais promissores.

2. Material e Métodos

2.1. Isolados

Para a triagem inicial foram utilizados os 158 isolados bacterianos endofíticos obtidos das folhas das três variedades Talismã, Ouro Negro e Vermelho do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) identificados e descritos no Capítulo 1.

2.2. Triagem dos isolados para a produção de fitase

As bactérias foram ativadas em 10 mL de meio TSA 10 % (Araujo et al., 2002) a 28 °C a 150 rpm por 48 a 72 horas. Cada isolado foi inoculado em placas contendo o meio de cultivo para triagem utilizado por Kim et al. (1998). A capacidade de solubilização de fitato foi avaliada pela formação de halo de hidrólise de fitato ao redor da colônia, avaliado após 48 h e 96 h de incubação. Foram selecionados quatro isolados, baseados nos dois maiores produtores de hidrólise de fitato após 48 h e 96 h de incubação.

2.3. Avaliação da atividade de Fitase

2.3.1. Condições de cultivo

As culturas bacterianas foram ativadas em 10 mL de meio TSA 10 % a 28 °C a 150 rpm por 48 horas. Uma alíquota de 0,1 mL de suspensão de células foi utilizada para inocular 50 mL do meio de cultivo caldo PSM com a seguinte composição g L⁻¹: (Glicose 1,5; NH₄NO₃ 0,5; KCl 0,05; MgSO₄.7H₂O 0,05; FeSO₄.7H₂O 0,001; MnSO₄.7H₂O 0,001; Fitato-Na 0,01), pH 5,5 a 28 °C 150 rpm por 48 h. Após esse período, foi realizada centrifugação a 3000 g por 5 min., e o sobrenadante da cultura coletado para a realização das análises de atividade.

2.3.2. Determinação das proteínas totais

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando como padrão a proteína soro albumina bovina (BSA).

2.3.3. Atividade inicial de degradação do fitato

A atividade de fitase foi determinada a 50 °C em 350 µL de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 contendo 2,5 mM de fitato de sódio. O tampão contendo o substrato foi pré-aquecido em Banho Maria por 10 min., antes da determinação da atividade enzimática. A reação enzimática foi realizada pela adição de 50 µL do sobrenadante. Após 15 minutos a 50 °C, a reação foi interrompida pela adição de 1,5 mL de solução de H₂SO₄ 5 N, molibdato de amônio 10 mM, acetona (1:1:2) e 100 µL de ácido cítrico 1 M. Antes da leitura da absorção a 355 nm, a reação foi centrifugada (10000 g por 10 min.). Para o cálculo da atividade enzimática foi utilizada uma curva padrão de KH₂PO₄ nas concentrações 0,0323, 0,0646, 0,0969, 0,1293, 0,1616 e 0,1939 µM mL⁻¹. Uma unidade de atividade de fitase foi definida como a quantidade de enzima requerida para liberar 1 µmol de fosfato por minuto nas condições de ensaio.

2.3.4. Determinação da temperatura ótima de atividade

Para a determinação da temperatura ótima, o ensaio de atividade enzimática foi realizado no intervalo de temperatura de 20 °C a 80 °C com incrementos de 10 °C.

2.3.5. Determinação do pH ótimo de atividade

Para a determinação do pH ótimo, o ensaio de atividade enzimática foi realizado entre os valores de pH de 1,0 a 12,0 com incrementos de 0,5. Para tal, foram utilizados os seguintes tampões: glicina-HCl 0,1 M (1,0-3,5), acetato de sódio 0,1 M (4,0-6,0), Tris-HCl 0,1 M (6,5-8,5) e glicina-NaOH 0,1 M (9,0-12,0).

2.3.6. Teste de especificidade do substrato

Para a determinação da especificidade da enzima, o ensaio de atividade enzimática foi realizado substituindo o fitato de sódio pelos seguintes substratos na concentração de 2,5 mM: ATP, ADP, pirofosfato, β-glicerofosfato.

2.3.7. Análises estatísticas

Os dados obtidos de atividade enzimática foram submetidos à análise de variância e, posteriormente, as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade, utilizando o programa SAEG (versão 9.1 – Universidade Federal de Viçosa, 2006).

3. Resultados

3.1. Triagem dos isolados para produção de fitase

Entre os 158 isolados bacterianos analisados, 28,48% (45) apresentaram halo de hidrólise de fitato em meio sólido. As medidas dos halos de produção de fitase medidos em 48 e 96 horas são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1. Diâmetro do halo de hidrólise de fitato em meio sólido inoculado com os 45 isolados positivos na triagem dos 158 isolados endofíticos de folhas de *Phaseolus vulgaris*.

Isolado	Halo de hidrólise do fitato	
	48 h (mm)	96 h (mm)
<i>Micrococcus luteus</i> strain BAC1004	14,5	17,0
<i>Microbacterium testaceum</i> strain BAC1006	12,5	14,5
<i>Enterobacter asburiae</i> strain BAC1007	13,0	15,0
<i>Microbacterium testaceum</i> strain BAC1009	11,0	15,0
<i>Enterobacter hormaechei</i> strain BAC1010	12,0	15,0
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain BAC1012	14,0	17,5
<i>Microbacterium testaceum</i> strain BAC1013	14,0	17,0
<i>Microbacterium testaceum</i> strain BAC1014	12,0	15,0
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain BAC1017	12,5	15,5
<i>Rhizobium larrymoorei</i> strain BAC2021	12,0	16,0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> strain BAC2026	9,5	16,0
<i>Brevibacillus agri</i> strain BAC2027	13,0	16,0
<i>Methylobacterium populi</i> strain BAC2028	12,5	17,5
<i>Staphylococcus warneri</i> strain BAC2030	10,0	16,0
<i>Methylobacterium populi</i> strain BAC2033	7,0	12,5
<i>Microbacterium testaceum</i> strain BAC2036	0,0	4,0
<i>Microbacterium foliorum</i> strain BAC3043	12,0	15,5
<i>Sphingobacterium multivorum</i> strain BAC3045	11,5	14,5
<i>Acinetobacter radioresistens</i> strain BAC3058	14,5	16,0
<i>Methylobacterium populi</i> strain BAC1064	14,0	18,5
<i>Paenibacillus cineris</i> strain BAC1091	0,0	8,0

Tabela 1 (cont.)

Isolado	Halo de hidrólise do fitato	
	48 h (mm)	96 h (mm)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain BAC3111	13,0	17,5
<i>Staphylococcus warneri</i> strain BAC3112	12,5	14,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain BAC3115 †	15,5†	19,5
<i>Microbacterium testaceum</i> strain BAC2126	14,5	20,5
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain BAC2128	12,5	16,0
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain BAC2134	10,5	15,0
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain BAC2135 †	14,5	22,0†
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain BAC1136	10,0	15,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain BAC1137	13,0	16,5
<i>Enterobacter asburiae</i> strain BAC1138	12,5	15,0
<i>Enterobacter hormaechei</i> strain BAC1139	13,5	16,5
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain BAC1140	13,5	16,5
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain BAC1141	15,0	21,0
<i>Rhizobium larrymoorei</i> strain BAC2142	14,0	16,0
<i>Staphylococcus</i> sp, strain BAC2144	13,0	16,0
<i>Paenibacillus</i> sp, strain BAC2145	14,0	16,0
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain BAC3149	10,5	16,5
<i>Microbacterium testaceum</i> strain BAC2153	11,5	18,0
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain BAC3155	12,0	15,0
<i>Microbacterium foliorum</i> strain BAC1157 †	15,0†	17,0
<i>Delftia tsuruhatensis</i> strain BAC2158	12,5	15,0
<i>Delftia tsuruhatensis</i> strain BAC3159	11,0	13,0
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain BAC2160	13,0	18,0
<i>Rhodococcus erythropolis</i> strain BAC2162 †	14,5	22,0†

†Isolados selecionado para avaliação da atividade de fitase

3.2. Avaliação da atividade de Fitase

3.2.1. Determinação das proteínas totais

A concentração de proteínas no sobrenadante da cultura de cada isolado bacteriano após 48 h de cultivo é mostrada na Tabela 2. *Microbacterium foliorum* strain BAC1157 apresentou uma maior concentração de proteínas no sobrenadante do que os demais isolados.

3.2.2. Atividade inicial de degradação do fitato

A atividade de fitase de cada sobrenadante das culturas após 48 horas de cultivo em meio PSM pode ser visualizada na Figura 1. O isolado *R. erythropolis* strain

BAC2162 e o isolado *S. maltophilia* strain BAC2135 apresentaram a maior atividade, 0,659 e 0,625 U mL⁻¹, respectivamente, em relação aos outros isolados analisados, enquanto o isolado *M. foliorum* strain BAC1157 apresentou a menor atividade, 0,550 U mL⁻¹.

Tabela 2. Concentração de proteína no sobrenadante das bactérias após 48 de cultivo em meio PSM.

Sobrenadante do isolado	Concentração de proteína (µg mL ⁻¹)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain BAC3115	15,15
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain BAC2135	16,48
<i>Microbacterium foliorum</i> strain BAC1157	19,57
<i>Rhodococcus erythropolis</i> strain BAC2162	12,35

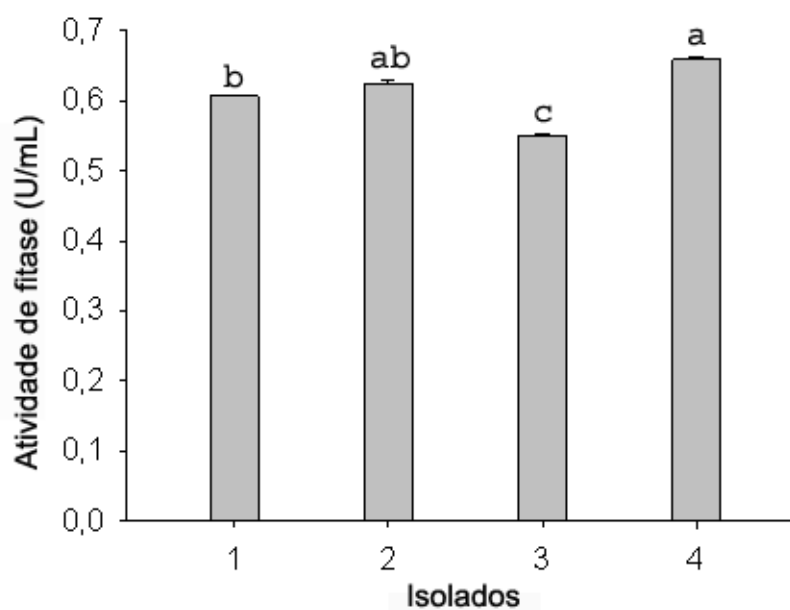


Figura 1. Atividade de fitase a 50 °C do sobrenadante dos quatro isolados selecionados pela triagem em meio sólido: 1 - *Pseudomonas aeruginosa* strain BAC3115; 2 - *Stenotrophomonas maltophilia* strain BAC2135; 3 - *Microbacterium foliorum* strain BAC1157; 4 - *Rhodococcus erythropolis* strain BAC2162. As barras com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

3.2.3. Determinação da temperatura ótima de atividade

A temperatura ótima de atividade de fitase do sobrenadante de cada uma das bactérias endofíticas é mostrada na Figura 2. Para os isolados *P. aeruginosa* strain

BAC3115, *S. maltophilia* strain BAC2135 e *R. erythropolis* strain BAC2162, a temperatura ótima de atividade de fitase foi de 50 °C. A solução enzimática de *M. foliorum* strain BAC1157 apresentou maior atividade a 70 °C.

3.2.4. Determinação do pH ótimo de atividade

As curvas de pH ótimo de cada uma dos sobrenadantes podem ser observada na Figura 3. *Pseudomonas aeruginosa* strain BAC3115, apresentou atividade máxima (100 %) em pH 3,0 e em pH 8,0 apresentou uma atividade ótima com 97 % de atividade; *M. foliorum* strain BAC1157 apresentou um máximo (100 %) de atividade em pH 3,0 e em pH 5,0 uma atividade de 91 %; *R. erythropolis* strain BAC2162, apresentou 100 % de atividade em pH 4,5 e 80 % de atividade em pH 8,0 e o isolado *S. maltophilia* strain BAC2135, apresentou um pico com 100 % de atividade em pH 4,5 e em diversos pH com atividade entre 45 a 50 %.

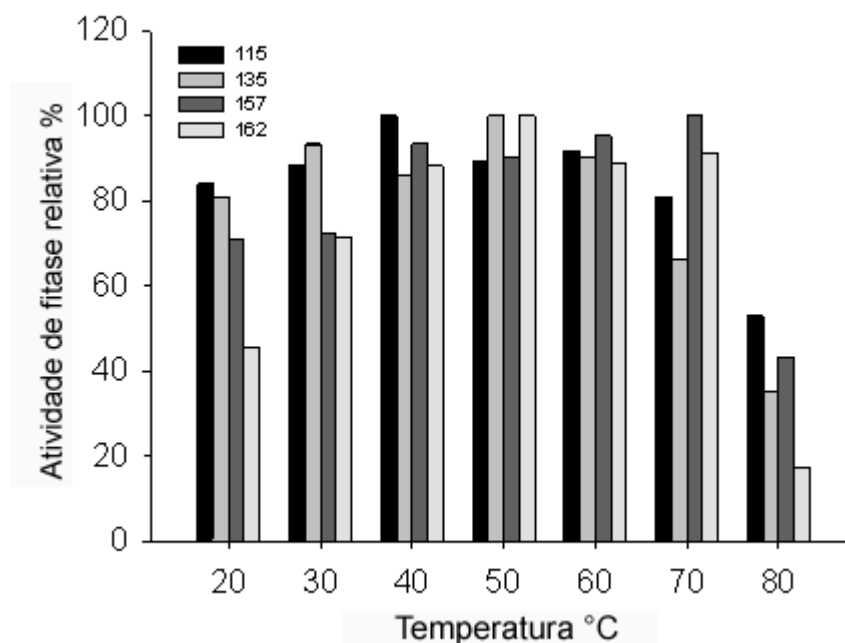


Figura 2 – Determinação da temperatura ótima de atividade de cada solução enzimática obtida após 48 horas de cultivo das quatro bactérias produtoras de fitase: *Pseudomonas aeruginosa* strain BAC3115; *Stenotrophomonas maltophilia* strain BAC2135; *Microbacterium foliorum* strain BAC1157; *Rhodococcus erythropolis* strain BAC2162.

3.2.5. Teste de especificidade do substrato

A especificidade em relação ao substrato de cada um dos sobrenadantes pode ser visualizada na Tabela 3. Além de atividade de fitase, a solução enzimática dos quatro isolados apresentou atividade para os substratos β -glicerofosfato e pirofosfato de sódio. *Pseudomonas aeruginosa* strain BAC3115, foi o único isolado que apresentou alguma atividade com o substrato ATP, enquanto as soluções enzimáticas de *M. foliorum* strain BAC1157, e *R. erythropolis* strain BAC2162, apresentaram atividade com ADP.

Tabela 3. Especificidade do sobrenadante dos quatro isolados endofíticos analisados.

Substrato	Atividade relativa %†			
	BAC3115	BAC2135	BAC1157	BAC2162
Fitato	100 a	100 a	100 a	100 a
β -Glicerofosfato	35 c	13c	20 cd	59 b
ADP	0 d	0 c	48 b	53 c
ATP	0 d	15 c	0 d	0 e
Pirofosfato de sódio	73 b	60 b	32 bc	11 d

† A atividade foi avaliada utilizando-se o ensaio padrão. BAC3115 *P. aeruginosa*; BAC2135 *S. maltophilia*; BAC1157 *M. foliorum*; BAC2162 *R. erythropolis*. Numa mesma coluna as atividades com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

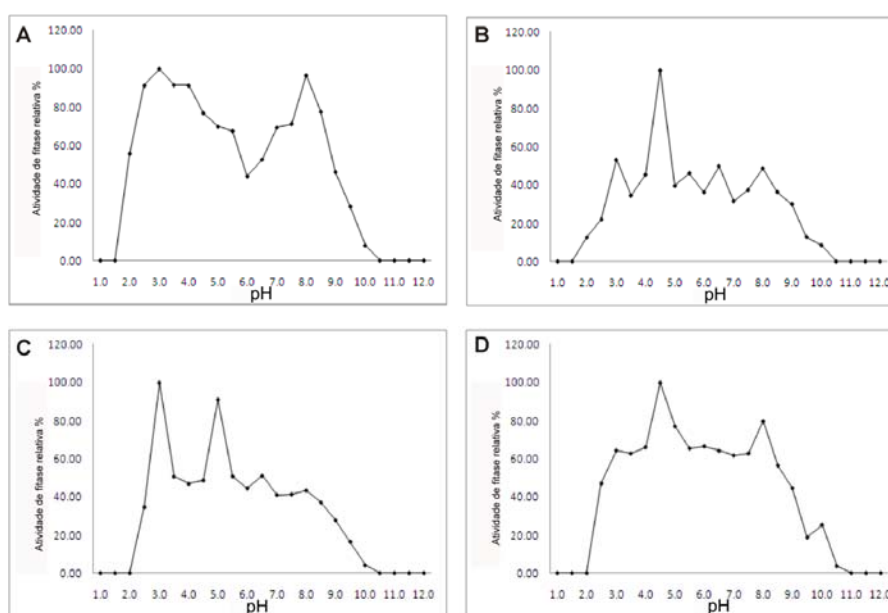


Figura 3. pH ótimo do sobrenadante dos quatro isolados endofíticos após 48 horas de cultivo: A - *Pseudomonas aeruginosa* strain BAC3115; B - *Stenotrophomonas maltophilia* strain BAC2135; C - *Microbacterium foliorum* strain BAC1157; D - *Rhodococcus erythropolis* strain BAC2162.

4. Discussão

O grande número de isolados caracterizados como produtores de fitases neste trabalho indicam que bactérias endofíticas são fontes promissoras para a obtenção de bactérias produtoras destas enzimas. Hussin et al. (2007), ao avaliarem bactérias produtoras de fitase na Malásia, constataram que as bactérias com as maiores atividades de fitase eram de origem endofítica. O fato de microrganismos endofíticos poderem ser transmitidos verticalmente para as sementes, aliado ao fato de que em grãos de cereais e leguminosas a principal fonte de P se encontra na forma de fitato, provavelmente selecionou microrganismos endofíticos que auxiliam na degradação do fitato, os quais podem auxiliar no processo de germinação das sementes (López-López et al., 2010).

A atividade de fitase para diferentes bactérias encontradas na literatura varia de forma considerável. Shimizu (1992) reportou uma atividade de $0,044 \text{ U mL}^{-1}$ para *Bacillus subtilis*, enquanto Yanke et al. (1998) relataram uma atividade de $0,703 \text{ U mL}^{-1}$ para *Selemonas ruminantium* e Greiner et al., (1993) reportaram uma atividade de $5,6 \text{ U mL}^{-1}$ para *E. coli*. Hussin et al. (2007) obtiveram atividades entre $0,387$ a $1,913 \text{ U mL}^{-1}$ para diferentes bactérias. A atividade de fitase dos isolados endofíticos bacterianos avaliados neste trabalho variou de $0,550$ a $0,659$. Um fator importante a ressaltar é que existem diferenças nas condições experimentais e na pureza das preparações enzimáticas nos diferentes trabalhos encontrados na literatura, o que torna difícil a comparação entre as atividades de fitase apresentadas dos diferentes trabalhos.

Para caracterizar melhor o potencial dos quatro isolados selecionados, foi realizada a determinação da temperatura ótima e do pH ótimo. A temperatura ótima para a maioria das fitases de origem microbiana relatada na literatura é em torno de $50 \text{ }^\circ\text{C}$ (Simon and Igbasan, 2002). A fitase produzida pelo isolado *M. foliorum* strain BAC1157 apresentou uma maior atividade a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ tendo grande potencial para ser usada como aditivo em rações para suínos, visto que o processo de preparo requer

temperaturas elevadas (75 a 90 °C). Além disso, na temperatura de 40 °C, a fitase em questão apresentou 90% da atividade máxima, como a temperatura corporal dos suínos é de 39 °C esta é outra característica desejável para aplicação em rações para estes animais (Casey and Walsh, 2003).

As características apresentadas na determinação do pH ótimo de atividade do sobrenadante de *M. foliorum* strain BAC1157 mostram que a enzima possui pH ótimo em pH 3,0 e não possui atividade em pH 2,0. O pH do estômago de suínos varia de 2,0 a 4,0 (Lindberg & Ogel, 2001) dependendo, dentre outros fatores, da alimentação. Esta perda de atividade em pH 2,0 é um ponto negativo, porém o controle da alimentação do animal pode garantir que o pH do estômago não alcance este valor. Além disso, com o isolamento e a caracterização do gene que codifica a fitase de *M. foliorum* strain BAC1157, uma das alternativas para se contornar o problema da atividade em pH 2,0 pode ser semelhante à abordagem realizada por Mullaney et al. (2002) com a fitase de *Aspergillus niger* NRRL3135. Naquele trabalho os autores utilizaram a mutagênese sítio direcionada para aumentar a atividade da fitase em pH 4,0.

As curvas de atividade de fitases de origem bacteriana relatadas na literatura indicam apenas um pH ótimo da atividade. As duas fitases purificadas de *E. coli* (Greiner et al., 1993) possuem um pH ótimo em torno de 7,0-7,5, assim como a fitase de *Enterobacter* sp. 4 (Yoon et al., 1996), enquanto a fitase de *Bacillus subtilis* (natto) N77 apresenta pH ótimo na faixa de 6,0-6,5 e a fitase de *Citrobacter braakii* (Kim et al., 2003) apresenta pH ótimo em torno de 4,0. Porém, as fitases dos isolados utilizados neste trabalho apresentaram mais de um pH ótimo de atividade, sugerindo a presença de enzimas com características distintas. As curvas de atividade de fitase para fungos geralmente apresentam mais de um valor de pH ótimo. A fitase purificada de *Aspergillus niger* ATCC 9142 apresenta atividade ótima em pH 5,0 e mais dois picos

de atividade em pH 2,5 e pH 11,0 (Casey and Walsh, 2003). Portanto, o perfil dos picos apresentados sugere a presença de mais de uma enzima no sobrenadante da cultura dos isolados que foram analisados.

No geral, as fitases de origem bacteriana possuem especificidade alta pelo fitato e atividades muito baixas para outros substratos fosforilados (Greiner et al., 1993; Kim et al., 1998; Kim et al., 2003; Shimizu, 1992). Outra característica que as fitases produzidas pelas bactérias endofíticas têm em comum com as fitases fúngicas é a atividade sobre outros substratos fosforilados como ADP, β -glicerofosfato e pirofosfato (Casey and Walsh, 2003). A atividade relativa obtida para os outros substratos demonstra que as fitases produzida pelos isolados avaliados possui atividade de fosfatase mais ampla, porém a atividade de fitase foi maior do que a atividade observada na presença dos outros substratos.

Os resultados obtidos indicam que as bactérias endofíticas analisadas produzem fitases ácidas e alcalinas com diferentes valores ótimos de pH. Estes diferentes valores ótimos de pH podem ser explorados de diferentes formas, de acordo com as aplicações desejadas pela indústria. A temperatura ótima de atividade do isolado *M. foliorum* strain BAC1157 foi superior ao reportado para a maioria das fitases, sendo uma característica promissora para a produção de rações para animais, um processo que utiliza temperaturas em torno de 65 a 95 °C (Konietzny, & Greiner, 2004).

5. Referências

Araujo, W.L., Marcon, J., Maccheroni, W., Jr., van Elsas, J.D., van Vuurde, J.W.L., and Azevedo, J.L., 2002. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Appl Environ Microbiol* 68: 4906-4914.

- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Casey, A., Walsh, G., 2003. Purification and characterization of extracellular phytase from *Aspergillus niger* ATCC 9142. *Bioresour Technol* 86: 183-188.
- Coelho, C.M.M., Santos, J.C.P., Tsai, S.M., Vitorello, V.A., 2002. Seed phytate content and phosphorus uptake and distribution in dry bean genotypes. *Braz J Plant Physiol* 14: 51-58.
- Greiner, R., Konietzny, U., Jany, K.D., 1993. Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* 303: 107-113.
- Hallmann, J., QuadtHallmann, A., Mahaffee, W.F., Kloepper, J.W., 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can J Microbiol* 43: 895-914.
- Hussin, A.S.M., Farouk, A.E., Greiner, R., Salleh, H.M., Ismail, A.F., 2007. Phytate-degrading enzyme production by bacteria isolated from Malaysian soil. *World J Microbiol Biotechnol* 23: 1653-1660.
- Kim, H., Kim, Y., Lee, J., Kim, K., Kim, Y., 2003. Isolation and characterization of a phytase with improved properties from *Citrobacter braakii*. *Biotechnol Lett* 25: 1231-1234.
- Kim, Y., Kim, H., Bae, K., Yu, J., Oh, T., 1998. Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. DS11. *Enzym Microb Tech* 22: 2-7.
- Konietzny, U., Greiner, R., 2002. Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). *Int J Food Sci Tech* 37: 791-812.
- Konietzny, U., Greiner, R., 2004. Bacterial phytase: potential application, in vivo function and regulation of its synthesis. *Braz J Microbiol* 35: 12-18.
- Lindberg, J.E., Ogel, B., 2001, Digestive Physiology of Pigs. CAB International, Oxford, UK.
- López-López, A., Rogel, M.A., Ormeño-Orrillo, E., Martínez-Romero, J., Martínez-Romero, E., 2010. *Phaseolus vulgaris* seed-borne endophytic community with novel bacterial species such as *Rhizobium endophyticum* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* 33: 322-327.
- Mullaney, E.J., Daly, C.B., Kim, T., Porres, J.M., Lei, X.G., Sethumadhavan, K., Ullah, A.H.J., 2002. Site-directed mutagenesis of *Aspergillus niger* NRRL 3135 phytase at residue 300 to enhance catalysis at pH 4.0. *Biochem Biophys Res Comm* 297: 1016-1020.

- Rodriguez, E., Porres, J.M., Han, Y., Lei, X.G., 1999. Different sensitivity of recombinant *Aspergillus niger* phytase (r-PhyA) and *Escherichia coli* pH 2.5 acid phosphatase (r-AppA) to Trypsin and Pepsin in Vitro. *Arch Biochem Biophys* 365: 262-267.
- Schroder, B., Breves, G., Rodehutschord, M., 1996. Mechanisms of intestinal phosphorus absorption and availability of dietary phosphorus in pigs. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 103: 209-214.
- Shimizu, M., 1992. Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-77. *Biosci Biotechnol Biochem* 56: 1266-1269.
- Simon, O., Igbasan, F., 2002. In vitro properties of phytases from various microbial origins. *Int J Food Sci Tech* 37: 813-822.
- Strobel, G.A., Daisy, B., 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol Mol Biol Rev* 67: 491-502.
- Turner, B.L., Haygarth, P.M., 2000. Phosphorus forms and concentrations in leachate under four grassland soil types. *Soil Sci Soc Am J* 64: 1090-1099.
- Turner, B.L., Mahieu, N., Condon, L.M., 2003. Quantification of myo-inositol hexakisphosphate in alkaline soil extracts by solution ³¹P Nmr spectroscopy and Spectral Deconvolution. *Soil Sci* 168: 469-478.
- Turner, B.L., Papházy, M.J., Haygarth, P.M., Mckelvie, I.D., 2002. Inositol phosphates in the environment. *Phil Trans Roy Soc Lond B Biol Sci* 357: 449-469.
- Universidade Federal de Viçosa - UFV. Sistema de análises estatísticas e genéticas - SAEG. Versão 9.1. Viçosa, MG, 2006. 142p.
- Urbano, G., López-Jurado, M., Aranda, P., Vidal-Valverde, C., Tenorio, E., Porres, J., 2000. The role of phytic acid in legumes: antinutrient or beneficial function? *J Evol Biochem Physiol* 56: 283-294.
- Vohra, A., Satyanarayana, T., 2003. Phytases: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Crit Rev Biotechnol* 23: 29-60.
- Yanke, L.J., Bae, H.D., Selinger, L.B., Cheng, K.J., 1998. Phytase activity of anaerobic ruminal bacteria. *Microbiology* 144: 1565-1573.
- Yoon, S.J., Choi, Y.J., Min, H.K., Cho, K.K., Kim, J.W., Lee, S.C., Jung, Y.H., 1996. Isolation and identification of phytase-producing bacterium, *Enterobacter* sp. 4, and enzymatic properties of phytase enzyme. *Enzym Microb Tech* 18: 449-454.

Conclusões Gerais

1. As bactérias isoladas do feijoeiro pertencem aos Filos Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria e Bacteroidetes, sendo que a maior parte dos isolados pertence aos Filos Proteobacteria e Firmicutes.
2. Apesar de a maioria dos isolados pertencer ao Filo Proteobacteria a classe Bacilli do Filo Firmicutes contou com o maior número de representantes.
3. Os gêneros das bactérias endofíticas isoladas provavelmente variam de acordo com a cultivar do feijoeiro analisada, ou seja, o genótipo da planta hospedeira influencia na comunidade endofítica.
4. Os gêneros *Bacillus*, *Delftia*, *Paenibacillus*, *Methylobacterium*, *Microbacterium* *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas* estão presentes nas três cultivares avaliadas, evidenciando a adaptação destes gêneros a diferentes cultivares.
5. Um alto percentual dos isolados foi capaz de produzir proteases e quase um terço dos isolados demonstrou algum grau de antagonismo contra os fungos avaliados, demonstrando o potencial de bactérias endofíticas como candidatas ao controle biológico de doenças fúngicas do feijoeiro.
6. Aproximadamente um quarto dos isolados foi capaz de produzir fitase, o que demonstra que bactérias endofíticas são fontes em potencial para obtenção destas enzimas.
7. As características das fitases bacterianas dos isolados avaliados são diferentes daquelas descritas na literatura. Portanto, bactérias endofíticas podem representar uma fonte de novas enzimas para aplicações na indústria, agricultura e meio ambiente.

Anexos

Tabela S1. Identidade das sequências do gene rDNA 16S dos isolados com as sequências depositadas no banco de dados (GENBANK).

Isolate	similarity score	Sequence name
BAC1001	1.00	<i>Bacillus thuringiensis</i> (T); ATCC10792; AF290545
BAC1002	1.00	<i>Micrococcus luteus</i> (T); ATCC 4698; AF542073
BAC1003	1.00	<i>Microbacterium testaceum</i> (T); DSM 20166; X77445
BAC1004	1.00	<i>Micrococcus luteus</i> (T); ATCC 4698; AF542073
BAC1005	1.00	<i>Micrococcus luteus</i> (T); ATCC 4698; AF542073
BAC1006	1.00	<i>Microbacterium testaceum</i> (T); DSM 20166; X77445
BAC1007	1.00	<i>Enterobacter asburiae</i> (T); JCM6051; AB004744
BAC1008	1.00	<i>Microbacterium testaceum</i> (T); DSM 20166; X77445
BAC1009	0.98	<i>Microbacterium testaceum</i> (T); DSM 20166; X77445
BAC1010	1.00	<i>Enterobacter hormaechei</i> (T); CIP 103441; AJ508302
BAC1011	1.00	<i>Rhizobium larrymoorei</i> (T); 3-10; Z30542
BAC1012	1.00	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (T); ATCC 13637T; AB008509
BAC1013	1.00	<i>Microbacterium testaceum</i> (T); DSM 20166; X77445
BAC1014	1.00	<i>Microbacterium testaceum</i> (T); DSM 20166; X77445
BAC1015	0.98	<i>Bacillus niacini</i> (T); IFO15566; AB021194
BAC1016	1.00	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (T); ATCC 14990; D83363
BAC1017	1.00	<i>Bacillus thuringiensis</i> (T); ATCC10792; AF290545
BAC1018	1.00	<i>Microbacterium testaceum</i> (T); DSM 20166; X77445
BAC1019	1.00	<i>Microbacterium testaceum</i> (T); DSM 20166; X77445
BAC1020	1.00	<i>Microbacterium testaceum</i> (T); DSM 20166; X77445
BAC2021	1.00	<i>Rhizobium larrymoorei</i> (T); 3-10; Z30542
BAC2022	1.00	<i>Microbacterium testaceum</i> (T); DSM 20166; X77445
BAC2023	0.99	<i>Methylobacterium populi</i> (T); BJ001; ATCC BAA-705; NCIMB 13946; AY251818
BAC2024	1.00	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (T); ATCC 13637T; AB008509
BAC2025	1.00	<i>Rhizobium larrymoorei</i> (T); 3-10; Z30542
BAC2026	1.00	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (T); ATCC 14990; D83363
BAC2027	1.00	<i>Brevibacillus agri</i> (T); NRRL NRS-1219; D78454
BAC2028	0.99	<i>Methylobacterium populi</i> (T); BJ001; ATCC BAA-705; NCIMB 13946; AY251818
BAC2029	1.00	<i>Microbacterium testaceum</i> (T); DSM 20166; X77445
BAC2030	1.00	<i>Staphylococcus warneri</i> (T); L37603
BAC2031	1.00	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (T); ATCC 13637T; AB008509
BAC2032	1.00	<i>Staphylococcus warneri</i> (T); L37603
BAC2033	0.99	<i>Methylobacterium populi</i> (T); BJ001; ATCC BAA-705; NCIMB 13946; AY251818
BAC2034	1.00	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (T); ATCC 14990; D83363
BAC2035	1.00	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (T); ATCC 14990; D83363
BAC2036	0.98	<i>Microbacterium testaceum</i> (T); DSM 20166; X77445
BAC2037	0.98	<i>Sphingomonas dokdonensis</i> (T); DS-4; DQ178975
BAC2038	0.98	<i>Sporosarcina aquimarina</i> (T); SW28(T); AF202056
BAC2039	1.00	<i>Staphylococcus caprae</i> (T); ATCC 35538T; AB009935
BAC2040	0.99	<i>Methylobacterium populi</i> (T); BJ001; ATCC BAA-705; NCIMB 13946; AY251818
BAC3041	1.00	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (T); ATCC 14990; D83363
BAC3042	1.00	<i>Bacillus thuringiensis</i> (T); ATCC10792; AF290545
BAC3043	1.00	<i>Microbacterium foliorum</i> (T); DSM 12966; P 333/02; AJ249780

BAC3044	0.97	<i>Bacillus bataviensis</i> (T); type strain: LMG 21832; AJ542507
BAC3045	0.98	<i>Sphingobacterium multivorum</i> (T); IFO 14947; D14025
BAC3046	1.00	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (T); ATCC 14990; D83363
BAC3047	1.00	<i>Microbacterium testaceum</i> (T); DSM 20166; X77445
BAC3048	1.00	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (T); CR-502; AY603658
BAC3049	1.00	<i>Staphylococcus kloosii</i> (T); ATCC 43959T; AB009940
BAC3050	0.99	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> (T); DSM 13468; P 369/06; AJ277840
BAC3051	0.99	<i>Methylobacterium populi</i> (T); BJ001; ATCC BAA-705; NCIMB 13946; AY251818
BAC3052	1.00	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (T); ATCC 13637T; AB008509
BAC3053	0.97	<i>Bacillus bataviensis</i> (T); type strain: LMG 21832; AJ542507
BAC3054	0.99	<i>Methylobacterium populi</i> (T); BJ001; ATCC BAA-705; NCIMB 13946; AY251818
BAC3055	0.99	<i>Staphylococcus warneri</i> (T); L37603
BAC3058	1.00	<i>Acinetobacter radioresistens</i> (T); DSM 6976; X81666
BAC3059	0.98	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> ; KNUC228; EF166045
BAC3060	0.95	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (T); ATCC 13637T; AB008509
BAC1061	0.92	<i>Microbacterium testaceum</i> (T); DSM 20166; X77445
BAC1062	1.00	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (T); ATCC 14990; D83363
BAC1063	1.00	<i>Bacillus thuringiensis</i> (T); ATCC10792; AF290545
BAC1064	0.99	<i>Methylobacterium populi</i> (T); BJ001; ATCC BAA-705; NCIMB 13946; AY251818
BAC1065	1.00	<i>Microbacterium testaceum</i> (T); DSM 20166; X77445
BAC1066	1.00	<i>Microbacterium testaceum</i> (T); DSM 20166; X77445
BAC1067	1.00	<i>Microbacterium foliorum</i> (T); DSM 12966; P 333/02; AJ249780
BAC1068	0.99	<i>Methylobacterium populi</i> (T); BJ001; ATCC BAA-705; NCIMB 13946; AY251818
BAC1069	0.99	<i>Methylobacterium populi</i> (T); BJ001; ATCC BAA-705; NCIMB 13946; AY251818
BAC1070	0.99	<i>Brevundimonas vesicularis</i> (T); ATCC 11426 (T); AJ007801
BAC2071	1.00	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (T); ATCC 14990; D83363
BAC2072	1.00	<i>Frigoribacterium faeni</i> (T); 801; Y18807
BAC2073	0.99	<i>Sphingomonas sanguinis</i> (T); IFO 13937; D13726
BAC2074	0.98	<i>Staphylococcus warneri</i> (T); L37603
BAC2075	0.99	<i>Frigoribacterium faeni</i> (T); 801; Y18807
BAC2076	1.00	<i>Rhizobium larrymoorei</i> (T); 3-10; Z30542
BAC2077	1.00	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (T); ATCC 14990; D83363
BAC2078	1.00	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i> (T); DSM10; AJ276351
BAC2079	1.00	<i>Microbacterium testaceum</i> (T); DSM 20166; X77445
BAC2080	1.00	<i>Microbacterium testaceum</i> (T); DSM 20166; X77445
BAC3081	1.00	<i>Brevibacillus agri</i> (T); NRRL NRS-1219; D78454
BAC3082	0.99	<i>Methylobacterium populi</i> (T); BJ001; ATCC BAA-705; NCIMB 13946; AY251818
BAC3083	0.99	<i>Methylobacterium populi</i> (T); BJ001; ATCC BAA-705; NCIMB 13946; AY251818
BAC3084	1.00	<i>Paenibacillus cineris</i> (T); type strain: LMG 18439; AJ575658
BAC3085	1.00	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (T); ATCC 14990; D83363
BAC3087	1.00	<i>Microbacterium foliorum</i> (T); DSM 12966; P 333/02; AJ249780
BAC3088	0.99	<i>Methylobacterium populi</i> (T); BJ001; ATCC BAA-705; NCIMB 13946; AY251818
BAC3089	1.00	<i>Staphylococcus warneri</i> (T); L37603
BAC3090	0.99	<i>Methylobacterium populi</i> (T); BJ001; ATCC BAA-705; NCIMB 13946; AY251818
BAC1091	1.00	<i>Paenibacillus cineris</i> (T); type strain: LMG 18439; AJ575658
BAC1092	1.00	<i>Microbacterium testaceum</i> (T); DSM 20166; X77445

BAC1093	1.00	<i>Microbacterium testaceum</i> (T); DSM 20166; X77445
BAC1094	0.99	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> (T); DSM 13468; P 369/06; AJ277840
BAC1095	1.00	<i>Micrococcus luteus</i> (T); ATCC 4698; AF542073
BAC1096	1.00	<i>Bacillus muralis</i> (T); type strain: LMG 20238; AJ628748
BAC1098	1.00	<i>Kocuria palustris</i> (T); TAGA27 (DSM 11925, type strain); Y16263
BAC1099	1.00	<i>Microbacterium testaceum</i> (T); DSM 20166; X77445
BAC1100	1.00	<i>Microbacterium testaceum</i> (T); DSM 20166; X77445
BAC2101	1.00	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. saprophyticus (T); ATCC 15305; D83371
BAC2102	1.00	<i>Staphylococcus warneri</i> (T); L37603
BAC2103	0.99	<i>Methylobacterium populi</i> (T); BJ001; ATCC BAA-705; NCIMB 13946; AY251818
BAC2104	1.00	<i>Delftia tsuruhatensis</i> (T); T7; AB075017
BAC2105	0.99	<i>Methylobacterium populi</i> (T); BJ001; ATCC BAA-705; NCIMB 13946; AY251818
BAC2107	1.00	<i>Staphylococcus warneri</i> (T); L37603
BAC2108	0.99	<i>Methylobacterium populi</i> (T); BJ001; ATCC BAA-705; NCIMB 13946; AY251818
BAC2109	1.00	<i>Staphylococcus warneri</i> (T); L37603
BAC2110	1.00	<i>Frigoribacterium faeni</i> (T); 801; Y18807
BAC3111	0.99	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (T); DSM50071; X06684
BAC3112	1.00	<i>Staphylococcus warneri</i> (T); L37603
BAC3113	0.99	<i>Methylobacterium populi</i> (T); BJ001; ATCC BAA-705; NCIMB 13946; AY251818
BAC3114	0.97	<i>Dietzia cinnamea</i> (T); type strain: IMMIB RIV-399; AJ920289
BAC3115	0.99	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (T); DSM50071; X06684
BAC3116	0.95	<i>Staphylococcus warneri</i> (T); L37603
BAC3117	1.00	<i>Agromyces mediolanus</i> (T); DSM 20152; X77449
BAC3118	1.00	<i>Agromyces mediolanus</i> (T); DSM 20152; X77449
BAC3119	1.00	<i>Staphylococcus warneri</i> (T); L37603
BAC3121	1.00	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (T); ATCC 13637T; AB008509
BAC3122	1.00	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (T); ATCC 13637T; AB008509
BAC3123	0.99	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (T); ATCC 13637T; AB008509
BAC3124	0.98	<i>Agromyces mediolanus</i> (T); DSM 20152; X77449
BAC3125	1.00	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (T); ATCC 13637T; AB008509
BAC2126	0.99	<i>Microbacterium testaceum</i> (T); DSM 20166; X77445
BAC2127	0.99	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (T); ATCC 13637T; AB008509
BAC2128	1.00	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (T); ATCC 13637T; AB008509
BAC2129	1.00	<i>Agromyces mediolanus</i> (T); DSM 20152; X77449
BAC2131	1.00	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (T); ATCC 14990; D83363
BAC2132	0.99	<i>Methylobacterium populi</i> (T); BJ001; ATCC BAA-705; NCIMB 13946; AY251818
BAC2133	0.99	<i>Paenibacillus lautus</i> (T); NRRL NRS-666T; D78473
BAC2134	1.00	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (T); ATCC 13637T; AB008509
BAC2135	1.00	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (T); ATCC 13637T; AB008509
BAC1136	0.99	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (T); ATCC 13637T; AB008509
BAC1137	0.99	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (T); DSM50071; X06684
BAC1138	1.00	<i>Enterobacter asburiae</i> (T); JCM6051; AB004744
BAC1139	1.00	<i>Enterobacter hormaechei</i> (T); CIP 103441; AJ508302
BAC1140	1.00	<i>Bacillus thuringiensis</i> (T); ATCC10792; AF290545
BAC1141	1.00	<i>Bacillus thuringiensis</i> (T); ATCC10792; AF290545
BAC2142	1.00	<i>Rhizobium larrymoorei</i> (T); 3-10; Z30542

BAC2143	0.95	<i>Staphylococcus warneri</i> (T); L37603
BAC2147	0.98	<i>Bacillus bataviensis</i> (T); type strain: LMG 21832; AJ542507
BAC3148	1.00	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (T); ATCC 13637T; AB008509
BAC3149	1.00	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (T); ATCC 13637T; AB008509
BAC3150	1.00	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (T); ATCC 13637T; AB008509
BAC3151	1.00	<i>Bacillus thuringiensis</i> (T); ATCC10792; AF290545
BAC1152	1.00	<i>Staphylococcus warneri</i> (T); L37603
BAC2153	1.00	<i>Microbacterium testaceum</i> (T); DSM 20166; X77445
BAC3154	1.00	<i>Microbacterium testaceum</i> (T); DSM 20166; X77445
BAC3155	1.00	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (T); ATCC 13637T; AB008509
BAC1156	0.92	<i>Delftia tsuruhatensis</i> (T); T7; AB075017
BAC1157	1.00	<i>Microbacterium foliorum</i> (T); DSM 12966; P 333/02; AJ249780
BAC2158	1.00	<i>Delftia tsuruhatensis</i> (T); T7; AB075017
BAC3159	1.00	<i>Delftia tsuruhatensis</i> (T); T7; AB075017
BAC2160	1.00	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (T); ATCC 13637T; AB008509
BAC2162	1.00	<i>Rhodococcus erythropolis</i> (T); ATCC 4277T; X81929

Tabela S2. Antagonismo dos 158 isolados contra fungos fitopatogênicos e produção de enzimas líticas e sideróforos

Isolado	Número de acesso	Antagonismo <i>in vitro</i>			Enzimas líticas			Metabolito
		<i>C. lindemuthianum</i>	<i>R.solani</i>	<i>F. oxysporum</i>	Celulase	Pectinase	Protease	Sideróforo
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain BAC1001	HM355592	-	-	-	-	-	+	-
<i>Micrococcus luteus</i> strain BAC1002	HM355593	-	-	-	+	-	+	-
<i>Microbacterium testaceum</i> strain BAC1003	HM355594	-	-	-	+	-	+	-
<i>Micrococcus luteus</i> strain BAC1004	HM355595	-	-	-	-	-	+	-
<i>Micrococcus luteus</i> strain BAC1005	HM355596	-	-	-	-	-	+	-
<i>Microbacterium testaceum</i> strain BAC1006	HM355597	+	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter asburiae</i> strain BAC1007	HM355598	-	-	-	-	-	-	+
<i>Microbacterium testaceum</i> strain BAC1008	HM355599	+	-	-	-	-	+	-
<i>Microbacterium testaceum</i> strain BAC1009	HM355600	-	-	-	-	-	+	-
<i>Enterobacter hormaechei</i> strain BAC1010	HM355601	-	-	-	-	-	+	-
<i>Rhizobium larrymoorei</i> strain BAC1011	HM355602	+	-	-	-	-	+	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain BAC1012	HM355603	+	-	-	-	-	-	-
<i>Microbacterium testaceum</i> strain BAC1013	HM355604	-	-	-	-	-	+	-
<i>Microbacterium testaceum</i> strain BAC1014	HM355605	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus niacini</i> strain strain BAC1015	HM355606	-	-	-	-	-	+	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> strain BAC1016	HM355607	+	-	-	-	-	+	-
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain BAC1017	HM355608	-	-	-	-	-	-	-
<i>Microbacterium testaceum</i> strain BAC1018	HM355609	+	-	-	-	-	+	+
<i>Microbacterium testaceum</i> strain BAC1019	HM355610	++	-	-	-	-	-	-
<i>Microbacterium testaceum</i> strain BAC1020	HM355611	-	-	-	-	-	+	-
<i>Rhizobium larrymoorei</i> strain BAC2021	HM355612	-	-	-	-	-	+	-
<i>Microbacterium testaceum</i> strain BAC2022	HM355613	-	-	-	-	-	-	-
<i>Methylobacterium populi</i> strain BAC2023	HM355614	-	-	-	-	-	-	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain BAC2024	HM355615	+	-	-	-	-	+	-

Isolado	Número de acceso	Antagonismo <i>in vitro</i>			Enzimas líticas			Metabolito
		<i>C. lindemuthianum</i>	<i>R.solani</i>	<i>F. oxysporum</i>	Celulase	Pectinase	Protease	Sideróforo
<i>Rhizobium larrymoorei</i> strain BAC2025	HM355616	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> strain BAC2026	HM355617	-	-	-	-	-	+	-
<i>Brevibacillus agri</i> strain BAC2027	HM355618	++	-	-	-	-	-	-
<i>Methylobacterium populi</i> strain BAC2028	HM355619	-	-	-	-	-	-	-
<i>Microbacterium testaceum</i> strain BAC2029	HM355620	-	-	-	-	-	+	-
<i>Staphylococcus warneri</i> strain BAC2030	HM355621	+	-	-	-	-	-	+
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain BAC2031	HM355622	++	-	-	-	-	+	-
<i>Staphylococcus warneri</i> strain BAC2032	HM355623	-	-	-	-	-	+	-
<i>Methylobacterium populi</i> strain BAC2033	HM355624	-	-	-	-	-	+	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> strain BAC2034	HM355625	-	-	-	+	-	+	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i> strain BAC2035	HM355626	-	-	-	-	-	+	-
<i>Microbacterium testaceum</i> strain BAC2036	HM355627	-	-	-	+	-	+	-
<i>Sphingomonas dokdonensis</i> strain BAC2037	HM355628	-	-	-	-	-	+	-
<i>Sporosarcina aquimarina</i> strain BAC2038	HM355629	-	-	-	-	-	+	-
<i>Staphylococcus caprae</i> strain BAC2039	HM355630	+	-	-	-	-	+	-
<i>Methylobacterium populi</i> strain BAC2040	HM355631	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> strain BAC3041	HM355632	-	-	-	-	-	+	-
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain BAC3042	HM355633	-	-	-	-	-	+	-
<i>Microbacterium foliorum</i> strain BAC3043	HM355634	++	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus bataviensis</i> strain BAC3044	HM355635	-	-	-	-	-	+	-
<i>Sphingobacterium multivorum</i> strain BAC3045	HM355636	+	-	-	-	-	+	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> strain BAC3046	HM355637	-	-	-	-	-	+	-
<i>Microbacterium testaceum</i> strain BAC3047	HM355638	-	-	-	-	-	+	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain BAC3048	HM355639	-	-	-	+	-	+	-
<i>Staphylococcus kloosii</i> strain BAC3049	HM355640	-	-	-	-	-	-	-

Isolado	Número de acceso	Antagonismo <i>in vitro</i>			Enzimas líticas			Metabolito
		<i>C. lindemuthianum</i>	<i>R. solani</i>	<i>F. oxysporum</i>	Celulase	Pectinase	Protease	Sideróforo
<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> strain BAC3050	HM355641	++	-	-	-	-	+	-
<i>Methylobacterium populi</i> strain BAC3051	HM355642	-	-	-	-	-	+	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain BAC3052	HM355643	+	-	-	-	-	+	-
<i>Bacillus bataviensis</i> strain BAC3053	HM355644	-	-	-	-	-	-	-
<i>Methylobacterium populi</i> strain BAC3054	HM355645	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus warneri</i> strain BAC3055	HM355646	-	-	-	-	-	+	-
<i>Sporosarcina</i> sp. strain BAC3056	HM355647	-	-	-	+	-	+	+
<i>Acinetobacter</i> sp. strain BAC3057	HM355648	+	-	-	-	-	+	-
<i>Acinetobacter radioresistens</i> strain BAC3058	HM355649	+	-	-	-	-	-	-
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> strain BAC3059	HM355650	-	-	-	-	-	+	-
<i>Microbacterium testaceum</i> strain BAC1061	HM355651	-	-	-	-	-	+	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> strain BAC1062	HM355652	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain BAC1063	HM355653	-	-	-	-	-	+	-
<i>Methylobacterium populi</i> strain BAC1064	HM355654	-	-	-	-	-	-	-
<i>Microbacterium testaceum</i> strain BAC1065	HM355655	-	-	-	-	-	+	-
<i>Microbacterium testaceum</i> strain BAC1066	HM355656	-	-	-	-	-	-	-
<i>Microbacterium foliorum</i> strain BAC1067	HM355657	-	-	-	-	-	-	-
<i>Methylobacterium populi</i> strain BAC1068	HM355658	-	-	-	-	-	-	-
<i>Methylobacterium populi</i> strain BAC1069	HM355659	-	-	-	-	-	-	-
<i>Brevundimonas vesicularis</i> strain BAC1070	HM355660	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> strain BAC2071	HM355661	-	-	-	-	-	+	-
<i>Frigoribacterium faeni</i> strain BAC2072	HM355662	-	-	-	-	-	+	-
<i>Sphingomonas sanguinis</i> strain BAC2073	HM355663	-	-	-	-	-	+	-
<i>Staphylococcus warneri</i> strain BAC2074	HM355664	-	-	-	-	-	+	-
<i>Frigoribacterium faeni</i> strain BAC2075	HM355665	-	-	-	-	-	+	-

Isolado	Número de acceso	Antagonismo <i>in vitro</i>			Enzimas líticas			Metabolito
		<i>C. lindemuthianum</i>	<i>R. solani</i>	<i>F. oxysporum</i>	Celulase	Pectinase	Protease	Sideróforo
<i>Rhizobium larrymoorei</i> strain BAC2076	HM355666	-	-	-	+	-	+	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> strain BAC2077	HM355667	-	-	-	+	-	+	-
<i>Bacillus subtilis</i> strain BAC2078	HM355668	-	-	-	-	-	+	+
<i>Microbacterium testaceum</i> strain BAC2079	HM355669	-	-	-	-	-	-	-
<i>Microbacterium testaceum</i> strain BAC2080	HM355670	-	-	-	+	-	+	-
<i>Brevibacillus agri</i> strain BAC3081	HM355671	-	-	-	-	+	+	-
<i>Methylobacterium populi</i> strain BAC3082	HM355672	-	-	-	-	-	-	-
<i>Methylobacterium populi</i> strain BAC3083	HM355673	-	-	-	-	-	+	-
<i>Paenibacillus cineris</i> strain BAC3084	HM355674	-	-	-	-	+	+	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> strain BAC3085	HM355675	-	-	-	-	-	-	-
<i>Microbacterium foliorum</i> strain BAC3087	HM355676	-	-	-	-	-	+	-
<i>Methylobacterium populi</i> strain BAC3088	HM355677	-	-	-	-	+	-	-
<i>Staphylococcus warneri</i> strain BAC3089	HM355678	-	-	++	-	-	+	-
<i>Methylobacterium populi</i> strain BAC3090	HM355679	-	-	-	-	-	-	-
<i>Paenibacillus cineris</i> strain BAC1091	HM355680	-	-	-	+	-	-	-
<i>Microbacterium testaceum</i> strain BAC1092	HM355681	++	+	-	-	-	+	-
<i>Microbacterium testaceum</i> strain BAC1093	HM355682	+	-	-	-	-	-	-
<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> strain BAC1094	HM355683	-	-	-	-	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i> strain BAC1095	HM355684	-	-	-	-	-	+	-
<i>Bacillus muralis</i> strain BAC1096	HM355685	+	-	+++	-	-	-	-
<i>Microbacterium</i> sp. strain BAC1097	HM355686	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kocuria palustris</i> strain BAC1098	HM355687	+	-	-	-	-	+	-
<i>Microbacterium testaceum</i> strain BAC1099	HM355688	+	-	-	-	-	-	+
<i>Microbacterium testaceum</i> strain BAC1100	HM355689	-	-	-	-	-	-	+
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> strain BAC2101	HM355690	-	-	-	-	-	-	-

Isolado	Número de acceso	Antagonismo <i>in vitro</i>			Enzimas líticas			Metabolito
		<i>C. lindemuthianum</i>	<i>R.solani</i>	<i>F. oxysporum</i>	Celulase	Pectinase	Protease	Sideróforo
<i>Staphylococcus warneri</i> strain BAC2102	HM355691	-	-	-	-	-	-	-
<i>Methylobacterium populi</i> strain BAC2103	HM355692	+	-	-	-	-	-	-
<i>Delftia tsuruhatensis</i> strain BAC2104	HM355693	-	-	-	-	-	-	+
<i>Methylobacterium populi</i> strain BAC2105	HM355694	+	-	-	-	+	-	-
<i>Bacillus</i> sp. strain BAC2106	HM355695	++	-	-	-	-	+	-
<i>Staphylococcus warneri</i> strain BAC2107	HM355696	-	-	-	-	-	-	-
<i>Methylobacterium populi</i> strain BAC2108	HM355697	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus warneri</i> strain BAC2109	HM355698	-	-	-	-	-	-	-
<i>Frigoribacterium faeni</i> strain BAC2110	HM355699	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain BAC3111	HM355700	+++	++	+++	-	-	+	-
<i>Staphylococcus warneri</i> strain BAC3112	HM355701	+	-	-	-	-	+	-
<i>Methylobacterium populi</i> strain BAC3113	HM355702	-	-	-	-	-	-	-
<i>Dietzia cinnamea</i> strain BAC3114	HM355703	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain BAC3115	HM355704	+++	+	+++	-	-	+	-
<i>Staphylococcus warneri</i> strain BAC3116	HM355705	-	-	-	-	-	+	-
<i>Agromyces mediolanus</i> strain BAC3117	HM355706	-	-	-	-	-	-	-
<i>Agromyces mediolanus</i> strain BAC3118	HM355707	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus warneri</i> strain BAC3119	HM355708	-	-	-	-	-	-	-
<i>Stenotrophomonas</i> sp. strain BAC3120	HM355709	+++	++	+++	+	-	+	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain BAC3121	HM355710	++	-	-	-	-	+	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain BAC3122	HM355711	-	-	-	+	-	+	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain BAC3123	HM355712	++	-	-	-	-	+	-
<i>Agromyces mediolanus</i> strain BAC3124	HM355713	+	-	-	-	-	-	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain BAC3125	HM355714	-	-	-	+	-	+	-
<i>Microbacterium testaceum</i> strain BAC2126	HM355715	+	-	-	-	-	-	-

Isolado	Número de acceso	Antagonismo <i>in vitro</i>			Enzimas líticas			Metabolito
		<i>C. lindemuthianum</i>	<i>R. solani</i>	<i>F. oxysporum</i>	Celulase	Pectinase	Protease	Sideróforo
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain BAC2127	HM355716	++	-	-	+	-	+	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain BAC2128	HM355717	+++	++	+++	+	-	+	-
<i>Agromyces mediolanus</i> strain BAC2129	HM355718	+++	-	-	+	-	+	+
<i>Agromyces</i> sp. strain BAC2130	HM355719	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> strain BAC2131	HM355720	++	-	-	-	-	+	-
<i>Methylobacterium populi</i> strain BAC2132	HM355721	-	-	-	-	-	+	-
<i>Paenibacillus lautus</i> strain BAC2133	HM355722	-	-	-	-	-	+	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain BAC2134	HM355723	+++	++	-	+	-	+	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain BAC2135	HM355724	+++	++	+++	+	-	+	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain BAC1136	HM355725	+	-	-	-	-	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain BAC1137	HM355726	-	-	+	-	-	+	-
<i>Enterobacter asburiae</i> strain BAC1138	HM355727	-	-	-	-	-	+	-
<i>Enterobacter hormaechei</i> strain BAC1139	HM355728	-	-	+	-	-	-	+
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain BAC1140	HM355729	+	-	-	+	-	+	+
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain BAC1141	HM355730	-	-	-	-	-	-	+
<i>Rhizobium larrymoorei</i> strain BAC2142	HM355731	-	-	+	-	-	+	-
<i>Staphylococcus warneri</i> strain BAC2143	HM355732	-	-	-	-	-	+	-
<i>Staphylococcus</i> sp. strain BAC2144	HM355733	-	-	-	-	-	+	-
<i>Paenibacillus</i> sp. strain BAC2145	HM355734	-	-	-	-	-	+	-
<i>Bacillus bataviensis</i> strain BAC2147	HM355735	-	-	-	-	-	+	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain BAC3148	HM355736	+	-	-	-	-	+	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain BAC3149	HM355737	+	-	-	-	-	-	+
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain BAC3150	HM355738	-	-	-	-	-	+	-
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain BAC3151	HM355739	-	-	-	-	+	+	-
<i>Staphylococcus warneri</i> strain BAC1152	HM355740	-	-	-	+	-	+	+

Isolado	Número de acesso	Antagonismo <i>in vitro</i>			Enzimas líticas			Metabolito
		<i>C. lindemuthianum</i>	<i>R.solani</i>	<i>F. oxysporum</i>	Celulase	Pectinase	Protease	Sideróforo
<i>Microbacterium testaceum</i> strain BAC2153	HM355741	+	-	-	-	-	+	-
<i>Microbacterium testaceum</i> strain BAC3154	HM355742	-	-	-	-	-	+	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain BAC3155	HM355743	-	-	-	-	-	-	-
<i>Delftia tsuruhatensis</i> strain BAC1156	HM355744	+	-	-	-	-	+	-
<i>Microbacterium foliorum</i> strain BAC1157	HM355745	-	-	-	-	+	-	-
<i>Delftia tsuruhatensis</i> strain BAC2158	HM355746	-	-	-	-	+	-	-
<i>Delftia tsuruhatensis</i> strain BAC3159	HM355747	+++	-	-	-	+	-	+
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain BAC2160	HM355748	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhodococcus erythropolis</i> strain BAC2162	HM355749	-	-	-	-	-	+	-

† + zona de inibição entre 1 a 5 mm; ++ zona de inibição entre 6 a 15 mm; +++ zona de inibição > 15 mm; ††: + produziu a enzima/metabólito; - não produziu a enzima ou metabólito; ††† resultados positivos de produção de pectinase em pH 8,0 (pectato liase).