

Ecologia microbiana.

1993

LV-PP-1998.00109



CNPMA-3596-1

ECOLOGIA MICROBIANA



Editores

Itamar Soares de Melo

João Lúcio de Azevedo

Embrapa

Agricultura ecológica representa a chave para conciliar a preservação e a utilização racional dos recursos naturais ao mesmo tempo em que possibilita a manutenção da produção de alimentos e matérias-primas essenciais para o desenvolvimento da sociedade. De fato, os movimentos que têm conduzido à conscientização ecológica da sociedade, até poucos anos atrás, eram marcados mais por ações pragmáticas e, em muitas ocasiões, por falta de embasamento científico. Hoje, é comum verificar uma mudança no sentido de que as ações passam a ter base científica.

No âmbito desse enfoque ecológico, a publicação do livro **Ecologia e Agricultura Ecológica** representa uma importante contribuição à discussão da ecologia aplicada ao sistema de produção pecuária.

Johanna Döbereiner

EMBRAPA

AINFO / CNPMA

ECOLOGIA MICROBIANA

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

Presidente: Fernando Henrique Cardoso

Ministro da Agricultura e do Abastecimento: Francisco Sergio Turra

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Presidente: Alberto Duque Portugal

Diretores: Dante Daniel Giacomelli Scolari

José Roberto Rodrigues Peres

Elza Angela Battaglia Brito da Cunha

**Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação
de Impacto Ambiental**

Chefe Geral: Bernardo van Rajj

Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento: Deise M. Fontana Capalbo

Chefe Adjunto Administrativo: Rosângela Blotta Abakerli

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação
de Impacto Ambiental
Ministério da Agricultura e do Abastecimento

ECOLOGIA MICROBIANA

Editores
Itamar Soares de Melo
João Lúcio de Azevedo

Embrapa Meio Ambiente
Exemplares dessa publicação podem ser solicitados à:
Embrapa Meio Ambiente
Rodovia SP 340 – km 127,5 – Bairro Tanquinho Velho
Caixa Postal 69
13820-000 – Jaguariúna, SP
Fone: (019) 867-8700
Fax: (019) 867-8740
e.mail: edis@cnpma.embrapa.br

Produção gráfica: Regina Lucia Siewert Rodrigues
Franco Ferreira de Moraes
Normatização: Maria Amélia de Toledo Leme
Tiragem: 1.000 exemplares
Projeto gráfico e editoração eletrônica: Estúdio Graal

ECOLOGIA MICROBIANA

MELO, I.S. de; AZEVEDO, J.L. de, ed. Ecologia
microbiana. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998.
488p.

ISBN 85-85771-01-1

Inclui bibliografia

CDD-576.15

PREFÁCIO

A Ecologia Microbiana abrange o estudo das interações entre os microrganismos e suas interações com plantas e animais convivendo em um habitat comum. É, portanto, uma área das Ciências Biológicas de extrema importância para a manutenção do equilíbrio entre espécies e sua conservação, bem como para a preservação do ambiente.

O Brasil é, dentre todos os países do mundo, o que possui a maior biodiversidade. Entretanto, se por um lado ela está a nossa disposição, por outro lado ela ainda é pouco explorada. A conservação e o uso da diversidade biológica com finalidades econômicas ou sociais constitui um desafio que os brasileiros terão que enfrentar: quanto mais cedo isso acontecer, melhor será para o país. Assim como existe uma potencialidade muito grande para a exploração de plantas e animais, maior ainda é a potencialidade do uso de microrganismos. Infelizmente, quando se menciona a Ecologia e a manutenção das espécies, raramente os microrganismos são lembrados. Talvez pelo seu tamanho diminuto, esquece-se que a extinção de espécies microbianas, ocasionada por incêndios, desmatamentos, construção de represas e muitas outras causas, está ocorrendo possivelmente de maneira ainda mais acentuada do que em plantas e animais superiores. Mais ainda, sendo componentes indispensáveis dos ciclos biogeoquímicos, a perda da microbiota é extremamente danosa, levando a desequilíbrios biológicos, o que pode causar a extinção de espécies de plantas e animais. Os microrganismos são os responsáveis pelo controle natural de muitas doenças e pragas de vegetais e animais e pela degradação de agentes poluidores, são diretamente responsáveis pela fixação biológica do nitrogênio atmosférico e possuem muitas outras funções cruciais para a manutenção de espécies e do ambiente em que vivemos.

Há uma preocupação cada vez maior com o equilíbrio no ambiente, ameaçado pelo uso abusivo e indiscriminado de insumos agrícolas, dos mais diversos produtos químicos, poluição por resíduos industriais e por outras atividades antropogênicas. Assim, uma maior atuação nessa área é uma necessidade e não apenas um exercício acadêmico; ela é fundamental para a sobrevivência de todos os seres vivos, incluindo-se aí obviamente a espécie humana, principal causadora desses desequilíbrios.

Tendo em vista a importância da Ecologia Microbiana, a existência de um grupo de pesquisadores brasileiros que já atuam com competência na área e a quantidade limitada de material sobre o assunto publicado em língua portuguesa, surgiu naturalmente a idéia de reunir alguns tópicos sobre Ecologia Microbiana em um livro que pudesse estar acessível a estudantes de graduação e pós-graduação, outros profissionais e interessados nessa excitante área de conhecimento.

Seria praticamente impossível reunir, em um volume, todos os tópicos que atualmente fazem parte do vasto campo da Ecologia Microbiana. Foram especialmente incluídos temas que são de grande importância para países tropicais; nesse particular, a presente obra distingue-se de outras congêneres, publicadas em países de clima temperado. A seleção de temas também baseou-se em pesquisadores brasileiros que, com sua vivência, puderam acrescentar exemplos que se originaram de suas próprias pesquisas e, portanto, relacionadas com o que ocorre em nosso país. Foram contemplados temas que vão desde interações entre microrganismos benéficos e plantas, incluindo fungos endofíticos, bactérias diazotróficas, fungos micorrízicos etc., passando por técnicas de biologia molecular aplicadas à ecologia microbiana, contemplando PCR e eletroforese de campo pulsado, e atingindo finalmente tópicos mais especializados como os capítulos que tratam de biossíntese de antibióticos peptídicos, ecologia da esfermosfera, balanço de carbono em solos da Amazônia, sistemas suicidas para contenção de microrganismos recombinantes etc.

Um livro como este, para ser publicado, contou com o auxílio de um grande número de pessoas. Primeiramente, temos que agradecer aos autores dos diversos capítulos, que não mediram esforços em colaborar e apresentar temas, muitos deles ainda inéditos em publicações nacionais. Ainda, a presente edição só foi possível graças ao apoio recebido da Embrapa Meio Ambiente. Sinceros agradecimentos são extensivos a Maria Amélia de Toledo Leme, Regina S. Rodrigues e Maria Cristina Tordin pelo inestimável apoio na confecção desse volume.

Itamar Soares de Melo
João Lúcio de Azevedo

SUMÁRIO

PARTE I

ECOLOGIA DAS INTERAÇÕES PLANTAS X MICRORGANISMOS

1 ECOLOGIA DAS BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS NOS SOLOS TROPICAIS 15

Maria Cristina Prata Neves
Norma Gouvêa Rumjanek

2 ECOLOGIA DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES 61

Adriana Parada Dias da Silveira

3 RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS: DESCRIÇÃO E POTENCIAL DE USO NA AGRICULTURA 87

Itamar Soares de Melo

4 MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS 117

João Lúcio Azevedo

5 ECOLOGIA DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS FORMADORES DE ESCLERÓDIOS 139

Ana Maria Rodrigues Cassiolato

6 ECOLOGIA DA ESPERMOSFERA 167

Wilmar Cório da Luz

PARTE II

MÉTODOS AVANÇADOS DE ESTUDOS APLICADOS À ECOLOGIA MICROBIANA

7 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA E SUA APLICAÇÃO EM ESTUDOS GENÉTICOS E ECOLÓGICOS 187

Maria Cléria Valadares-Inglis
Itamar Soares de Melo

8 APLICAÇÕES DA PCR EM ECOLOGIA MOLECULAR 205

Maria Helena P. Fungaro
Maria Lúcia Carneiro Vieira

9 APLICAÇÕES DA TÉCNICA DE ELETROFORESE DE CAMPO PULSADO PARA SEPARAÇÃO DE CROMOSSOMOS DE MICRORGANISMOS 229

Aline A. Pizzirani-Kleiner
Gilda Santos Mühlen

10 USO DE TÉCNICAS NUCLEARES EM ECOLOGIA MICROBIANA 253

Siu Mui Tsai
Artur E. Ribeiro Bastos
David Henry Moon

11 MICROSCOPIA ELETRÔNICA APLICADA AOS ESTUDOS DE ECOLOGIA MICROBIANA 279

Neusa de Lima Nogueira
Paulo Augusto Vianna Barroso

**PARTE III
BIOLOGIA MOLECULAR**

12 BASE MOLECULAR DA INTERAÇÃO RHIZOBIUM-LEGUMINOSA 311

Maria José Valarini

13 BIOLOGIA MOLECULAR DE *STREPTOMYCES* E APLICAÇÕES INDUSTRIAIS 327

Gabriel Padilha

**PARTE IV
ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS**

14 ESTRATÉGIAS PARA ISOLAMENTO SELETIVO DE ACTINOMICETOS 351

Janete Magali de Araujo

15 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS 369

Dirce Mithico Yamaoka-Yano
Pedro José Valarini

**PARTE V
METABÓLITOS MICROBIANOS**

16 BIOSÍNTESE DE ANTIBIÓTICOS PEPTÍDICOS EM MICRORGANISMOS 393

Augusto Etchegaray

PARTE VI
BIOMASSA MICROBIANA

17 **BALANÇO DE CARBONO E BIOMASSA MICROBIANA
EM SOLOS DA AMAZÔNIA 423**

Brigitte Josefine Feigl
Carlos Clemente Cerri
Martinal Bernoux

PARTE VII
BIODIVERSIDADE

18 **BIODIVERSIDADE MICROBIANA E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO 445**

João Lúcio Azevedo

PARTE VIII
MONITORAMENTO AMBIENTAL

19 **O DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS SUICIDAS PARA A CONTENÇÃO
DE MICRORGANISMOS RECOMBINANTES NO AMBIENTE 465**

Andrea Balan Fernandes
Ana Clara G. Schenberg

10 PARTE VI NÍVELS DE ANÁLISIS DE ESTADOS DE BIOMASA MICROBIANA

17 EN SOLOS DE ARACÓLIA 123

11 MICROBIOLOGÍA DE LAS PLANTAS PARA LA AGRICULTURA 177

PARTE VII BIODIVERSIDADE

18 BIODIVERSIDADE MICROBIANA E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO 181

19 MONITORAMENTO AMBIENTAL 187

12 O DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS SÉCIS PARA A CONTINUAÇÃO DE MICROORGANISMOS RECOMENDADOS NO AMBIENTE 193

PARTE IV ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE MICROORGANISMOS

14 ESTRATÉGIAS PARA ISOLAMENTO DE MICROORGANISMOS 201

15 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS 207

PARTE V MICROBIOLOGIA MOLECULAR

16 ANÁLISES DE ÁCIDOS NUCLEICOS EM MICROORGANISMOS 213

1

ECOLOGIA DAS BACTÉRIAS
EUCIOTÓPICAS NOS SOLOS
TROPICAIS

PARTE I

ECOLOGIA DAS INTERAÇÕES PLANTAS X MICRORGANISMOS

1

ECOLOGIA DAS BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS NOS SOLOS TROPICAIS

Maria Cristina Prata Neves

Norma Gouvêa Rumjanek

EMBRAPA Agrobiologia

Caixa Postal 74505, CEP 23851-970, Rio de Janeiro, RJ

INTRODUÇÃO

As bactérias diazotróficas utilizam como fonte de nitrogênio para seu metabolismo o enorme reservatório de nitrogênio gasoso (N_2) da atmosfera (> 79%). O N_2 é pouco reativo e somente um grupo seletivo de seres vivos, algumas espécies de microrganismos procarióticos, bactérias e actinomicetos, possui o complexo enzimático chamado nitrogenase, necessário para transformá-lo em amônia que é subsequente assimilada em aminoácidos e proteínas. Esse processo é chamado fixação biológica de nitrogênio (FBN).

O N é um nutriente essencial para a vida e, em regiões tropicais, é frequentemente limitante da produção agrícola. São muitos os processos envolvidos na ciclagem desse importante elemento: desnitrificação, volatilização da amônia e queimadas (processos que retornam o N à forma gasosa) e lixiviação de nitratos para as camadas profundas do solo, conduzindo à perda do N nos ecossistemas. Além disso, o N dos solos agrícolas é exportado para as cidades, através da comercialização dos produtos. Como consequência, a maioria dos solos das regiões tropicais é deficiente em N, causando graves limitações à produção de alimentos. Somente os fertilizantes nitrogenados ou a FBN podem retornar o N perdido aos solos agrícolas.

A exploração agrícola da FBN nos países desenvolvidos tem sido motivada pela conscientização ecológica sobre o uso intensivo e, às vezes, abusivo dos agroquímicos. Esta ainda não é a grande preocupação em muitos países em desenvolvimento. Nestes países, a FBN representa a diminuição do custo da produção. De um modo ou de outro, a exploração agrícola da FBN depende do profundo conhecimento das bactérias diazotróficas, suas relações com as plantas superiores e com os demais membros da microflora do solo e da rizosfera. Neste capítulo, o enfoque é dado à ecologia das bactérias que se associam a plantas, comprovadamente ou potencialmente importantes para a agricultura nas regiões tropicais.

BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS DE IMPORTÂNCIA AGRÍCOLA

A lista de espécies diazotróficas cresce proporcionalmente à importância que a FBN assume nos sistemas de produção agrícola. Entretanto, a importância de outros microrganismos diazotróficos, que não as Rhizobiaceae, ainda está longe de ser bem avaliada. Existem indicações de que outras espécies possuem papéis importantes na ciclagem do nitrogênio do planeta, mas o desenvolvimento de metodologia adequada é indispensável para que se possa determinar a dinâmica populacional e a sua importância ecológica.

Bactérias heterotróficas de vida livre — Várias espécies diazotróficas vivem livres no solo (Tabela 1). Nos sistemas agrícolas, as bactérias de vida livre são limitadas pela disponibilidade de fontes de carbono no solo. A redução do N_2 atmosférico em compostos nitrogenados requer uma quantidade muito grande de energia, através do processo industrial ou do processo biológico da FBN (Neves, 1982). O potencial de algumas bactérias aeróbicas ou microaerofílicas de vida livre, como, por exemplo, *Azotobacter* spp. e *Azospirillum* spp., tem sido demonstrado por meio da inoculação de palhada ou outros resíduos ricos em carbono e sua incorporação ao solo (Hill & Patriquin, 1996), resultando em altas taxas de FBN. Em solos sujeitos a inundação, outras classes de microrganismos diazotróficos, inclusive anaeróbios, contribuem para o balanço de N do sistema (Roper & Ladha, 1995).

Organismos do gênero *Pseudomonas* formam um grupo heterogêneo, caracterizado por sua versatilidade catabólica, que possibilita a utilização de uma faixa muito ampla de substratos como fonte de car-

bono. Algumas espécies dentro desse gênero são diazotróficas e estima-se que estejam bem menos limitadas, quanto à fonte de energia, do que outros microrganismos diazotróficos de vida livre. Na rizosfera de algumas espécies vegetais, as espécies diazotróficas desse gênero costumam ser dominantes (Chen *et al.*, 1994a).

TABELA 1. Gêneros que incluem microrganismos diazotróficos de vida livre no solo (segundo Sprent & Sprent, 1990).

BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS	<i>Aquaspirillum</i>
Aeróbicas/Microaerofílicas	<i>Azotobacter</i>
	<i>Azotococcus</i>
	<i>Azomonas</i>
	<i>Azospirillum</i>
	<i>Beijerinckia</i>
	<i>Campylobacter</i>
	<i>Dexia</i>
	<i>Methylococcus</i>
	<i>Methylomonas</i>
	<i>Pseudomonas</i>
BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS	<i>Clostridium</i>
Anaeróbicas	
BACTÉRIAS AUTOTRÓFICAS	<i>Arthrobacter</i>
	<i>Xantobacter</i>
	<i>Alcaligenes</i>
BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS	<i>Bacillus</i>
Anaeróbicas facultativas	<i>Citrobacter</i>
	<i>Enterobacter</i>
	<i>Erwinia</i>
	<i>Escherichia</i>
	<i>Klebsiella</i>

Bactérias fototróficas e cianobactérias – A lista de bactérias diazotróficas dentro desta categoria é bastante extensa (Sprent & Sprent, 1990). Nos sistemas agrícolas estes microrganismos têm maior importância econômica, principalmente as espécies de cianobactérias (Tabela 1), mas se restringem principalmente à cultura do arroz inundado. As cianobactérias de vida livre ou em simbiose com a pteridófita aquática *Azolla* spp. têm

tido um papel importante na produção de arroz dos países asiáticos (Moore, 1969). As principais características destas associações, aspectos ecológicos, bem como limitações quanto ao seu uso agrícola, foram discutidos por Watanabe *et al.* (1989). No Brasil, a exploração agrícola da *Azolla* ainda não foi bem sucedida, devido principalmente à falta de tradição dos produtores e da necessidade de mão-de-obra intensiva.

Bactérias associadas às plantas – Muitas espécies de bactérias diazotróficas evoluíram no sentido de formar associações mais ou menos íntimas com as plantas, geralmente com as raízes e colmos de plantas superiores (Tabela 2). Neste caso, a planta supre os compostos de carbono necessários para a FBN. Diversas espécies de microrganismos diazotróficos associadas com vegetais têm sido identificadas atualmente, inclusive espécies endofíticas, indicando que o número desses microrganismos pode ser bem maior do que foi estimado a princípio.

A importância econômica das gramíneas tem motivado os estudos na área e o Brasil é pioneiro no estudo dessas associações (Döbereiner & Pedrosa, 1987). O potencial da fixação biológica de nitrogênio em contribuir N para o crescimento de algumas espécies de gramíneas já foi demonstrado para algumas forrageiras, como o *Paspalum notatum* cv. batatais, *Panicum maximum*, *Brachiaria decumbens*, *B. humidicola* (Boddey & Victoria, 1986; De-Polli *et al.*, 1977; Miranda *et al.*, 1990) e também para o arroz irrigado (App *et al.*, 1986; Boddey *et al.*, 1995). É muito provável, porém, que a FBN detectada nessas plantas seja o resultado da atividade não de uma, mas de várias espécies de microrganismos diazotróficos associados a elas.

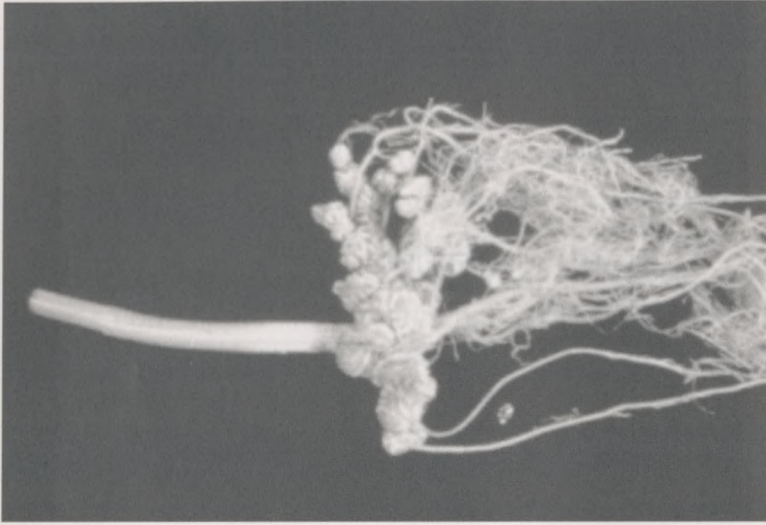
Actinorrizas – As associações simbióticas entre cerca de 200 espécies de angiospermas, de diferentes hábitos e habitats, pertencentes a 8 diferentes famílias (não-leguminosas) e actinomicetos do gênero *Frankia* (Newcomb & Wood, 1987), têm maior importância na silvicultura. A simbiose resulta na formação de nódulos quase sempre perenes. Os nódulos das actinorrizas são raízes modificadas, muito ramificadas, formando uma estrutura coralóide (Berry, 1994). Essas associações não têm sido muito estudadas ou exploradas no Brasil, com exceção da *Casuarina*, espécie arbórea cultivada para lenha.

Rizóbios – As bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* e *Azorhizobium* (coletivamente referidas neste capítulo como rizóbio), são microrganismos rizosféricos, que estabelecem associações simbióticas facultativas com as leguminosas (principalmente espécies das subfamílias Papilionoideae e Mimosoideae) e com *Parasponia*,

uma Ulmaceae (Trinick & Hadobas, 1988), formando estruturas especiais nas raízes ou caule, denominadas nódulos (Fig. 1).

TABELA 2. Microrganismos diazotróficos associados a plantas cultivadas.

ESPÉCIE	LOCALIZAÇÃO PLANTA HOSPEDEIRA	REFERÊNCIA
RIZOSFÉRICA		
<i>Beijerinckia fluminensis</i>	cana-de-açúcar	Döbereiner, 1961
<i>Pseudomonas diazotrophicus</i>	arroz	Ladha, 1986
<i>Azotobacter paspali</i>	<i>Paspalum notatum</i> cv. batatais	Döbereiner, 1966
ENDOFÍTICA FACULTATIVA		
<i>Azospirillum brasilense</i>	trigo, cevada, aveia, arroz, centeio	Döbereiner & De-Polli, 1980
<i>A. lipoferum</i>	milho, sorgo, gramíneas com via fotossintética C ₄	Döbereiner, 1982a
<i>A. amazonense</i>	cereais, gramíneas e palmeiras	Magalhães <i>et al.</i> , 1983
<i>A. irakense</i>	arroz	Khammas <i>et al.</i> , 1989
ENDOFÍTICA OBRIGATÓRIA		
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	cana-de-açúcar, arroz, milho, sorgo, gramíneas forrageiras	Olivares <i>et al.</i> , 1996
<i>H. rubrisubalbicans</i>	cana-de-açúcar	Olivares <i>et al.</i> , 1996
<i>Acetobacter diazotrophicus</i>	cana-de-açúcar, <i>Pennisetum purpureum</i> , batata-doce	Döbereiner, 1992
<i>Burkholderia</i> sp.	cana-de-açúcar, abacaxi batata-doce, mandioca	Baldani <i>et al.</i> , 1996a

**FIGURA 1.**

Nódulos radiculares formados por *Bradyrhizobium* spp. em feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*).

Numerosos estudos, objetivando levantamento, isolamento e seleção de rizóbio com características de tolerância a estresses, têm revelado um alto grau de diversidade nas populações de rizóbio do solo, principalmente nas regiões tropicais. Desde 1984, foram descritos 13 espécies e 2 gêneros (*Azorhizobium*, um rizóbio que forma nódulos caulinares e *Sinorhizobium*) (Tabela 3). O isolamento e a seleção de numerosas estirpes capazes de nodular o feijoeiro revelaram diferenças genéticas marcantes entre os isolados, resultando na identificação de 2 novas espécies dentro da antiga espécie *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*: *R. tropici* (Martínez-Romero *et al.*, 1991) e *R. etli* (Segovia *et al.*, 1993). Novos estudos têm indicado uma diversidade ainda maior, pois cerca da metade dos isolados obtidos dos solos dos cerrados brasileiros não apresenta similaridade com nenhuma das 3 espécies capazes de nodular o feijoeiro conhecidas até o momento (Mercante *et al.*, 1996).

O inventário das leguminosas arbóreas da região amazônica resultou em uma vasta coleção de rizóbios. Uma caracterização inicial dessa coleção demonstrou um alto grau de diferenciação (Moreira *et al.*, 1993). Alguns isolados de crescimento rápido mostraram grande semelhança com as espécies *R. loti*, *R. galegae*, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* e *S. fredii*, porém a maioria dos grupos não se assemelhou a nenhuma das espécies já descritas. A lista de espécies de rizóbio cresce a cada dia e muitas espécies poderão vir a ser descritas, à medida em que aumenta o conhecimento sobre as leguminosas tropicais e de respectivos rizóbios.

TABELA 3. Espécies de rizóbio e plantas associadas.

ESPÉCIE	REFERÊNCIAS
<i>Bradyrhizobium</i>	
<i>B. japonicum</i>	Jordan, 1982
<i>B. elkanii</i>	Kuykendall <i>et al.</i> , 1992
<i>B. liaoningense</i>	Xu <i>et al.</i> , 1995
<i>Rhizobium</i>	
<i>R. loti</i>	Jordan, 1984
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	Jordan, 1984
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	Jordan, 1984
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i>	Jordan, 1984
<i>R. galegae</i>	Lindström, 1989
<i>R. tropici</i>	Martinez-Romero <i>et al.</i> , 1991
<i>R. huakuii</i>	Chen <i>et al.</i> , 1991
<i>R. etli</i>	Segóvia <i>et al.</i> , 1993
<i>R. ciceri</i>	Nour <i>et al.</i> , 1994
<i>R. tianshanense</i>	Chen <i>et al.</i> , 1995
<i>R. hainanensis</i>	Chen <i>et al.</i> , 1994b
<i>R. mediterraneum</i>	Nour <i>et al.</i> , 1995
<i>Azorhizobium</i>	
<i>A. caulinodans</i>	Dreyfus <i>et al.</i> , 1988
<i>Sinorhizobium</i>	
<i>S. fredii</i>	Scholla & Elkan, 1984; Lajudie <i>et al.</i> , 1994
<i>S. xinjiangensis</i>	Chen <i>et al.</i> , 1988
<i>S. saheli</i>	Lajudie <i>et al.</i> , 1994
<i>S. teranga</i>	Lajudie <i>et al.</i> , 1994
<i>S. meliloti</i>	Lajudie <i>et al.</i> , 1994

A simbiose rizóbio/leguminosa representa o sistema fixador de N de maior importância para a agricultura e por isso os rizóbios têm sido os microrganismos diazotróficos mais estudados e serão objeto de maior detalhamento neste capítulo.

INTERAÇÕES ENTRE MICRORGANISMOS DIAZOTRÓFICOS E PLANTAS SUPERIORES

Os solos das regiões tropicais são freqüentemente pobres em matéria orgânica e deste modo, o suprimento de compostos ricos em energia costuma ser limitante. Os microrganismos diazotróficos evoluíram no sentido de colonizarem a rizosfera das plantas, beneficiando-se assim dos compostos ricos em carbono, que são exsudados pelas raízes.

Grande número de plantas cultivadas mantém em suas raízes uma população ativa de microrganismos diazotróficos. Muitas dessas associações sofreram especializações ao longo do processo evolutivo, resultando em relações muito estreitas entre a planta e a bactéria e culminando com a invasão dos tecidos do vegetal pela bactéria, inclusive promovendo a formação de estruturas especializadas (um nicho adequado onde as trocas gasosas e de nutrientes passam a ser mais eficientes), que garantem proteção contra fatores adversos do solo (Sprent & Faria, 1989).

CARACTERIZAÇÃO DE ALGUMAS ASSOCIAÇÕES

Associações rizosféricas – O *Paspalum notatum* é uma gramínea forrageira comum nas regiões tropicais. A planta se associa especificamente à espécie diazotrófica *Azotobacter paspali* (Döbereiner, 1966). Trata-se talvez da associação mais específica até hoje relatada: a bactéria parece só se estabelecer na rizosfera e rizoplano ou mesmo invadir as camadas externas do córtex de um dos ecotipos dessa gramínea, o ecotipo tetraplóide, *P. notatum* cv. batatais, na qual foi encontrada em 93% das cerca de 250 amostras testadas. Muito raramente é encontrada associada a outros ecotipos ou espécies de *Paspalum*, não ocorrendo em outros gêneros de gramíneas (Döbereiner, 1970).

A capacidade dessa associação em contribuir com nitrogênio para o crescimento das plantas foi demonstrada (De-Polli *et al.*, 1977) e esti-

mada por Boddey *et al.* (1983) em 30 kg N por hectare por ano. Nada se sabe sobre os mecanismos que resultam no estabelecimento de associação tão específica, porém é possível especular que possam existir compostos semelhantes aos envolvidos na comunicação entre leguminosas/rizóbio.

As espécies de *Beijerinckia* (*B. derxii*, *B. mobilis*, *B. indica* e *B. fluminensis*), bastante tolerantes à acidez, são bactérias comuns nos solos das regiões tropicais, mas encontradas, inclusive, em regiões temperadas (Döbereiner & Pedrosa, 1987). As espécies *B. indica* e *B. fluminensis* têm sido mais freqüentemente encontradas em solos de canaviais e principalmente na rizosfera e rizoplano da cana-de-açúcar (Döbereiner, 1959). Parece ocorrer um enriquecimento seletivo em favor dessas bactérias nas regiões do solo próximas das plantas, onde exsudatos radiculares são liberados, e também na área entre linhas de plantio, onde os exsudatos foliares, lavados pelas chuvas, são depositados (Döbereiner & Alvahydo, 1959).

Pelo menos 3 espécies de *Bacillus* são descritos como diazotróficos: *B. polymixa*, *B. macerans* e *B. azotofixans*. Esta última espécie é freqüentemente isolada de solo e raízes de cana-de-açúcar, trigo e outras gramíneas (Seldin *et al.*, 1984) e foi recentemente transferida para o gênero *Paenibacillus* (Rosato *et al.*, 1995). A característica interessante desta espécie está relacionada com sua capacidade de FBN, mesmo em presença de níveis altos de nitrato e com a produção de substâncias antimicrobianas.

Associações com infecção da planta hospedeira – Até o momento são conhecidos quatro grupos de microrganismos diazotróficos heterotróficos capazes de infectar a planta hospedeira: 1) *Azospirillum* e outras bactérias endofíticas facultativas, 2) *Acetobacter* e outras bactérias endofíticas obrigatórias, 3) *Frankia* e 4) as diversas espécies de rizóbios. Os mecanismos que levam à infecção de plantas por microrganismos diazotróficos foram bem discutidos por Sprent & Faria (1989).

Antes que a infecção de raízes possa ocorrer, a bactéria deve colonizar a rizosfera da planta e a superfície das raízes (Fig. 2). Essa etapa envolve pelo menos 4 eventos: 1) quimiotaxia; 2) reconhecimento; 3) adesão e 4) fornecimento de nutrientes. As bactérias podem penetrar nas raízes ou nas hastes do vegetal, quando ocorre o crescimento de uma raiz lateral ou adventícia, através dos pêlos radiculares ou ainda entre células danificadas da epiderme do vegetal. O movimento subse-

quente das bactérias pode ser intercelular, através da digestão da lamela média, via espaços intercelulares ou através das células, quando, então, as bactérias ficam confinadas pela planta hospedeira em cordões de infecção, formados por material da parede celular.

Associações com bactérias endofíticas facultativas – A espécie *Spirillum lipoferum* foi redescoberta no Brasil como bactéria diazotrófica associada à rizosfera e raízes de várias gramíneas (Döbereiner & Day, 1976) e, logo depois, reclassificada como gênero novo *Azospirillum* (Tarrand *et al.*, 1978). Cinco espécies estão atualmente descritas: *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. halopraeferans* e *A. irakense* (Döbereiner *et al.*, 1995a), todas elas de ocorrência em regiões tropicais. Nestas duas décadas de pesquisa, um volume considerável de informações foi acumulado sobre as associações dessas bactérias com diversas espécies de gramíneas (Baldani *et al.*, 1996a). Em todas essas associações não ocorrem formações de estruturas especializadas para abrigar a bactéria, e inicialmente se acreditava que toda a atividade de FBN observada nestas associações ocorria na rizosfera das plantas.

O *Azospirillum* apresenta ampla distribuição nos solos (Döbereiner & De-Polli, 1980). Pouco se sabe, porém, sobre a sobrevivência do *Azospirillum* no solo na ausência da planta hospedeira, mas tem sido demonstrado que a bactéria apresenta vários mecanismos fisiológicos de proteção (formação de cistos, produção de melanina, de poli- β -hidroxibutirato e de polissacarídeos), que podem facilitar a sobrevivên-

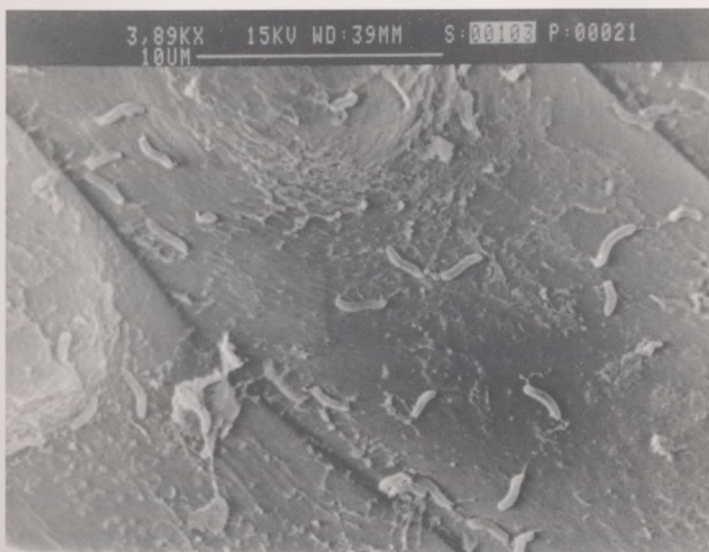


FIGURA 2.

Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura mostrando bactérias do gênero *Herbaspirillum* aderidas às células da raiz de cana-de-açúcar (cortesia de F.L. Olivares).

cia em condições desfavoráveis (Del Gallo & Fendrik, 1994). O *Azospirillum* é, entretanto, uma bactéria predominantemente rizosférica (Freitas *et al.*, 1981; Magalhães *et al.*, 1979).

O padrão de colonização das raízes das gramíneas pelas espécies de *Azospirillum* mostra uma tendência de especificidade entre grupos de plantas e as bactérias: *A. lipoferum* ocorre preferencialmente no córtex de milho, sorgo e de diversas outras gramíneas com a via fotossintética C_4 , mas foi também observada em uma espécie de ciperácea (Döbereiner, 1982a), enquanto *A. brasilense* ocorre preferencialmente associado a trigo, cevada, aveia, arroz, centeio e gramíneas com via C_3 (Döbereiner & De-Polli, 1980; Rocha *et al.*, 1981). *A. halopraeferans* é mais específica, tendo sido isolada apenas de uma espécie de gramínea, o 'kallar grass' (*Leptochloa fusca*), planta nativa do Paquistão, altamente tolerante a solos salinos (Reinhold *et al.*, 1987). Já a espécie *A. irakense*, descrita recentemente, tem sido apenas isolada de raízes de arroz (Khammas *et al.*, 1989).

Os efeitos da colonização do *Azospirillum* sobre a morfologia e fisiologia das raízes das plantas com as quais se associam são marcantes (Okon & Kapulnik, 1986). Têm sido observadas alterações na densidade e no comprimento dos pêlos radiculares, resultando no aumento da superfície do sistema radicular e permitindo melhor exploração dos nutrientes e água do solo (Okon *et al.*, 1996). Tais efeitos são associados à capacidade deste e outros microrganismos diazotróficos rizosféricos liberarem substâncias promotoras do crescimento: IAA, giberelinas e citocininas (Tien *et al.*, 1979).

Certas estirpes de *Azospirillum* podem invadir as raízes, através da lamela média dos tecidos mais velhos, formando áreas transparentes, que sugerem hidrólise das células do vegetal por enzimas pectinolíticas, produzidas por essas bactérias (Hubbell *et al.*, 1978). Em plantas de milho crescidas no campo, a infecção dos tecidos das raízes e colmos pela bactéria ocorre apenas no período reprodutivo das plantas (Magalhães *et al.*, 1979), período em que também se observam as maiores taxas de atividade da nitrogenase. Observações semelhantes já foram relatadas para arroz (Watanabe & Barraquio, 1979) e trigo (Kavimandan *et al.*, 1978).

A infecção do interior das raízes de gramíneas não é característica generalizada das estirpes de *A. brasilense* e parece restrita à estirpe Sp245 (Baldani *et al.*, 1987; Hartmann *et al.*, 1995). Dentro da planta, as

bactérias ficam livres da competição com os demais habitantes da rizosfera e as trocas de nutrientes entre estas e a planta hospedeira se tornam muito mais efetivas.

Apesar das propriedades fisiológicas do *Azospirillum* em meio de cultura já terem sido objeto de muitos estudos, ainda se conhece pouco sobre os mecanismos envolvidos na interação planta/bactéria, devido principalmente à ausência de um fenótipo facilmente detectável após a inoculação das plantas. Porém, através de métodos indiretos, tem sido possível mostrar que mecanismos semelhantes aos que ocorrem entre o rizóbio e as leguminosas (Fig. 3) parecem estar envolvidos na ligação das bactérias com a superfície da raiz (Del Gallo & Fendrik, 1994), inclusive com a participação de polissacarídeos bacterianos (Katupitiya *et al.*, 1995). Mais recentemente, moléculas sinalizadoras isoladas das raízes, mas ainda não totalmente identificadas, foram descobertas e seu estudo vai possibilitar o melhor entendimento dos processos que conduzem ao estabelecimento da associação (Van Bastelaere *et al.*, 1995).

Dados acumulados em mais de 20 anos de pesquisa demonstram que, em 60-70% dos experimentos feitos, há um efeito benéfico da inoculação de *Azospirillum* sobre o crescimento ou produção de algumas culturas de cereais e até de leguminosas (Okon *et al.*, 1996). Em alguns desses experimentos, a inoculação com *Azospirillum* proporcionou incorporação de nitrogênio via FBN (Garcia de Salamone, 1993). Em Israel, onde o *Azospirillum* não ocorre abundantemente nos solos, tem sido possível observar efeitos benéficos da inoculação de *Azospirillum* spp. sobre a produção de cereais, principalmente através da produção de substâncias promotoras de crescimento (Okon, 1985). No Brasil, porém, o microrganismo ocorre em profusão nos solos agrícolas, limitando a introdução de estirpes selecionadas. Porém, com o uso de estirpes selecionadas e marcadas com resistência a antibióticos, foi possível observar o efeito da inoculação do *Azospirillum brasilense* em plantas de sorgo, trigo (Baldani *et al.*, 1986a) e milho, sendo o efeito benéfico da inoculação de algumas estirpes (Sp245) relacionado principalmente com o melhor aproveitamento dos nitratos do solo (Boddey *et al.*, 1986; Ferreira *et al.*, 1987).

Associações com bactérias endofíticas obrigatórias – O interior das plantas representa um habitat rico em substratos de carbono e livre de diversos fatores adversos que limitam as populações de bactérias no solo e rizosfera. A colonização endofítica de plantas sempre foi, entre-

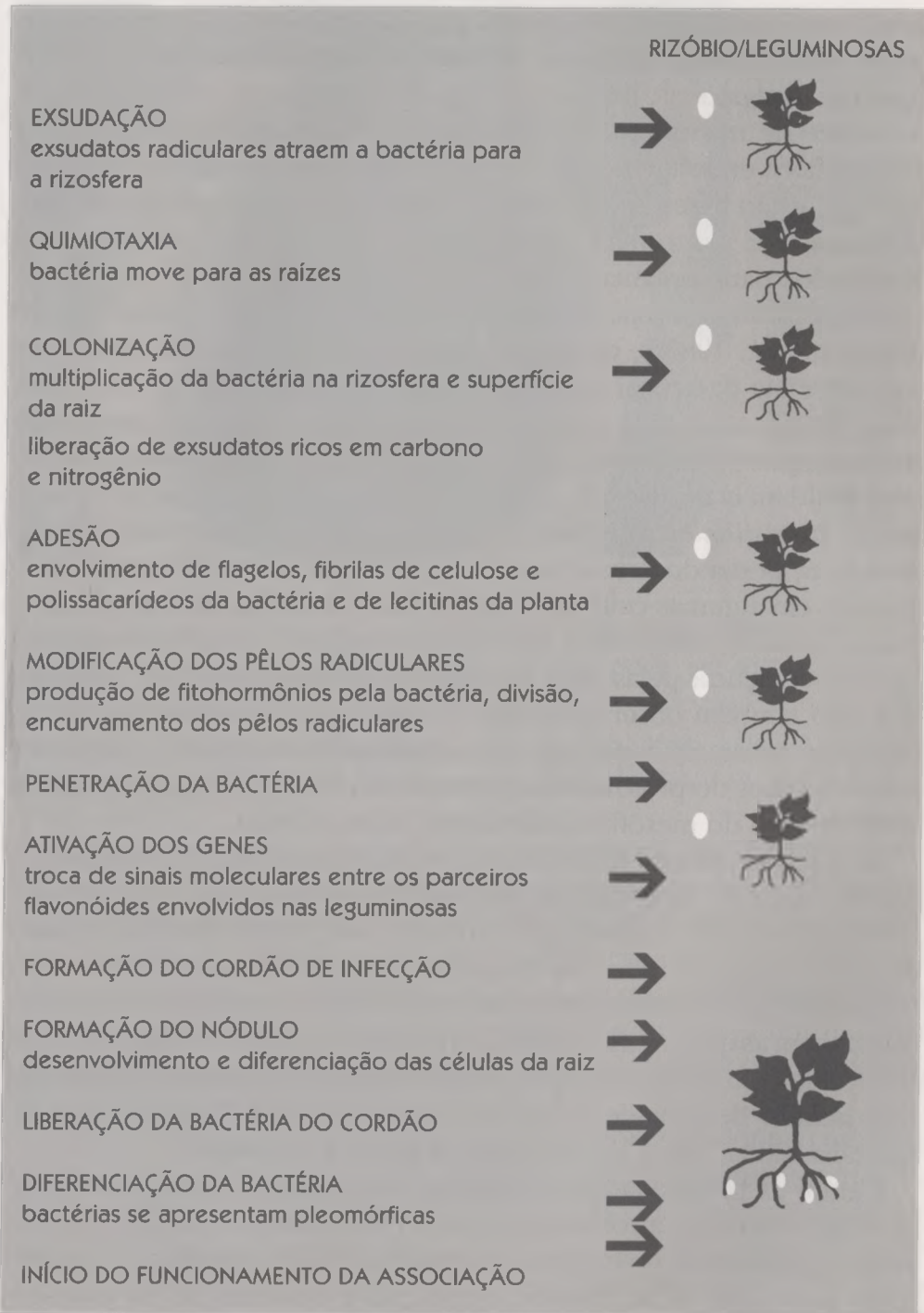


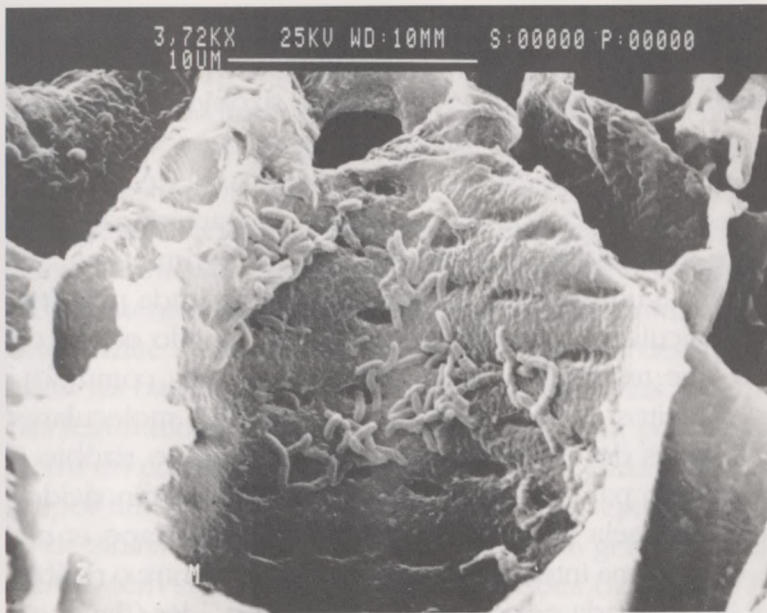
FIGURA 3. Esquema das etapas envolvidas nos processos de associação entre *Azospirillum*/Gramíneas e Rizóbio/Leguminosas.

tanto, considerada restrita a bactérias fitopatogênicas. A recente descoberta de bactérias diazotróficas endofíticas, predominantemente ou totalmente obrigatórias, trouxe uma nova dimensão aos estudos das associações de microrganismos diazotróficos e plantas superiores. Os diazotróficos endofíticos não sofrem limitação de substâncias ricas em carbono, estão livres de competição com outros microrganismos e podem transferir muito mais eficientemente os compostos nitrogenados produzidos para a planta.

Herbaspirillum seropedicae pode ser isolado de arroz, milho e sorgo (Baldani *et al.*, 1986b), de raízes, folhas e colmos de *Pennisetum purpureum*, cana-de-açúcar e diversas gramíneas invasoras (Fig. 2, Olivares *et al.*, 1996). A bactéria sobrevive muito mal no solo, desaparecendo em menos de 30 dias após sua inoculação com grande número de células (Baldani *et al.*, 1996a). *H. rubrisubalbicans* (previamente *Pseudomonas rubrisubalbicans*, Baldani *et al.*, 1996b) vive associado à cana-de-açúcar, podendo causar uma doença conhecida como "estria mosqueada" em algumas cultivares suscetíveis. Através da microscopia eletrônica pode ser observada a intensa colonização dos tecidos vasculares da cana-de-açúcar pelas duas espécies de *Herbaspirillum*. As bactérias têm sido também observadas nos estômatos da cana-de-açúcar e nas cultivares sensíveis à doença. *H. rubrisubalbicans* parece preencher todos os vasos do protoxilema e metaxilema (Fig. 4), além dos espaços intercelulares do mesófilo (Döbereiner *et al.*, 1995b).

Acetobacter diazotrophicus é uma bactéria diazotrófica endofítica obrigatória, adaptada às condições de pressão osmótica e pH, que prevalecem no interior da cana-de-açúcar (Gillis *et al.*, 1989). Tem sido isolada de raízes, colmos e folhas de cana-de-açúcar, *Pennisetum purpureum* e batata-doce (Döbereiner, 1992), não tendo sido encontrada no solo. As plantas com as quais se associa têm em comum um alto teor de carboidratos nos tecidos e o hábito vegetativo de propagação. *A. diazotrophicus* tem sido isolado de cana-de-açúcar em diversos países (Uruguai, México, Austrália, Cuba, África do Sul), onde a planta é cultivada.

Dentre as propriedades fisiológicas características dessa espécie de bactéria destaca-se a tolerância a altas concentrações de sacarose e à acidez e habilidade de excretar o nitrogênio fixado, conforme demonstrado por Cojho *et al.* (1993). A infecção e colonização da cana-de-açúcar pelo *Acetobacter* tem sido demonstrada por meio de microscopia eletrônica e ótica (James *et al.*, 1994; Olivares *et al.*, 1996). Na superfí-

**FIGURA 4.**

Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura mostrando bactérias do gênero *Herbaspirillum* associadas aos vasos do metaxilema presentes na base do colmo de cana-de-açúcar (cortesia de F.L. Olivares).

cie da raiz, a bactéria se concentra nas regiões de junção de raízes laterais (James *et al.*, 1994). Dentro da raiz, pode ser vista dentro de células da epiderme e nos espaços intercelulares do parênquima, bem como dentro de vasos do xilema, através dos quais a bactéria parece migrar para a parte aérea da cana-de-açúcar (Dong *et al.*, 1994; Reis Jr. *et al.*, 1995).

O potencial das associações de microrganismos diazotróficos com a cana-de-açúcar foi recentemente avaliado (Boddey *et al.*, 1995) e estimado como capaz de suprir até 60% das necessidades de N desta cultura, garantindo o bom crescimento das plantas, mesmo em solos pobres. Resta, porém, determinar qual ou quais dos diferentes microrganismos diazotróficos rizosféricos e endofíticos que ocorrem na cana-de-açúcar são os responsáveis pelas altas taxas de FBN observadas em algumas cultivares.

Um novo gênero de microrganismo diazotrófico endofítico está sendo objeto de estudos recentes: *Burkholderia*, recentemente criado a partir de estirpes antes incluídas no gênero *Pseudomonas* (Yabuuchi *et al.*, 1992). Estirpes pertencentes a diferentes espécies dentro desse gênero foram isoladas de arroz no Vietnã (Tran Van *et al.*, 1994) e de cana-de-açúcar, batata-doce, mandioca e arroz, no Brasil (Baldani *et al.*, 1996a). A lista de microrganismos diazotróficos endofíticos compreen-

de também as espécies de *Azoarcus* (Reinhold-Hurek *et al.*, 1993), de ocorrência restrita à espécie de gramínea *Leptochloa fusca* (kallar grass).

Simbiose leguminosas/rizóbio – A simbiose rizóbio/leguminosa representa o sistema fixador de N_2 de maior importância para a agricultura e, em mais de um século de estudos, uma vasta gama de conhecimentos vem sendo acumulada sobre a ecologia da bactéria de vida livre no solo e sobre a simbiose estabelecida com as leguminosas.

A simbiose entre as leguminosas e os rizóbios, caracterizada pela formação de nódulos radiculares ou caulinares (Fig. 1) tem sido objeto de estudos complexos, que resultaram na identificação de uma comunicação entre os dois parceiros, mediada pela troca de sinais moleculares específicos (Fig. 3). Antes do estabelecimento da simbiose, o rizóbio é quimiotaticamente atraído para a rizosfera por compostos (aminoácidos ou açúcares) exsudados pela planta (Aguilar *et al.*, 1988; Kape *et al.*, 1991). A partir daí, ocorre uma interação química específica entre o rizóbio e a planta hospedeira, mediada pela produção de flavonóides (flavonas, flavanonas e isoflavonas) pelas raízes (Hungria, 1994). Os flavonóides são indutores potentes e a presença de diversos indutores em concentrações sub-ótimas pode resultar numa resposta sinérgica da expressão gênica. Os flavonóides exsudados ativam o funcionamento dos genes *nod* e *nol*, presentes no cromossomo das espécies de *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* ou contidos nos plasmídeos simbióticos das espécies de *Rhizobium*. Os genes *nod* podem ser de dois tipos: comuns e relacionados com a especificidade hospedeira. A organização destes genes é muito conservada nas diferentes espécies de rizóbio. Os genes *nod* ABC são considerados essenciais para o processo da nodulação. Além destes, o gene *nodD* é atualmente considerado como responsável pela especificidade (Spaink, 1994). Uma série de outros genes tem sido também descrita como responsável pela especificidade. O gene *nodD*, ao contrário dos demais, é um gene estrutural, ou seja, sua síntese ocorre independentemente de qualquer estímulo e por isso a proteína Nod D está sempre presente na célula bacteriana. O conjunto desses genes é responsável pela produção dos fatores de nodulação, que são substâncias do tipo dos oligossacarídeos. A interação dos flavonóides e a proteína Nod D resulta na alteração conformacional da proteína Nod D, que faz com que os genes *nod* sejam induzidos (Schlaman *et al.*, 1992). Os genes induzidos passam a sintetizar proteínas com atividade catalítica, que são responsáveis pela síntese de lipooligossacarídeos. A estrutura dos lipooli-

gossacarídeos está relacionada à faixa de hospedeiros de uma dada espécie de rizóbio. *Bradyrhizobium elkanii*, uma espécie de rizóbio que produz diversos lipooligossacarídeos apresenta uma faixa maior de hospedeiros do que *B. japonicum*, que é capaz de sintetizar um número menor destas substâncias (Carlson *et al.*, 1993). Os lipooligossacarídeos são liberados pela bactéria e, se forem reconhecidos pelas células da raiz, desencadearão uma série de alterações na estrutura desse órgão, iniciadas pelo encurvamento do pêlo radicular e formação de um cordão de infecção, que permite a entrada de bactérias e posterior desenvolvimento dos nódulos. As bactérias são posteriormente liberadas do cordão de infecção (nas leguminosas primitivas e na *Parasponia*, porém, o rizóbio persiste dentro do cordão) e passam a infectar as células vegetais (Fig. 5), contidas por um envelope membranoso que as separa do citoplasma. As trocas de sinais moleculares e os mecanismos genéticos de controle da nodulação têm sido objeto de várias revisões (Long, 1989).

De modo geral, pode ser observada especificidade na formação do nódulo. Entretanto, tem sido demonstrado que várias leguminosas podem ser noduladas por espécies diferentes de rizóbio, incluindo espécies de crescimento lento e de crescimento rápido (Moreira *et al.*, 1993;

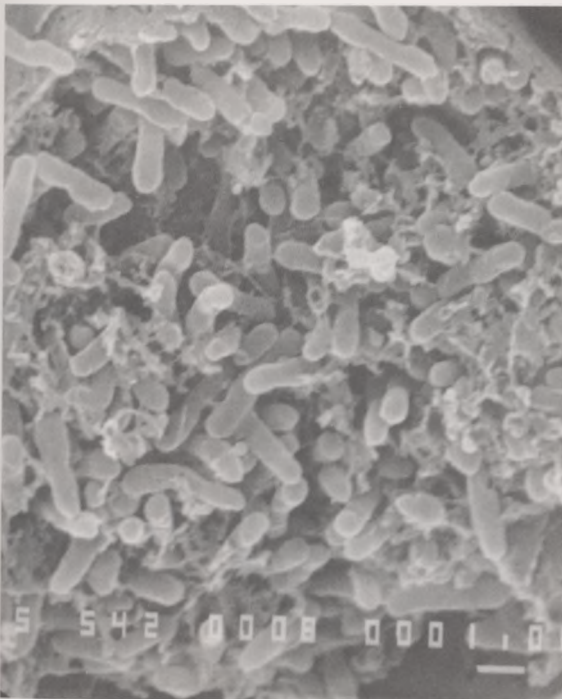


FIGURA 5. Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura mostrando células do nódulo radicular de leguminosa do gênero *Pterocarpus* infectadas por rizóbio; barra corresponde a 1 mm (cortesia de S.M. de Faria).

Padmanabham *et al.*, 1990; Pankhurst, 1977), o que é uma indicação de que vários compostos indutores e inibidores podem estar envolvidos durante a formação do nódulo.

O compartilhamento de estirpes por leguminosas como a soja (*Glycine max*), o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) e o feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) tem-se revelado surpreendente e foi recentemente revisado por Neves & Rumjanek (1996): a soja, por exemplo, pode ser nodulada por espécies de crescimento lento, *B. japonicum* e *B. elkanii*, e de crescimento rápido, *S. fredii*. Recentemente, foi demonstrado que pelo menos 3 outras espécies de rizóbio são capazes de nodular a soja. Além da soja, *S. fredii* nodula também o feijão e cerca de 60 outras espécies, enquanto espécies de rizóbio que nodulam feijão são capazes de nodular muitas outras leguminosas, incluindo espécies tropicais, como o feijão-de-corda, que nodulam com grande grupo de rizóbios de crescimento lento (grupo caupi ou grupo tropical de inoculação cruzada). Já foi demonstrado também que *B. japonicum* e *B. elkanii* nodulam espécies de leguminosas arbóreas tropicais (Moreira *et al.*, 1993). À medida que mais estudos são realizados sobre a biodiversidade desse grupo de bactérias, observa-se que tanto uma espécie de leguminosa pode ser nodulada por várias de rizóbio como o inverso também pode acontecer. Um alto grau de especificidade em relação ao hospedeiro parece ser a exceção e não a regra (Fig. 6).

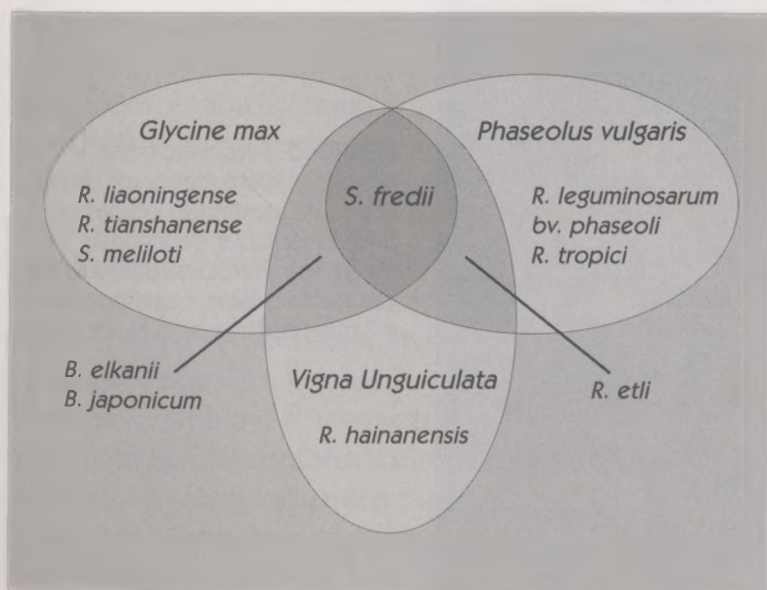


FIGURA 6. Compartilhamento de estirpes de diferentes espécies de rizóbio pelo feijão comum, feijão-de-corda (caupi) e soja.

ASSOCIAÇÕES DE MICRORGANISMOS DIAZOTRÓFICOS E PLANTAS: EVOLUÇÃO CONCOMITANTE?

O entendimento dos processos evolucionários, que culminaram com o estabelecimento de associações entre plantas e microrganismos diazotróficos, levando inclusive à formação de estruturas especializadas como as actinorrizas e os nódulos radiculares ou caulinares nas simbioses rizóbio/leguminosas, representa a chave para a manipulação dos sistemas visando maior aproveitamento da FBN nas espécies de interesse econômico.

No caso das leguminosas, a hipótese mais recente considera dois eventos iniciais: um com o *Rhizobium* e outro com o *Bradyrhizobium*, seguindo-se a coevolução das espécies (Sprent, 1994). A situação aparentemente caótica de relacionamento entre a planta hospedeira e o rizóbio que se observa agora (Moreira *et al.*, 1993), dever-se-ia à mudança no clima e às conseqüentes pressões seletivas que se seguiram em cada região específica. Planta e rizóbio passaram a se adaptar às condições locais de clima e solo, com a população de rizóbio sofrendo transferência lateral de material genético. Como resultado, o padrão de coevolução não poderia mais ser observado nos tempos atuais. Esta hipótese, postulada por Sprent (1994), consegue conciliar observações tais como: a enorme diversidade de rizóbios capazes de nodular *acacia*, compreendendo estirpes de crescimento rápido, lento e muito lento (Barnet & Catt, 1991); rizóbios isolados de leguminosas arbóreas, tolerantes a temperaturas adversamente altas e capazes de nodular também o feijoeiro (Hungria *et al.*, 1993).

DIVERSIDADE DO RIZÓBIO ENCONTRADO NO SOLO

Os rizóbios são microrganismos heterotróficos comuns dos solos tanto das regiões temperadas como das regiões tropicais, mas não são membros dominantes da comunidade microbiana. Nas regiões de origem da planta hospedeira, rizóbios nativos estão sempre presentes no solo: por exemplo, *Bradyrhizobium* nodulando *Stylosanthes* nos solos dos cerrados (Scotti *et al.*, 1982), *R. etli* nodulando feijão em solos mexicanos (Segóvia *et al.*, 1993), *R. fredii* e *B. japonicum* nodulando soja na China (Dowdle & Bohlool, 1985). Quando a leguminosa hospedeira é introduzida em um novo ambiente, geralmente não se observa a nodulação da mes-

ma, a não ser que as sementes sejam inoculadas com estirpes específicas ou simplesmente misturadas com o solo da região de origem. As áreas tradicionalmente cultivadas com uma leguminosa geralmente contêm uma população de rizóbio bem adaptada às condições locais.

Assume-se freqüentemente que os solos cultivados nas regiões tropicais possuem uma população relativamente grande de rizóbios. Porém, alguns levantamentos têm mostrado grande variabilidade na população de rizóbio dos solos agrícolas e que áreas de boa nodulação, às vezes, representam uma pequena proporção da área cultivada. Baixas populações de rizóbio, menos de 100 células por grama de solo, têm sido freqüentemente observadas nas regiões tropicais, em solos cultivados com diferentes leguminosas (Wani *et al.*, 1995). Estimativas da população de mais de 300 amostras de solo provenientes de 17 países tropicais indicaram que, apesar dos rizóbios do grupo caupi de inoculação cruzada estarem presentes em quase todos os solos, os números dessas bactérias eram extremamente variáveis, e em 46% das amostras havia menos que 100 rizóbios por grama solo (Singleton *et al.*, 1992). No caso da soja, feijão e leucena, esta condição (menos de 100 rizóbios por grama de solo) foi encontrada em 75, 64 e 75% dos solos estudados. Por outro lado, a ocorrência de nodulação não garante adequada contribuição da FBN frente às necessidades de nitrogênio da planta hospedeira. Nódulos ineficientes, muitas vezes, ocorrem em grande número (Wani *et al.*, 1995), limitando a contribuição da FBN.

A população total de rizóbio se correlaciona com a média anual de chuva, com a cobertura de leguminosa, a biomassa da parte aérea, a temperatura e o pH do solo e com a disponibilidade de fósforo (Woomer *et al.*, 1988). A população de rizóbio do solo está relacionada também com o histórico de cultivo da área. O plantio recente da leguminosa hospedeira é capaz de promover o aumento da população de rizóbio homólogo (Ramos & Boddey, 1987; Vlassak *et al.*, 1996; Yousef *et al.*, 1987). Essa interação foi confirmada em 5 diferentes espécies de leguminosas, *Trifolium repens*, *Medicago sativa*, *Vicia sativa*, *Leucaena leucocephala* e *Macroptilium atropurpureum* (Woomer *et al.*, 1988), demonstrando que, no caso dos rizóbios, os mecanismos de adaptação que determinam a ocorrência de um dos parceiros, freqüentemente promovem a presença do outro.

A composição de uma população indígena de rizóbio é difícil de ser estudada. Análises têm demonstrado que a composição depende da

espécie ou mesmo da cultivar usada como isca. Desse modo, a composição de uma coleção de rizóbios nativos pode ser tendenciosa por ser dependente da planta. Análises preliminares da população de rizóbio nos solos dos cerrados brasileiros mostraram que o uso de diferentes espécies-isca (feijoeiro ou *Leucaena*) resulta no isolamento de diferentes membros da população de rizóbio capaz de nodular o feijoeiro: 90% dos isolados obtidos a partir de *Leucaena* foram identificados como *R. tropici* e os isolados restantes se mostraram sem similaridade com as espécies conhecidas. A população de rizóbio do mesmo solo, porém, apresentou uma composição muito mais variada, quando se usou o feijoeiro como planta-isca: 36% dos isolados caracterizados como *R. tropici*, 14% como *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* ou *etli* e 49% dos isolados não apresentaram similaridade com as espécies já descritas (Mercante *et al.*, 1996). Mesmo a partir de um único hospedeiro, populações de rizóbio geneticamente distintas podem ser isoladas. Rizóbios capazes de nodular algaroba *Prosopis glandulosa*, leguminosa reconhecidamente associada com uma grande variedade de espécies de rizóbio, foram isolados de raízes superficiais (0-0,5 m) e profundas (4-6 m). As adaptações decorrentes da exposição a condições ambientais distintas resultou em duas populações geneticamente contrastantes (Thomas *et al.*, 1994). Os autores concluíram que a formação das duas populações foi principalmente devida a hibridizações envolvendo o gene *ndv* B de *R. meliloti* e, em menor escala, os genes *nkf*HDK de *K. pneumoniae* e *nod* ABC de *R. meliloti*.

Nos sistemas agrícolas é comum diferentes espécies de leguminosas ocorrerem juntas, como acontece nas pastagens, ou em rotação de culturas. Nestes locais, diferentes populações de rizóbio interagem. Um dos processos importantes desta interação é a transferência de plasmídeos, que tem sido observada entre populações de rizóbios e pode ser um fator importante na adaptação a condições edafo-climáticas específicas. Um plasmídeo contendo resistência a vários antibióticos foi transferido de uma estirpe de *Bradyrhizobium* doadora para diversas espécies receptoras em condições de solo não-estéreis. Os resultados obtidos sugerem que a transferência pode ter ocorrido tanto no solo, como na rizosfera ou na superfície da raiz (Kinkle *et al.*, 1993). No entanto, a perda das características simbióticas por estirpes de rizóbio tem sido relatada em quase todas as condições ambientais (Gibson *et al.*, 1975; van Rensburg & Strijdom, 1985; Kuykendal & Elkan, 1976). É possível

que esses resultados reflitam uma instabilidade genética das características de efetividade das estirpes inoculadas após diversos anos no solo de uma maneira semelhante à observada nas estirpes quando em meio de cultura. Neste ambiente, é comum o relato de diferenças fisiológicas entre colônias isoladas de uma mesma estirpe (Gibson *et al.*, 1975; van Rensburg & Strijdom, 1985). Algumas observações até indicam que a simples passagem do rizóbio através da planta é capaz de alterar a estrutura de algumas regiões do plasmídeo que carrega determinantes de especificidade (Wang *et al.*, 1986). Por outro lado, a ação de bacteriófagos é um fator freqüentemente proposto como mecanismo de alteração de populações bacterianas. Os fagos têm habilidade seletiva em relação às bactérias e também agem como veículos de troca de material genético (Reaney, 1974).

SOBREVIVÊNCIA

A capacidade de sobrevivência de um microrganismo, quando introduzido no solo, foi definida como competência saprofítica (Chatel *et al.*, 1968). A sobrevivência da bactéria no solo depende de fatores abióticos — acidez, temperatura, estresses de água, metais pesados, teores de argila e matéria orgânica (Bottomley, 1992) — e bióticos — antagonismo, predação e sinergismo — do solo. No caso do rizóbio, a sobrevivência no solo é uma característica importante, pois determina, pelo menos parcialmente, a possibilidade da utilização desta bactéria como inoculante. Estrategicamente, a sobrevivência é o primeiro obstáculo a ser vencido no estabelecimento de uma estirpe superior (Freire *et al.*, 1983).

Muitas vezes, a estirpe de rizóbio introduzida coloniza facilmente o solo de um novo habitat, tornando-se difícil de ser substituída. Estudos feitos na África do Sul e na Austrália, em solos previamente livres de rizóbio capaz de nodular a soja, observaram que após introdução do primeiro inoculante, alterações posteriores na composição do rizóbio não foram bem sucedidas, indicando que as estirpes utilizadas foram capazes de adaptar-se às condições edafo-climáticas específicas do local (Brockwell *et al.*, 1987; van Rensburg & Strijdom, 1985). Nos Estados Unidos, uma situação semelhante foi também verificada: uma estirpe de rizóbio, USDA 123, capaz de nodular a soja, foi introduzida nos solos junto com esta cultura, onde, apesar de ser pouco eficiente, pas-

sou a predominar (Ham, 1980), impossibilitando a introdução de estirpes mais eficientes (Johnson *et al.*, 1965; Weaver & Frederick, 1974).

No caso do rizóbio, a sobrevivência deve ser compreendida frente a duas situações distintas. No primeiro caso, a presença da planta hospedeira facilita a multiplicação daquela estirpe que é capaz de promover nodulação eficiente. Há evidências que mostram o envolvimento da planta hospedeira na persistência do rizóbio: certos genótipos de soja são capazes de restringir a nodulação por alguns membros do serogrupo USDA123 (Creagan & Keyser, 1986). No entanto, rizóbios capazes de nodular a soja foram encontrados em áreas onde esta leguminosa nunca foi cultivada (Martins *et al.*, 1996).

O perfil da população de rizóbio isolada de solo coletada na região nordeste brasileira mostrou-se bastante diverso mesmo em áreas onde, por causa do regime hídrico deficiente, a presença das leguminosas hospedeiras não é muito comum (Martins *et al.*, 1996). Usando o feijão-de-corda como planta-isca, observou-se que os rizóbios isolados dos solos do sertão (região semi-árida) mostraram uma proporção maior de estirpes de crescimento rápido, quando comparados com os rizóbios isolados de solo da mesma latitude, mas coletados próximos à costa (Zona da Mata). Estes dados confirmam a hipótese de Sprent (1994) de que rizóbios de crescimento rápido sobrevivem melhor às condições adversas do ambiente.

O fato de apresentar taxas de crescimento rápido não confere às espécies de rizóbio vantagem extra na garantia de uma alta taxa de nodulação, mas, de algum modo, garante índices melhores de sobrevivência. Estirpes de *S. fredii*, caracterizadas por crescimento rápido, obtidas de solos de cultivo de soja na China, foram introduzidas na região centro-oeste da América do Norte, visando o deslocamento da população naturalizada de *B. elkanii* que, embora capaz de nodular soja, não é tão eficiente quanto espécies de *B. japonicum*. A taxa de ocupação de nódulo pelas estirpes de *S. fredii* se manteve numa faixa baixa (3 a 14%) durante o primeiro ano, não havendo nenhum aumento significativo nos dois anos subsequentes. Foi observado, entretanto, que apesar de não competir bem com as estirpes de rizóbio nativas, as estirpes de crescimento rápido introduzidas persistiram saporiticamente no solo, durante todo o período de estudo (Manjanatha *et al.*, 1992).

A estirpe BR-33 de *Bradyrhizobium japonicum*, quando usada como inoculante para soja em condições estéreis, promove o aparecimento de

uma segunda população de nódulos, que se forma logo após o florescimento e parece ser a principal responsável pela maior produção de grãos promovida por esta estirpe, porque garante a fixação de nitrogênio em maiores níveis, durante o período de maior demanda para nitrogênio. No entanto, em ensaios de campo, a estirpe BR-33 não costuma mostrar bom desempenho, sugerindo que a baixa capacidade de sobrevivência dessa estirpe no solo inviabiliza a formação da segunda população de nódulos (Santos *et al.*, 1996). A sobrevivência da estirpe no solo é fator determinante não apenas para a formação de uma segunda população de nódulos mas também para promover a nodulação inicial. Mesmo quando o inoculante é aplicado aderido à superfície da semente, a nodulação não ocorre imediatamente, sendo dependente do tempo de germinação, o que exige que o inóculo inicial se mantenha viável no solo. Em trevo subterrâneo, algumas estirpes eficientes promovem um aumento de produtividade somente após a rebrota das plantas, o que está diretamente correlacionado à capacidade de a estirpe sobreviver nas condições específicas e competir com outras estirpes (Leung *et al.*, 1994).

Embora uma série de condições sejam relacionadas com a sobrevivência do rizóbio no solo, os fatores determinantes ainda estão longe de ser bem compreendidos. A produção de polissacarídeos nodulares foi apontada como responsável pela maior persistência do serogrupo USDA 123, levando à sua dominância numérica no solo (Streeter *et al.*, 1994).

INTERAÇÕES COM FATORES ABIÓTICOS DO SOLO

A maior parte dos rizóbios em vida livre está mecanicamente ligada às partículas de solo (Ozawa & Yamaguchi, 1986), e assim pode permanecer mesmo na ausência da planta hospedeira. Kamicker & Brill (1986) relataram a persistência no solo de uma estirpe de *B. japonicum* por 30 anos na ausência da soja. Geralmente, as populações de rizóbio persistem no solo por 2 anos após o cultivo da leguminosa hospedeira, diminuindo gradativamente durante esse período. A acidez do solo, acompanhada do aumento do teor de alumínio, é um dos principais fatores de estresse que afetam a persistência do rizóbio no solo (Hiltbold *et al.*, 1985), embora a espécie de *B. japonicum* sobreviva melhor em solos moderadamente ácidos do que nos solos alcalinos (Peoples *et al.*, 1995).

Tipo de solo, textura e composição – Estudos com o rizóbio mostraram que as condições do solo são decisivas para a sobrevivência da

estirpe, quando introduzida em um novo ambiente. O número de células de *Bradyrhizobium* no solo e na rizosfera tem-se mostrado em muitos casos mais dependente do tipo de solo do que da estirpe introduzida como inoculante. Ensaios de competitividade em meio estéril são determinados por fatores intrínsecos da estirpe, porém, em ensaios de campo, os fatores edafo-climáticos parecem ser os maiores determinantes da garantia da sobrevivência e competitividade de uma estirpe.

A sobrevivência de bactérias no solo, em geral, está diretamente relacionada com a estrutura e a textura do solo. Aumentos na densidade populacional de rizóbios são observados após o enriquecimento do solo com argilas (Beringer & Bale, 1988; Heijnen *et al.*, 1993). As argilas exercem um papel de proteção para o rizóbio, por aumentar não somente o número total de microhabitats, mas também por melhorar a qualidade destes, garantindo teor de umidade adequado e proteção contra predadores maiores.

Por outro lado, a estrutura físico-química do solo, principalmente o tipo e teor de argila, pode influenciar os diversos componentes da população de rizóbio do solo, afetando a competitividade entre as estirpes homólogas, quanto à formação de nódulos (Moawad & Bohlool, 1984; Somasegaram *et al.*, 1988). Os mecanismos de atuação não são bem compreendidos, mas parecem envolver formas de associações eletrostáticas entre o rizóbio e as argilas do solo (Marshall, 1969), como também o aprisionamento do rizóbio nos colóides do solo (Demezas & Bottomley, 1986).

Acidez – Vários trabalhos têm mostrado que tanto a temperatura quanto o pH do solo são fatores determinantes para o sucesso da estirpe de rizóbio em promover uma nodulação eficiente nas leguminosas associadas (Dughri & Bottomley, 1984; Graham, 1992; Ramos & Boddey, 1987; Streit *et al.*, 1992; Vargas & Graham, 1989; Weber & Miller, 1972; Wolff *et al.*, 1991).

A acidez é capaz de afetar drasticamente a taxa de nodulação das estirpes usadas como inoculantes. Wolff *et al.* (1991) demonstraram que a taxa de ocupação de estirpes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, quando introduzidas em solo ácido, é mais baixa do que a observada em solos férteis e neutros. Estudos feitos no Quênia, em dois solos com diferentes níveis de acidez, mostraram que os solos abrigavam populações de rizóbio capazes de nodular feijão semelhantes quanto a número, efetividade de FBN e diversidade genética. A composição dessas

populações era, entretanto, acentuadamente diferente: estirpes semelhantes a *R. tropici* predominavam no solo de maior acidez, enquanto que estirpes semelhantes a *R. leguminosarum* e *R. etli* predominavam no solo menos ácido (Anyango *et al.*, 1995). A melhor tolerância do *R. tropici* à acidez tem sido também observada em outras regiões (Amarger *et al.*, 1994; Graham *et al.*, 1994).

Alguns estudos compararam a capacidade saprofítica de *Rhizobium* spp. e *Bradyrhizobium* spp. nas mesmas condições de solo e foram discutidos por Brockwell e colaboradores (1995). *Bradyrhizobium* é mais tolerante à acidez e mais bem adaptado aos solos dos trópicos úmidos, onde persiste melhor, porém não tolera bem altas temperaturas. *Rhizobium* é mais sensível à acidez, mas moderadamente adaptado a ambientes semi-áridos. Os mecanismos de tolerância do rizóbio à acidez ainda permanecem obscuros, havendo divergências entre os autores sobre o papel dos exopolissacarídeos como agentes de proteção contra os efeitos nocivos da acidez.

Em solos ácidos, a maior disponibilidade de alumínio e manganês, que podem alcançar níveis tóxicos, representa um fator limitante à sobrevivência e ao estabelecimento do rizóbio (Wani *et al.*, 1995). Nestas condições, é possível que a inoculação com estirpes tolerantes proporcione a boa nodulação das plantas. Numerosos trabalhos de seleção de estirpes tolerantes a fatores estressantes do solo têm sido realizados, mas os resultados são contraditórios. Estirpes tolerantes à acidez podem (Graham *et al.*, 1982) ou não (Gemell & Roughley, 1993) sobreviver melhor em solos ácidos do que estirpes sensíveis. Na maioria das vezes, a tolerância à acidez não se traduz em maior tolerância a alumínio e manganês (Vargas & Graham, 1989).

Temperatura e umidade – Em relação aos rizóbios, a maioria das espécies tem temperatura ótima de crescimento entre 25 e 30°C. Temperaturas adversamente altas afetam seu crescimento e conseqüentemente sua sobrevivência (Woomer *et al.*, 1988). A seleção de estirpes tolerantes à temperatura alta tem sido uma preocupação constante (Boonkerd & Weaver, 1982; Hungria *et al.*, 1993; Wolff *et al.*, 1991). Os mecanismos de tolerância a temperaturas altas envolvem plasmídeos crípticos (Baldani & Weaver, 1992) e a indução de proteínas de choque (Michiels *et al.*, 1994). A cura ou a perda parcial de plasmídeos simbióticos com conseqüente perda da infectividade, após exposição do rizóbio a altas temperaturas, têm sido observadas (Soberón-Chavez *et al.*, 1986),

e a esse respeito, a espécie *R. tropici* parece ser mais tolerante e estável do que *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*. Isso talvez possa explicar a maior competitividade daquela quando em condições de temperaturas adversamente altas (Oliveira & Graham, 1990).

A solarização do solo, mediante a cobertura com plástico durante o período do verão, elevando assim a temperatura, é uma técnica eficiente para reduzir a população nativa de rizóbio e facilitar a introdução de estirpes selecionadas para maior eficiência (Rupela & Sudarshana, 1990). Seu uso em plantio de larga escala é, entretanto, inviável.

Flutuações na disponibilidade de água são frequentemente observadas nos solos tropicais, com ciclos de seca e encharcamento, que resultam em baixa sobrevivência dos microrganismos diazotróficos. Essas flutuações têm efeitos deletérios sobre o rizóbio (Boonkerd & Weaver, 1982; Mary *et al.*, 1994; Pena-Cabriales & Alexander, 1979). *Bradyrhizobium* resiste melhor ao dessecamento e subsequente rehidratação (Mary *et al.*, 1994), talvez devido ao maior conteúdo de água interna observado nas estirpes de *Rhizobium* em comparação com *Bradyrhizobium* (Bushby & Marshall, 1977). A falta de umidade no solo pode afetar a mobilidade dos microrganismos diazotróficos em direção à rizosfera das plantas. A mobilidade, entretanto, é uma função do teor de umidade, textura, quantidade de material coloidal e do tipo de solo, além de ser influenciada pelo movimento da água (Hamdi, 1971). Em solos contendo argila e silte ocorre absorção das células bacterianas a estas partículas, restringindo o movimento, ao contrário do que ocorre em solos arenosos.

A falta de adequados teores de umidade no solo pode ter efeito deletério sobre a população de *Azospirillum*, sendo a sobrevivência significativamente aumentada quando o solo é enriquecido com matéria orgânica ou quando a bactéria está na rizosfera (Albrecht *et al.*, 1983).

Metais pesados – Muitos metais pesados são essenciais para o crescimento dos microrganismos diazotróficos. Elementos como níquel, cobre, zinco e cádmio são cofatores de enzimas, requeridos em quantidades muito pequenas. Acima de certos níveis, esses elementos são tóxicos, afetando a sobrevivência do rizóbio no solo. As estirpes variam quanto à tolerância a metais pesados, porém a exposição prolongada a eles altera a população de rizóbio do solo. Demonstrou-se que a incorporação de lama de esgoto ao solo promove uma alteração radical na população de rizóbio, levando ao desaparecimento de estirpes eficientes e à diminuição da diversidade genética da população (Hirsch *et al.*, 1993).

INTERAÇÕES COM A MICROFLORA DO SOLO

O estabelecimento dos microrganismos diazotróficos, quando introduzidos no solo, é influenciado também pelos fatores bióticos. Os microrganismos nativos num meio pobre em matéria orgânica podem ser concorrentes ou competidores na disputa pelos nutrientes disponíveis. Por outro lado, substâncias resultantes do metabolismo microbiano e eliminadas no meio podem servir como fonte de nutrientes a outros microrganismos. A chance de um microrganismo heterotrófico sobreviver no solo, considerado na maioria das vezes como um meio pobre, vai depender do fluxo alimentar estabelecido entre os organismos presentes no local específico. Numerosos estudos têm comparado as alterações nos números de rizóbio, após inoculação em solos não-estéreis e estéreis, onde é eliminada a influência de fatores bióticos (Chao & Alexander, 1981; Sardshpande *et al.*, 1977; Vidor & Miller, 1980). Os resultados demonstram claramente o papel da microbiota na sobrevivência do rizóbio.

Antagonismo – As populações microbianas do solo (bactérias, actinomicetos e fungos) podem exercer interações antagonicas aos microrganismos diazotróficos no solo. Bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* e fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, membros comuns da microflora do solo, são capazes de inibir a população de rizóbio no solo, o que pode ser observado pela redução da nodulação da planta hospedeira (Chowdhury, 1977; Patel, 1974). Os actinomicetos são numerosos nos solos tropicais (Araragi, 1979), perfazendo 75 a 94% do total da microflora de alguns solos dos cerrados (Coelho & Drozdowicz, 1979). Além disso, o número de actinomicetos no solo aumenta rapidamente, após a elevação do pH do solo, por meio da calagem (Baldani *et al.*, 1982). Tem sido sugerido que os antibióticos produzidos por estes microrganismos, quando presentes no solo ou na rizosfera, podem ser assimilados pela planta (Crowdy & Pramer, 1955), promovendo alterações na população microbiana da rizosfera (Brown, 1961; Hely *et al.*, 1957) e resultando na seleção de microrganismos tolerantes, tal como já foi observado (Baldani *et al.*, 1982; Ramos *et al.*, 1987). Dificuldades no estabelecimento de rizóbio em alguns solos têm sido relacionadas ao antagonismo da microflora local (Chowdhury, 1977) e estudos têm demonstrado que a inoculação do solo com várias espécies de fungos ou com actinomicetos afeta a sobrevivência do rizóbio, levando

inclusive à diminuição da nodulação das leguminosas (Angle *et al.*, 1981; Damirgi & Johnson, 1966).

A importância da resistência à estreptomicina no estabelecimento de nodulação em *Stylosanthes* em solos da região dos cerrados foi mostrada por Scotti *et al.* (1982), que observaram uma proporção significativamente maior de isolados resistentes ao antibiótico em plantas crescidas em solos com calagem, em comparação com plantas crescidas em solos virgens. A infecção de raízes de cereais por *Azospirillum* spp. também depende, em algumas circunstâncias, da resistência da bactéria a alguns antibióticos (Döbereiner & Baldani, 1979), sendo esse efeito correlacionado com aumentos no número de actinomicetos na rizosfera do milho, após a calagem do solo de cerrado (Baldani *et al.*, 1982).

Alterações dos ecossistemas naturais pelas práticas de aração e calagem modificam o equilíbrio das populações de microrganismos do solo (Döbereiner, 1982b) e podem, por longo período de tempo, afetar o estabelecimento do rizóbio. Na região amazônica, foram observados aumentos no nível de resistência a alguns antibióticos dos isolados de *Bradyrhizobium* spp., obtidos de nódulos formados em feijão-de-corda crescido em solos ácidos, que tiveram o pH corrigido por meio da calagem, por um período de 6 anos após o início da prática agrícola (Döbereiner *et al.*, 1981). Alguns destes isolados se mostraram tolerantes à acidez do solo e a temperaturas adversamente altas (Martinazzo, 1989) e capazes de formar prontamente nodulação abundante no feijão-de-corda em áreas recentemente abertas para a agricultura. Nessa mesma região, a inoculação com a estirpe australiana CB 188, selecionada para tolerância à estreptomicina e à canamicina não foi bem sucedida. Nesses estudos não foi possível estabelecer correlações entre o padrão de resistência aos dois antibióticos testados e a boa nodulação das estirpes, demonstrando que a habilidade resultante da persistência da bactéria no solo é muito complexa, envolvendo diversos aspectos relacionados com a sobrevivência da estirpe no solo.

Predação – A ação predatória dos protozoários e de microrganismos parasitos, como por exemplo os *Bdellovibrio* spp., é conhecida como um fator que pode influenciar a sobrevivência do rizóbio. A população de predadores e parasitos depende principalmente do teor de matéria orgânica do solo (Pena-Cabriaes & Alexander, 1983) e ocorre com maior intensidade em sistemas monoculturais. Um número muito grande de estudos tem mostrado declínios marcantes na população de

rizóbio pela ação dos predadores. Esses estudos têm sido feitos em meio de cultura ou em solos esterilizados (Chao & Alexander, 1981).

Sinergismo – A interação entre fungos micorrízicos arbusculares e as estirpes de rizóbio é um bom exemplo de interação sinérgica entre microrganismos do solo (Thiagarajan & Ahmad, 1993). Foi observado no amendoim que a presença de fungos micorrízicos arbusculares (*Acaulospora laevis* ou *Glomus fasciculatus*) é capaz de alterar a taxa de nódulos formados por estirpes inoculadas em mistura, indicando uma ação sinérgica diferenciada para com uma das estirpes (Nambiar & Anjaiah, 1989). O mesmo tipo de efeito já foi relatado para *Azospirillum brasiliense* (Plazinski & Rolfe, 1985) e *Pseudomonas* (Fuhrman & Wollum, 1989). Um melhor conhecimento destas interações poderá possibilitar a introdução de estirpes selecionadas em áreas onde ocorra população nativa.

INTERAÇÃO COM OUTRAS ESTIRPES DE RIZÓBIO

De um modo geral, as populações nativas ou naturalizadas de rizóbio são muito competitivas pelos sítios de infecção nas raízes da planta hospedeira, mas freqüentemente apresentam-se pouco eficientes quanto à fixação de N, limitando a produtividade da leguminosa (Berg *et al.*, 1988, Keyser *et al.*, 1984). As dificuldades relacionadas com a formação de nódulos por estirpes de rizóbio selecionadas (geralmente para maior eficiência da fixação de N ou tolerância a fatores de estresse), quando introduzidas em solos que contém populações indígenas ou naturalizadas, apresentam grande importância econômica, impulsionando os estudos sobre os mecanismos de especificidade hospedeira e competitividade entre estirpes pelos sítios de infecção nas raízes das leguminosas.

Estudos visando compreender os mecanismos de competitividade entre estirpes de rizóbio presentes no solo já eram realizados há mais de 50 anos (Nicol & Thornton, 1941) e, ainda assim, as características capazes de definir a habilidade competitiva de uma estirpe em relação a outra não são bem compreendidas.

As dificuldades, freqüentemente relatadas em estudos dessa natureza, são, pelo menos em parte, decorrentes da metodologia disponível para avaliação da competitividade. Os resultados obtidos em condições controladas e estéreis raramente costumam ser reproduzidos em condições de campo. Estirpes isoladas tanto de populações dominantes como

daquelas não-dominantes de nódulos, quando avaliadas em ensaios estéreis, apresentam um bom desempenho quanto à competitividade, o que é uma situação extremamente difícil de ser compreendida a nível de campo (Bromfield *et al.*, 1989; Meade *et al.*, 1985). Além das dificuldades metodológicas inerentes à avaliação da competitividade, Brom *et al.* (1991) sugeriram que pode haver perda de alguma característica genética durante o processo de isolamento do rizóbio a partir de nódulos. À medida em que se amplia o conhecimento da ecologia dos habitats naturais destes microrganismos, meios de cultura apropriados poderão ser desenvolvidos, onde não somente a eficiência mas também a competitividade possam ser mantidas.

Variáveis ambientais, características intrínsecas do rizóbio e determinantes genéticos do hospedeiro podem contribuir para o sucesso da inoculação, permitindo que estirpes de rizóbio utilizadas como inoculantes ocupem uma proporção significativa dos nódulos formados (Bottomley, 1992). Mesmo quando a estirpe a ser introduzida é bastante competitiva, a população de rizóbio nativo tem sido apontada como o principal fator capaz de afetar a taxa de nodulação pela estirpe inoculante (Thies *et al.*, 1991; Thies *et al.*, 1992).

Alguns estudos relacionam não a diversidade de rizóbios nativos no solo, mas o tamanho da população rizobiana com o determinante da eficiência da inoculação. Existem resultados mostrando que o número de estirpes nativas de rizóbio representa uma barreira para o estabelecimento de estirpes selecionadas, possivelmente levando ao insucesso da inoculação (Weaver & Frederick, 1974). Segundo os estudos de Thies *et al.* (1991), quando menos de 10 rizóbios nativos estão presentes por grama de solo, o sucesso da inoculação pode ser observado em 85% das áreas analisadas.

Um dos aspectos menos estudados da ecologia do rizóbio é a caracterização das estirpes nativas, que freqüentemente competem com as estirpes introduzidas para a formação de nódulos. A população nativa é adaptada às condições edafo-climáticas, mas a presença de plantas leguminosas também tem uma influência significativa na sua composição. Mil duzentos e setenta e cinco isolados de *Bradyrhizobium* de nódulos de *Macroptilium atropurpureum* e *Desmodium intortum* foram usados para testar a hipótese de que a heterogeneidade de tipos serológicos de rizóbios encontrados no solo antes do cultivo de uma planta hospedeira tende a diminuir, sob influência do solo, da raiz e da rizosfera, após cultivos sucessivos com a leguminosa hospedeira (Date

& Hurse, 1991). Esses autores observaram que, para cada uma das leguminosas estudadas, um ou dois isolados foram dominantes. A confirmação desta hipótese indica que isolados do solo de origem da leguminosa têm as características de persistência e competitividade que são importantes para os programas de seleção de estirpe (Brockwell *et al.*, 1968; Date, 1976; Thompson, 1980).

A soja, plantada numa larga extensão dos cerrados brasileiros, pode ser apontada como um exemplo típico do alto grau de competitividade de estirpes naturalizadas. No início dos anos 70, foi utilizado um inoculante composto das estirpes BR-29 e BR-96 de *B. elkanii*, o que garantiu, durante vários anos, a produção da soja sem a necessidade de adubação nitrogenada. Estudos realizados na década de 80 mostraram que a estirpe BR-33 de *B. japonicum* era capaz de aumentar o nível de produção de grãos em soja em até 30% (Neves *et al.*, 1985). No entanto, quando se tentou introduzir a estirpe BR-33 nos solos de cerrado, verificou-se que ela era incapaz de competir com as estirpes BR-29 e BR-96, que se encontravam bem adaptadas às condições edafo-climáticas prevalentes na região (Neves *et al.*, 1992).

A produção de bacteriocinas tem sido apontada como determinante da maior competitividade de uma estirpe em relação a outra. Essas substâncias, caracterizadas como antibióticas, apresentam efeitos bacteriostáticos sobre rizóbios da mesma espécie, de outras espécies e mesmo bactérias de outros gêneros (Hodgson *et al.*, 1985; Triplett & Sadowsky, 1992). Estudos com o uso de estirpes isogênicas têm mostrado a vantagem competitiva das estirpes produtoras de bacteriocinas sobre estirpes sensíveis (Triplett & Barta, 1987).

Por outro lado, é possível tirar proveito da variabilidade existente na população de rizóbios, como, por exemplo, resistência a fungicidas, a antagonismo etc., para adicionar vantagens competitivas às estirpes selecionadas usadas como inoculante de leguminosas, em solos contendo população estabelecida de rizóbios homólogos.

ADAPTAÇÃO A CONDIÇÕES ESPECÍFICAS: ALGUNS ESTUDOS DE CASO

As características das bactérias que determinam sua persistência e que estão envolvidas na adaptabilidade aos solos não são bem conhecidas. Além disso, a complexidade dos fatores envolvidos (desidrata-

ção, altas temperaturas do solo, acidez, baixo conteúdo de matéria orgânica e toxicidade de manganês e alumínio), além de fatores bióticos do solo, torna difícil a seleção de estirpes adaptadas a condições específicas do solo nesta região.

Uma diminuição na tolerância à acidez e um aumento na resistência a antibióticos na população nativa de rizóbio das parcelas que receberam calagem foi observada quando o feijoeiro foi plantado 5 vezes no mesmo local (Ramos & Boddey, 1987; Ramos *et al.*, 1987). A tolerância à acidez e a resistência a antibióticos da estirpe inoculada e suas derivativas aclimatizadas que foram reisoladas dos nódulos formados a cada plantio, entretanto, não foram alteradas pela calagem. Foi observado também que a calagem aumentou a nodulação e a produção de grãos do feijoeiro, mas diminuiu a taxa de ocupação da estirpe inoculada, muito embora as estirpes aclimatizadas apresentassem uma tendência a ser mais competitivas do que a estirpe original.

A expansão da fronteira agrícola brasileira em direção aos cerrados, na década de 60, introduziu a soja nesse novo ecossistema. Baixa nodulação e até mesmo falha de nodulação foram observadas nas plantas inoculadas com as estirpes comercialmente recomendadas para a soja na região sul e sudeste (Neves, 1989). O problema era mais grave nos primeiros anos após o preparo do solo para a agricultura e foi atribuído à especificidade hospedeira das cultivares adaptadas aos cerrados (Franco, 1981). O problema podia ser aliviado com o uso de altas doses de inoculante (Vargas *et al.*, 1980), o que pode ser indicativo de problemas relacionados com a sobrevivência das estirpes nos solos.

Estirpes de diversas procedências foram testadas e duas selecionadas: BR-96, isolada na região sul pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e BR-29, isolada no Rio de Janeiro pelo Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia da EMBRAPA. É possível que a estirpe BR-29 seja um rizóbio nativo, pois foi isolado de um único nódulo formado em soja plantada em uma amostra de solo ácido com problema de toxicidade de manganês, originária de Piraí, onde a soja jamais havia sido introduzida (M. Nery, comunicação pessoal). Essas estirpes têm em comum a característica de alta competitividade (Freire *et al.*, 1983; Scotti *et al.*, 1993) e resistência a alguns antibióticos (Scotti *et al.*, 1982). Hoje se sabe que estas duas estirpes pertencem à espécie *B. elkanii* (Rumjanek *et al.*, 1993). Usadas comercialmente como inoculantes para soja, ambas se tornaram naturalizadas nas áreas de produção dessa cultura em todo o Brasil.

Aumentos na dominância da estirpe BR-40, usada como inoculante anteriormente, têm sido observados nas regiões produtoras dos cerrados: em 1970 esse serogrupo ocupava apenas 2% dos nódulos e recentemente têm sido relatadas taxas de ocupação entre 13 e 50% (Vargas *et al.*, 1993). Isolados naturalmente aclimatizados às condições prevalentes nos solos dos cerrados foram recentemente selecionados: BR-85, pertencente ao serogrupo BR-33 e BR-86 (Vargas *et al.*, 1993), 4A-5 e 4B-53 (Scotti *et al.*, 1993), pertencentes ao serogrupo BR-40.

Através da repetida inoculação e recuperação do rizóbio dos nódulos, foram obtidos reisolados aclimatizados às condições dos solos dos cerrados, da estirpe BR-33, caracterizada como *B. japonicum* (Rumjanek *et al.*, 1993) e considerada muito eficiente (Döbereiner *et al.*, 1970; Neves *et al.*, 1985; Norris, 1967). Os reisolados aclimatizados mantiveram as características de eficiência da estirpe original e não apresentaram alteração no padrão de tolerância a alumínio e acidez (Neves *et al.*, 1992). A aclimatização da estirpe BR-33, entretanto, diminuiu a produção de polissacarídeos. Somente um dos reisolados teve alterado o padrão de resistência a antibióticos, mantendo a taxa característica de crescimento, mesmo quando inoculado em meio contendo concentrações subinibitórias de estreptomomicina (Coutinho *et al.*, 1995).

A caracterização genética das estirpes aclimatizadas aos solos dos cerrados demonstrou que o isolado BR-85 difere geneticamente da estirpe original (BR-33) por uma única banda de restrição. Os demais reisolados dessa estirpe só puderam ser discriminados da estirpe original por meio do padrão de pirólise (Coutinho *et al.*, 1995). Alguns reisolados derivados da estirpe BR-40 diferem da estirpe original pela maior intensidade de uma banda polipeptídica no padrão de proteínas e se tornaram mais competitivos (Scotti *et al.*, 1993; Vargas *et al.*, 1993). Esses reisolados não puderam ser discriminados pelo padrão de DNA, mas sim pelo padrão de pirólise (Coutinho *et al.*, 1995).

Alterações na produção e/ou composição dos polissacarídeos foram as principais diferenças decorrentes da aclimatização das estirpes BR-33 e BR-40 nos solos de cerrado (Coutinho *et al.*, 1995), afetando a permeabilidade das células a antibióticos e outras substâncias, e conseqüentemente modificando a tolerância aos fatores adversos do solo. A existência de reisolados que são mais competitivos do que as estirpes originais, mas sensíveis à estreptomomicina, sugerem que a resistência a esse antibiótico não é um pré-requisito para a nodulação da soja nos

cerrados. Entretanto, quando comparados com a estirpe original, os isolados apresentaram um maior nível de tolerância ao antagonismo dos actinomicetos dos solos de cerrado, semelhante aos observados para as estirpes bem sucedidas nestes solos, BR-29 e BR-96 (Neves *et al.*, 1992).

CONCLUSÕES

O conhecimento dos aspectos ecológicos ligados aos microrganismos diazotróficos é ainda muito fragmentado. Os rizóbios têm sido os mais estudados, mas mesmo assim os resultados se restringem a um número limitado de espécies associadas a plantas de interesse agrônomico, geralmente obtidos em regiões subtropicais.

O estabelecimento do rizóbio no solo depende de fatores tão diversos como a natureza química e física do solo, a temperatura e a disponibilidade de água, microflora, composição da flora de leguminosas e não-leguminosas, que dificilmente têm sido considerados nas tentativas de introdução de estirpes selecionadas. Do melhor conhecimento desses fatores podem resultar tecnologias que permitam sucesso na introdução de estirpes selecionadas. A necessidade de aumentar a contribuição da FBN nos sistemas agrícolas e de superar limitações à FBN tem motivado a prospecção da biodiversidade que existe nas regiões tropicais. Dados coletados em solos das regiões tropicais do Brasil têm mostrado ser possível a adaptação de bactérias a um novo ambiente, o que de certa forma explica a grande diversidade nas populações de rizóbio que ocorrem nestas regiões. O uso de técnicas moleculares tem contribuído para revelar a grande diversidade de rizóbios que existe nestas áreas e seus relacionamentos com as leguminosas. Por outro lado, a possibilidade de aumentar a FBN, através de alterações genéticas nos microrganismos diazotróficos envolvidos, tem motivado o estudo destas populações e suas interações com a microflora local.

O melhor conhecimento da ecologia do rizóbio nos solos das regiões tropicais tem servido para derrubar alguns conceitos estabelecidos como, por exemplo, a ubiqüidade dos rizóbios tropicais do grupo caupi de inoculação cruzada. Este conceito, que por muitos anos induziu à conclusão acerca da não necessidade de inoculação de leguminosas promíscuas (muitas são forrageiras ou plantas usadas para adubação verde) em solos tropicais, pode estar levando à insuficiente nodulação e à limitada contribuição da FBN nestas leguminosas.

AGRADECIMENTOS

As autoras agradecem aos colegas A.A. Franco, J. Döbereiner e J.I. Baldani pelas sugestões apresentadas ao texto e aos funcionários da biblioteca pelo apoio bibliográfico prestado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR, J.M.M.; ASHBY, A.M.; RICHARDS, A.J.M.; LOAKE, G.J.; WATSON, M.D.; SHAW, C.H. Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* towards flavonoid inducers of the symbiotic nodulation genes. **Journal of General Microbiology**, Reading, v.134, p.2741-2746, 1988.
- ALBRECHT, S.L.; GASKINS, M.H.; MILAN, J.R.; SCHANK, S.C.; SMITH, R.L. Ecological factors affecting survival and activity of *Azospirillum* in the rhizosphere. In: KLINGMÜLLER, W. ed. *Azospirillum* II: genetics, physiology, ecology. Basel: Birkhäuser Verlag, 1983, p.138-148.
- AMARGER, N.; BOURS, M.; REVOY, F.; ALLARD, M.R.; LAGUERRE, G. *Rhizobium tropici* nodulates field-grown *Phaseolus vulgaris* in France. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.161, p.147-156, 1994.
- ANGLE, J.S.; PUGASHETTI, B.K.; WAGNER, G.H. Fungal effects on *Rhizobium japonicum* soybean symbiosis. **Agronomy Journal**, Madison, v.73, p.301-306, 1981.
- ANYANGO, B.; WILSON, K.J.; BEYNON, J.L.; GILLER, K.E. Diversity of rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in two Kenyan soils with contrasting pHs. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.4016-4021, 1995.
- APP, A.A.; WATANABE, I.; VENTURA, T.S.; BRAVO M.; JUREY, C.D. The effect of cultivated and wild rice varieties on the nitrogen balance of flooded soil. **Soil Science**, Baltimore, v.141, p.448-452, 1986.
- ARARAGI, M. Comparison of actinomycete flora between tropical and temperate upland farm soils. I. Physiological characteristics. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v.25, p.245-254, 1979.
- BALDANI, J.I.; WEAVER, R.W. Survival of clover rhizobia and their plasmid-cured derivatives in soil under heat and drought stress. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.24, p.737-742, 1992.
- BALDANI, V.L.D.; ALVAREZ, M.A.B.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.90, p.35-45, 1986a.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.36, p.86-93, 1986b.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; XAVIER, D.F.; BODDEY, R.M. Efeito da calagem no número de actinomicetos e na porcentagem de bactérias resistentes a estreptomomicina na rizosfera de milho, trigo e feijão. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.13, p.250-263, 1982.
- BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in biological nitrogen fixation with non-legumes plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, 1996a (no prelo).
- BALDANI, J.I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; HORSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DÖBEREINER, J. Inclusion of "*Pseudomonas*" *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, within the genus *Herbaspirillum*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, 1996b (no prelo).
- BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Inoculation of field-grown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum* spp. in Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.4, p.57-60, 1987.
- BARNET, Y.; CATT, P.C. Distribution and characteristics of root nodule bacteria isolated from Australian *Acacia* spp. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.135, p.109-120, 1991.
- BERG, R.K.; LOYNACHAM, T.E.; ZABLOTOWICZ, R.M.; LIEBERMAN, M.T. Nodule occupancy by introduced *Bradyrhizobium japonicum* in Iowa soils. **Agronomy Journal**, Madison, v.80, p.876-881, 1988.

- BERINGER, J.E.; BALE, M.J. The survival and persistence of genetically-engineered micro-organisms. p.29-46. In: SUSSMAN, M.; COLLINS, C.H.; SKINNER, F.A.; STEWART-TULL, D.E., ed. **The release of genetically engineered micro-organisms**. London: Academic Press, 1988. p.29-46.
- BERRY, A.M. Recent development in the actinorhizal symbioses. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.161, p.135-145, 1994.
- BODDEY, R.M.; VICTORIA, R.L. Estimation of biological nitrogen fixation associated with *Brachiaria* and *Paspalum* grasses using ¹⁵N-labelled organic matter and fertilizer. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.90, p.265-292, 1986.
- BODDEY, R.M.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. on the nitrogen assimilation of field grown wheat. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.95, p.109-121, 1986.
- BODDEY, R.M.; CHALK, P.M.; VICTORIA, R.L.; MATSUI, E.; DÖBEREINER, J. The use of the ¹⁵N isotope dilution technique applied to the estimation of biological nitrogen fixation associated with *Paspalum notatum* cv. batatais in the field. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.29, p.924-929, 1983.
- BODDEY, R.M.; OLIVEIRA, O.C.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.174, p.195-209, 1995.
- BOONKERD, N.; WEAVER, R.W. Survival of cowpea rhizobia in soil as affected by soil temperature and moisture. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.43, p.585-589, 1982.
- BOTTOMLEY, P.J. Ecology of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium*. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J., ed. **Biological nitrogen fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992. p.293-348.
- BROCKWELL, J.; BOTTOMLEY, P.J.; THIES, J.E. Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: a critical assessment. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.174, p.143-180, 1995.
- BROCKWELL, J.; DUDMAN, W.F.; GIBSON, A.H.; HELY, F.W.; ROBINSON, A.C. An integrated programme for the improvement of legume inoculant strains. In: HOLMES, J.W., ed. **Transactions of the 9th International Congress of Soil Sciences**. Sydney: International Society of Soil Science: Angus & Robertson, 1968. v.2, p.103-114.
- BROCKWELL, J.; ROUGHLEY, R.J.; HERRIDGE, D.F. Population dynamics of *Rhizobium japonicum* strains used to inoculate three successive crops of soybean. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v.38, p.61-74, 1987.
- BROM, S.A.; SANTOS, A.G. de LOS; GIRARD, M.L.; DAVILA, G.; PALÁCIOS, R.; ROMERO, D. High-frequency rearrangements in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* plasmids. **Journal of Bacteriology, Washington**, v.173, p.1344-1346, 1991.
- BROMFIELD, E.S.P.; SINHA, I.B.; WOLYNETS, M.S. Is frequency of occurrence of indigenous *Rhizobium meliloti* in nodules of field grow plants related to intrinsic competitiveness? **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.21, p.607-609, 1989.
- BROWN, M.E. Stimulation of streptomycin-resistant bacteria in the rizosphere of leguminous plants. **Journal of General Microbiology**, Reading, v.24, p.369-377, 1961.
- BUSHBY, H.V.A.; MARSHALL, K.C. Water status of rhizobia in relation to their susceptibility to desiccation and to their protection by montmorillonite. **Journal of General Microbiology**, Reading, v.99, p.19-27, 1977.
- CARLSON, R.W.; SANJUAN, J.; RAMADAS-BHAT, U.; GLUSHKA, J.; SPAINK, H.P.; WIJFJES, A.H.M.; VAN BRUSSEL, A.A.N.; STOKKER-MANS, T.J.W.; PETERS, K.; STACEY, G. The structure and biological activities of the lipooligosaccharide nodulation signals produced by type I and type II strains of *Bradyrhizobium japonicum*. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v.268, p.18372-18381, 1993.
- CHAO, W.L.; ALEXANDER, M. Interaction between protozoa and *Rhizobium* in chemically amended soil. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v.45, p.48-50, 1981.
- CHATEL, D.L.; greenwood, r.m.; parker, c.a. Saprophytic competence as an important character in the selection of *Rhizobium* for inoculation. In: HOLMES, J.W. ed. **Transactions of the 9th International Congress of Soil Science**. Sydney: International Society of Soil Science: Angus & Robertson, 1968. v.2, p.65-73.
- CHEN, W.X.; YAN, G.H.; LI, J.L. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.38, p.392-397, 1988.
- CHEN, W.X.; LI, G.H.; QI, Y.L. *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.41, p.275-280, 1991.

- CHEN, Y.K.; BARRAQUIO, M.W.L.; KNOWLES, R. N_2 -fixing pseudomonads and related soil bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.13, p.95-117, 1994a.
- CHEN, W.X.; WANG, E.T.; LI, Y.B.; LI, Y.; GAO, J.L. *Rhizobium hainanensis*, a new species of root nodule bacteria isolated from tropical region. In: International Symposium on Diversity and Taxonomy of Rhizobia, p.16, Wuhan, China. 1994b.
- CHEN, W.X.; WANG, E.T.; WANG, S.Y.; LI, Y.B.; CHEN, X.Q.; LI, Y. Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, People's Republic of China. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.45, p.153-159, 1995.
- CHOWDHURY, M.S. Effects of soil antagonists on symbiosis. In: VINCENT, J.M.; WHITNEY, A.S.; BOSE, J., ed. Exploiting the legume-*Rhizobium* symbiosis in tropical agriculture. Honolulu: Department of Agronomy and Soil Science, University of Hawaii, 1977. College of Tropical Agriculture Miscellaneous Publication 145. p.385-411.
- COELHO, R.R.R.; DROZDOWICZ, A. The occurrence of actinomycetes in a Cerrado soil in Brazil. **Revue d'Ecologie et Biologie du Sol**, Paris, v.15, p.459-473, 1979.
- COJHO, E.H.; Reis, V.M.; Schenberg, A.C.G.; DÖBEREINER, J. Interaction of *Acetobacter diazotrophicus* with an amyolytic yeast in nitrogen-free batch culture. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.106, p.341-346, 1993.
- COUTINHO, H.L.C.; KAY, H.E.; MANFIO, G.P.; NEVES, M.C.P.; BERINGER, J.E. Molecular adaptation of soybean *Bradyrhizobia* to the Brazilian cerrado soils. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS: the Role of Biological Nitrogen Fixation, Programme and Abstracts, Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 1995. p.45-46.
- CREAGAN, P.B.; KEYSER, H.H. Host Restriction on nodulation by *Bradyrhizobium japonicum* strain USDA 123 in soybean. **Crop Science**, Madison, v.26, p.911-916, 1986.
- CROWDY, S.H.; PRAMER, D. The occurrence of translocated antibiotics in expressed plant sap. **Annals of Botany**, London, v.19, p.80-86, 1955.
- DAMIRGI, S.M.; JOHNSON, H.W. Effect of soil actinomycetes on strains of *Rhizobium japonicum*. **Agronomy Journal**, Madison, v.58, p.223-224, 1966.
- DATE, R.A.; HURSE, L.S. Intrinsic antibiotic resistance and serological characterization of populations of indigenous *Bradyrhizobium* isolated from nodules of *Desmodium intortum* and *Macropitilium atropurpureum* in three soil of S.E. Queensland. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.23, p.551-561, 1991.
- DATE, R.A. Principles of *Rhizobium* strain selection. Nutman, P.S., ed. **Symbiotic nitrogen fixation in plants**. Cambridge: Cambridge University Press, 1976. p.137-150.
- DE-POLLI, H.; MATSUI, E.; DÖBEREINER, J.; SALATI, E. Confirmation of nitrogen fixation in two tropical grasses by $^{15}N_2$ incorporation. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.9, p.119-123, 1977.
- DEL GALLO, M.; FENDRIK, I. The rhizosphere and *Azospirillum*. Okon, Y., ed. **Azospirillum/plant associations**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p.57-75.
- DEMEZAS, D.H.; BOTTOMLEY, P.J. Autoecology in rhizospheres and nodulating behavior of indigenous *Rhizobium trifolii*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.52, p.1014-1019, 1986.
- DÖBEREINER, J. New evidence for the production and accumulation of antibiotics in nature. **Scripta Varia**, Vatican Academy of Science, v.53, 1982b.
- DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. **Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants**. Madison: Science Tech Publishers, 1987. 154p.
- DÖBEREINER, J.; ALVAHYDO, R. Sobre a influência da cana-de-açúcar na ocorrência de *Beijerinckia* no solo. II Influência das diversas partes do vegetal. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v.19, p.251-258, 1959.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D. Selective infection of maize roots by streptomycin-resistant *Azospirillum lipoferum* and other bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.25, p.1264-1269, 1979.
- DÖBEREINER, J.; DAY, J.M. Associative symbioses in tropical grasses: Characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. Newton, W.E.; Nyman, C.J., ed. **Proceedings of the First International Symposium on Nitrogen Fixation**. Pullman: Washington State University Press, 1976. p.518-538.
- DÖBEREINER, J.; DE-POLLI, H. Diazotrophic rhizocoenoses. Stewart D.P.; Gallon, J.R., ed. **Nitrogen fixation**. London: Academic Press. 1980. p.301-334.

- DÖBEREINER, J. *Azotobacter paspali* sp. nov., uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.1, p.357-365, 1966.
- DÖBEREINER, J. Emerging technology based on biological nitrogen fixation by associative N_2 -fixing organisms. Graham, P.H.; Harris, S.C., ed. **Biological nitrogen fixation technology for tropical agriculture**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1982a, p.469-483.
- DÖBEREINER, J. Further research on *Azotobacter paspali* and its variety specific occurrence in the rhizosphere of *Paspalum notatum* Flugge. **Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene**, Jena, v.124, p.224-230, 1970.
- DÖBEREINER, J. Influência da cana-de-açúcar na população de *Beijerinckia* do solo. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v.19, p.251-258, 1959.
- DÖBEREINER, J. Nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* Derx in the rhizosphere of sugar cane. **Plant and Soil**, Hague, v.15, p.211-217, 1961,
- DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: endophytic N_2 fixing bacteria. **Ciência e Cultura**, Rio de Janeiro, v.44, p.310-313, 1992.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1995a. 60p.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M. Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops. p.3-14. In: FENDRIK, I. et.al., ed. **Azospirillum VI and related Microorganisms**. Berlin: Springer-Verlag, 1995b. p.3-14.
- DÖBEREINER, J.; FRANCO, A.A.; GUZMAN, I. Estirpes de *Rhizobium japonicum* de excepcional eficiência. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.5, p.155-161, 1970.
- DÖBEREINER, J.; SCOTTI, M.R.M.M.L.; SÁ, N.M.H.; VARGAS, M.A.T. Resistance to streptomycin of *Rhizobium* isolates from Cerrado and Amazon soils. GIBSON, A.H.; NEWTON, W.E., ed. **Current perspectives in nitrogen fixation**. Canberra: Australian Academy of Sciences, 1981. p.434.
- DONG, Z.; CANNY, M.J.; MCCULLY, M.E.; ROBOREDO, M.R.; CABADILLA, C.F.; ORTEGA, E.; RODÉS, R.A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. A new role for the apoplast. **Plant Physiology**, Rockville, v.105, p.1139-1147, 1994.
- DOWDLE, S.F.; BOHLOOL, B.B. Predominance of fast-growing *Rhizobium japonicum* in a soybean field in the People's Republic of China. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.50, p.1171-1176, 1985.
- DREYFUS, B.; GARCIA, J.L.; GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sebania rostrata*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.38, p.89-98, 1988.
- DUGHRI, M.H.; BOTTOMLEY, P.J. Soil acidity and the composition of an indigenous population of *Rhizobium trifolii* in nodules of different cultivars of *Trifolium subterraneum* L. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.16, p.405-411, 1984.
- FERREIRA, M.C.B.; FERNANDES, M.S.; DÖBEREINER, J. Role of *Azospirillum brasilense* nitrate-reductase in nitrate assimilation by wheat plants. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.4, p.47-53, 1987.
- FRANCO, A.A. Rizobiologia - Estudos no Estado do Rio de Janeiro. In: MIYASAKA, S.; MEDINA, J.C., ed. **Soja no Brasil**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1981. p.436-442.
- FREIRE, J.R.J.; KOLLING, J.; VIDOR, C.; PEREIRA J.S.; KOLLING, I.G.; MENDES, N.G. Sobrevivência e competição por sítios de nodulação de estirpes de *Rhizobium japonicum* na cultura da soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.7, p.47-53, 1983.
- FREITAS, J.L.M. DE; PEREIRA, P.A.A.; DÖBEREINER, J. Effect of organic matter and *Azospirillum* spp. strains in the metabolism of nitrogen in *Sorghum vulgare*. In: VOSE, P.B.; RUSCHEL, A.P., ed. **Associative N_2 fixation**. Boca Raton: CRC Press, 1981. v.1, p.155-163.
- FUHRMAN, J.; WOLLUM II, A.G. Nodulation competition among *Bradyrhizobium japonicum* strains as influenced by rhizosphere bacteria and iron availability. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.7, p.108-112, 1989.
- GARCIA DE SALAMONE, I.E. Influencia de bacterias del genero *Azospirillum* sobre el rendimiento y nutricion nitrogenada del cultivo de maiz (*Zea mays* L.). Buenos Aires: Universidade de Buenos Aires, 1993. 172p. Dissertação, Mestrado.
- GEMELL, L.G.; ROUGHLEY, R.J. Field evaluation in acid soils of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* selected for their tolerance or sensitivity to acid soil factors in agar medium. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 25, p.1447-1452, 1993.

- GIBSON, A.H.; CURNOW, B.C.; BERGENSEN, F.J.; BROCKWELL, J.; ROBINSON, A.C. Studies of field populations of *Rhizobium*: effectiveness of strains of *Rhizobium trifolii* associated with *Trifolium subterraneum* L. pastures in south-eastern Australia. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.7, p.95-102, 1975.
- GILLIS, M.; KERTERS, B.; HOSTE, D.J.; KROOPPENSTEDT, R.M.; STEPHAN, M.P.; TEIXEIRA, K.R.S.; DÖBEREINER, J.; DE LEY, J. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nv. a nitrogen fixing acetic acid bacterium associated with sugar cane. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.39, p.361-364, 1989.
- GRAHAM, P.H.; VITERI, S.E.; MACKIE, F.; VARGAS, A.T.; PALÁCIOS, A. Variation in acid soil tolerance among strains of *R. phaseoli*. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.5, p.121-128, 1982.
- GRAHAM, P.H. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.38, p.475-484, 1992.
- GRAHAM, P.H.; DRAEGER, K.J.; FERREY, M.L.; CONROY, M.J.; HAMMER, B.E.; MARTINEZ, E.; AARONS, S.R.; QUINTO, C. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 40, p.198-207, spopulations of bradyrhizobia in nonsterile soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, p.1762-1766, 1993.
- HAM, G.E. Inoculation of legumes with *Rhizobium* in competition with naturalized strain. p.131-138. In: NEWTON, W.E.; ORME-JOHNSON, W.H. (eds), Nitrogen Fixation, v.2, Baltimore, University Park Press, 1980, 325p.
- HAMDI, Y.A. Soil-water tension and movement of rhizobia. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.3, p.121-126, 1971.
- HARTMANN, A.; ASSMUS, B.; CHATZIMOTAS, A.; SCHLOTTER, M.; LUDWIG, W.; KIRCHHOF, G. Use of molecular probes to study *Azospirillum*-plant interactions. p.59-63. In: International Workshop on Associative Interactions of Nitrogen-Fixing Bacteria with Plants. Saratov, Russia, 1995.
- HEIJNEN, C.E.; BURGERS, S.L.G.E.; VAN VEEN, J.A. Metabolic activity and population dynamics of rhizobia introduced into unamended and bentonite-amended loamy sand. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, p.743-747, 1993.
- HELY, F.W.; BERGERSEN, F.J.; BROCKWELL, J. Microbial antagonism in the rhizosphere as a factor in the failure of inoculation of subterranean clover. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v.8, p.24-44, 1957.
- HILL, N.M.; PATRIQUIN, D.G. Maximizing N₂ fixation in sugarcane litter. p.59-60. In: International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics - the Role of Biological Nitrogen Fixation, Programme and Abstracts. Seropédica, EMBRAPA-CNPAB, 1995. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, 1996, (no prelo).
- HILTBOLD, A.E.; PATTERSON, R.M.; REED, R.B. Soil populations of *Rhizobium japonicum* in a cotton-corn-soybean rotation. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v.49, p.343-348, 1985.
- HIRSCH, P.R.; JONES, M.J.; MCGRATH, S.P.; GILLER, K.E. Heavy metals from past applications of sewage sludge decrease the genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* populations. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.25, p.1485-1490, 1993.
- HODGSON, A.L.M.; ROBERTS, W.P.; WAID, J.S. Regulated nodulation of *Trifolium subterraneum* inoculated with bacteriocin-producing strains of *Rhizobium trifolii*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.17, p.475-478, 1985.
- HUBBELL, D.H.; MORALES, V.M.; UMALI-GARCIA, M. Pectolytic enzymes in *Rhizobium*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.35, p.210-213, 1978.
- HUNGRIA, M. Sinais moleculares envolvidos na nodulação das leguminosas por rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.18, p.339-364, 1994.
- HUNGRIA, M.; FRANCO, A.A.; SPRENT, J.I. New sources of high-temperature tolerant rhizobia for *Phaseolus vulgaris* L. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.149, p.103-109, 1993.
- JAMES, E.K.; REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Infection of sugar cane by nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.45, p.757-766, 1994.
- JANSEN VAN RENSBURG, H.; STRIJDOM, B.W. Effectiveness of *Rhizobium* strains used in inoculants after their introduction into soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.49, p.127-131, 1985.
- JOHNSON, H.W.; MEANS, U.M.; WEBER, C.R. Competition for nodule sites between strains of *Rhizobium japonicum* applied as inoculum and strains in the soil. **Agronomy Journal**, Madison, v.57, p.179-185, 1965.

- JORDAN, D.C. Family III. *Rhizobiaceae* Conn 1938, p.234-254. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, v.1. Baltimore, Williams, 1984, 964p.
- JORDAN, D.C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Washington, v.32, p.136-139, 1982.
- KAMICKER, B.J.; BRILL, W.J. Identification of *Bradyrhizobium japonicum* nodule isolates from Wisconsin soybean farms. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.51, p.487-492, 1986.
- KAPE, R.; PARNISKE, M.; WERNER, D. Chemotaxis and *nod* gene activity of *Bradyrhizobium japonicum* in response to hydroxycinnamic acids and isoflavonoids. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.58, p.1705-1710, 1991.
- KATUPITIYA, S.; MILLET, J.; VESK, M.; VICCARS, L.; ZEMAN, A.; LIDONG, Z.; ELMERICH, C.; KENNEDY, I.R. A mutant of *Azospirillum brasilense* Sp7 impaired in flocculation with a modified colonization pattern and superior nitrogen fixation in association with wheat. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.61, p.1987-1995, 1995.
- KAVIMANDAN, S.K.; SUBBA-RAO, N.S.; MOHRIR, A.V. Isolation of *Spirillum lipoferum* from the stems of wheat and nitrogen fixation in enrichment cultures. *Current Sciences*, Middletown, v.47, p.96-98, 1978.
- KEYSER, H.H.; WEBER, D.F.; URATSU, S.L. *Rhizobium japonicum* serogroup and hydrogenase phenotype distribution in 12 states. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.47, p.613-615, 1984.
- KHAMMAS, K.M.; AGERON, E.; GRIMONT, P.A.D.; KAISER, P. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. *Research in Microbiology*, Paris, v.140, p.679-693, 1989.
- KINKLE, B.K.; SADOWSKY, M.J.; SCHMIDT, E.L.; KOSKINEN, W.C. Plasmids pJP4 and r68.45 can be transferred between populations of bradyrhizobia in nonsterile soil. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.59, p.1762-1766, 1993.
- KUYKENDALL, L.D.; ELKAN, G.H. *Rhizobium japonicum* derivatives differing in nitrogen fixing efficiency and carbohydrate utilization. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.32, p.511-519, 1976.
- KUYKENDALL, L.D.; SAXENA, B.; DEVINE, T.E.; UDELL, S.E. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.38, p.501-505, 1992.
- LADHA, J.K. Studies on N₂ fixation by free-living and rice plant-associated bacteria in wetland rice field. *Bionature*, v.6, p.47-58, 1986.
- LAJUDIE, P. DE; WILLEMS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D.; MAESTROJUAN, G.; NEYRA, M.; COLLINS, M.D.; DREYFUS, B.; KERSTERS, K.; GILLIS, M. Polyphasic taxonomy of rhizobia: Emendation of the genes *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium sabeli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Washington, v.44, p.715-733, 1994.
- LEUNG, K.; WANJAGE, F.N.; BOTTOMLEY, P.J. Symbiotic characteristics of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* isolates with represent major and minor nodule-occupying chromosomal types of field-grown subclover (*Trifolium subterraneum* L.). *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.60, p.427-433, 1994.
- LINDSTRÖM, K. *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Washington, v.39, p.365-367, 1989.
- LONG, S.R. *Rhizobium*-legume nodulation: life together in the underground. *Cell*, Cambridge, v.56, p.203-214, 1989.
- MAGALHÃES, F.M.M.; PATRIQUIN, D.; DÖBEREINER, J. Infection of field grown maize with *Azospirillum* spp. *Revista Brasileira de Biologia*, Rio de Janeiro, v.39, p. 587-596, 1979.
- MAGALHÃES, F.M.M.; BALDANI, J.I.; SOUTO, S.M.; KUYKENDALL, J.R.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, Rio de Janeiro, v.55, p.417-430, 1983.
- MANJANATHA, M.G.; LOYNACHAN, T.E.; ATHERLY, A.G. Efficiency, competitiveness, and persistence of chinese *Rhizobium fredii* in Iowa soils. *Agronomy Journal*, Madison, v.84, p.676-681, 1992.
- MARSHALL, K.C. Studies by microelectrophoretic and microscopic techniques of the sorption of illite and motmorillonite to rhizobia. *Journal of General Microbiology*, Reading, v.56, p.301-306, 1969.
- MARTINAZZO, A.F. Potencial de fixação de nitrogênio em *Vigna unguiculata* Walp. em diferentes condições ambientais. Itaguaí: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1989. 154p. Dissertação, Mestrado.

- MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGÓVIA, L.; MERCANTE, F.M.; FRANCO, A.A.; GRAHAM, P.; PARDO, M.A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.41, p.417-426, 1991.
- MARTINS, L.M.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Characteristics of cowpea rhizobia isolated from the northeast region of Brazil. In: International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics - The Role of Biological Nitrogen Fixation, Programme and Abstracts. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 1995. p.160-161. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, 1996. (no prelo).
- MARY, P.; DUPUY N.; DOLHEM-BIREMON, C.; DEFIVES, C.; TAILLIEZ, R. Differences among *Rhizobium meliloti* and *Bradyrhizobium japonicum* strains in tolerance to dissection and storage at different relative humidities. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.26, p. 1125-1132, 1994.
- MEADE, J.; HIGGINS, P.; O'GARA, F. Studies on the inoculation and competitiveness of a *Rhizobium leguminosarum* strain in soils containing indigenous rhizobia. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.47, p.607-612, 1985.
- MERCANTE, F. M.; CUNHA, C. de O.; RIBEIRO JR., W.Q.; VANDERLEYDEN, J.; FRANCO, A.A. Use of *Leucaena leucocephala* as a trap-host for *Rhizobium tropici* strains indigenous from Brazilian "Cerrado" region. In: International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics - The Role of Biological Nitrogen Fixation, Programme and Abstracts. Seropédica, EMBRAPA-CNPAB, 1995. p.162-163. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, 1996, (No prelo).
- MICHELIS, J.; VERRETH, C.; VANDERLEYDEN, J. Effects of temperature stress on bean-nodulating *Rhizobium* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.1206-1212, 1994.
- MIRANDA, C.H.B.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. Selection of ecotypes of *Panicum maximum* for associated biological nitrogen fixation using the ¹⁵N isotope dilution technique. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.22, p.657-663, 1990.
- MOAWAD, H.; BOHLOOL, B.B. Competition among *Rhizobium* spp. for nodulation of *Leucaena leucocephala* in two tropical soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Oxford, v.48, p.5-9, 1984.
- MOORE, A.W. *Azolla*: Biology and Agronomic Significance. **Botanical Review**, Bronx, v.35, p.17-34. 1969.
- MOREIRA, F.M.S.; GILLIS M.; POT, B.; KERSTERS, K.; FRANCO, A.A. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical Leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total protein. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.16, p.135-146, 1993.
- NAMBLAR, P.T.C.; ANJIAH, V. Competition among strains of *Bradyrhizobium* and vesicular-arbuscular mycorrhizae for groundnut (*Arachis hypogaea* L.) root infection and their effect on plant growth yield. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.8, p.311-318, 1989.
- NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Diversity and adaptability of soybean and cowpea rhizobia in tropical soils. In: International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics - The Role of Biological Nitrogen Fixation, Programme and Abstracts. Seropédica, EMBRAPA-CNPAB, 1995. p.39-40. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, 1996. (no prelo)
- NEVES, M.C.P. A new physiological approach for *Bradyrhizobium* strain selection. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 4., Buenos Aires, 1989. **Proceedings**, v.5, p.2177-2192.
- NEVES, M.C.P. Energy cost of biological fixation. In: GRAHAM, P.H.; HARRIS, S.C., ed. **Biological nitrogen fixation for tropical agriculture**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1982. p.77-92.
- NEVES, M.C.P.; DIDONET, A.D.; DUQUE, F.F.; DÖBEREINER, J. *Rhizobium* strain effects on nitrogen transport and distribution in soybeans. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.22, p.1179-1192, 1985.
- NEVES, M.C.P.; RAMOS, M.L.G.; MARTINAZZO, A.F.; BOTELHO, G.R.; DÖBEREINER, J. Adaptation of more efficient soybean and cowpea rhizobia to replace established populations. In: MULONGOY, K.; GUEYE, M.; SPENCER, D.S.C., ed. **Biological nitrogen fixation and sustainability of tropical agriculture**. Exeter: Wiley-Sayce, 1992. p.219-233.
- NEWCOMB, W.; WOOD, S.M. Morphogenesis and fine structure of *Franckia* (Actinomycetales): the microsymbiont of nitrogen-fixing actinorhizal root nodules. **International Review of Cytology**, San Diego, v.109, p.1-88, 1987.
- NICOL, H.; THORNTON, H.G. Competition between related strains of nodule bacteria and its influence on infection of the legume host. **Proceedings of the Royal Society of London, Biological Science**, London, v.130, p.32-59, 1941.
- NORRIS, D.O. The intelligent use of inoculants and lime pelleting for tropical legumes. **Tropical Grasslands**, Santa Lucia, v.1, p.107-121, 1967.

- NOUR, S.M.; Cleyet-Marel, J.C.; Normand, P.; Fernandez, M. Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.45, p.640-648, 1995.
- NOUR, S.M.; FERNANDEZ, M.P.; NORMAND, P.; CLEYET-MAREL, J.C. *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.). **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.44, p.511-522, 1994.
- OKON, Y. *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v.3, p.223-228, 1985.
- OKON, Y.; KAPULNIK, Y. Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.90, p.3-16, 1986.
- OKON, Y.; BURDMAN, S.; KIGEL, J.; ITZIGSOHN, R. Physiological properties of *Azospirillum brasilense* and its growth promoting effects in the rhizosphere. In: International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics: The Role of Biological Nitrogen Fixation, Programme and Abstracts. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 1995. p.55-56. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, 1996. (no prelo)
- OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of Gramineae. In: International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics - The Role of Biological Nitrogen Fixation, Programme and Abstracts. Seropédica, EMBRAPA-CNPAB: 1995. p.65-66. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, 1996. (no prelo)
- OLIVEIRA, L.A.; GRAHAM, P.H. Evaluation of strain competitiveness in *Rhizobium leguminosatum* bv. *phaseoli* using a nod+ fix- natural mutant. **Archives of Microbiology**, Berlin, v.54, p.305-310, 1990.
- OZAWA, T.; YAMAGUCHI, M. Fractionation and estimation of particle-attached and unattached *Bradyrhizobium* strains in soils **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.52, p.911-914, 1986.
- PADMANABHAM, S.; HIRTZ, R.D.; BROUGHTON, W.J. Rhizobia in tropical legumes: cultural characteristics of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* sp. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.22, p.23-28, 1990.
- PANKHURST, C.E. Symbiotic effectiveness of antibiotic-resistant mutants of fast and slow-growing strains of *Rhizobium* nodulating *Lotus* species. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.23, p.1026-1033, 1977.
- PATEL, J.J. Antagonism of actinomycetes against rhizobia. **Plant and Soil**, Hague, v.41, p.395-402, 1974.
- PENA-CABRIALES, J.J.; ALEXANDER, M. Growth of *Rhizobium* in soil amended with organic matter. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v.47, p.241-245, 1983.
- PENA-CABRIALES, J.J.; ALEXANDER, M. Survival of *Rhizobium* in soils undergoing drying. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v.43, p.926-966, 1979.
- PEOPLES, M.B.; GAULT, R.R.; LEAN, B.; SYKES, J.D.; BROCKWELL, J. Nitrogen fixation by soybean in commercial irrigated crops of central and southern New South Wales. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.26, p.553-561, 1995.
- PLAZINSKI, J.; ROLFE, B.G. Interaction of *Azospirillum* and *Rhizobium* strains leading to inhibition of nodulation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.49, p.990-993, 1985.
- RAMOS, M.L.G.; BODDEY R.M. Yield and nodulation of *Phaseolus vulgaris* and the competitiveness of an introduced *Rhizobium* strain: effects of lime, mulch and repeated cropping. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.19, p.171-177, 1987.
- RAMOS, M.L.G.; MAGALHÃES, N.F.M.; BODDEY, R.M. Native and inoculated rhizobia isolated from field grown *Phaseolus vulgaris*: Effects of liming an acid soil on antibiotic resistance. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.19, p.179-185, 1987.
- REANNEY, D.C. Viruses and evolution. **International Review of Cytology**, San Diego, v.37, p.21-52, 1974.
- REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I.; POT, B.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; THIELEMANS, S.; DE LEY, J. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth.). **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.37, p.43-51, 1987.
- REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T.; GILLIS, M.; HOSTES, B.; VANCANNEYT, M.; KERSTERS, K.; DE LEY, J. *Azoarcus* gen. nov., nitrogen-fixing proteobacteria associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth.), and description of two species, *Azoarcus indigenus* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.43, p.574-584, 1993.

- REIS JR., F.B.; OLIVARES, F.L.; OLIVEIRA, A.L.M.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Infection and colonization of *Acetobacter diazotrophicus* in sugar cane plantlets. In: International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics - The Role of Biological Nitrogen Fixation, Programme and Abstracts. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 1995. p.225-226.
- ROCHA, R.E.M.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Specificity of infection by *Azospirillum* spp. in plants with C₄ photosynthetic pathway. In: VOSE, P.B.; RUSCHEL, A.P., ed. **Associative N₂ fixation**. Boca Raton: CRC Press, 1981. p.67-69.
- ROPER, M.M.; LADHA, J.K. Biological N₂ fixation by heterotrophic and phototropic bacteria in association with straw. **Plant and Soil**. Dordrecht, v.174, p.211-224, 1995.
- ROSATO, A.S.; WOLTERS, A.; SELDIN, L.; VAN ELSAS, J.D. Quantitative analysis of *Paenibacillus azotofixans* in soil and rhizosphere of wheat using MPN-PCR. In: International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics - The Role of Biological Nitrogen Fixation, Programme and Abstracts. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 1995. p.228-229
- RUMJANEK, N.G.; DOBERT, R.C.; VAN BERKUN, P.; TRIPLETT, E.W. Common soybean inoculant strains in Brazil are members of *Bradyrhizobium elkanii*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, p.4371-4373, 1993.
- RUPELA, O.P.; SUDARSHANA, M.R. Displacement of native rhizobia nodulating chickpea (*Cicer arietinum* L.) by an inoculant strain through soil solarization. **Biology and Fertility of Soils**. Berlin, v.10, p.207-212, 1990.
- SANTOS, V.A.F.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Shading differentially affects the symbiotic efficiency of soybean nodulated by *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* strains. In: International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics: the Role of Biological Nitrogen Fixation, Programme and Abstracts. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 1995. p.176-177. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, 1996. (no prelo).
- SARDSHPANDE, J.S.; BALASUBRAMANYA, R.H.; KULKARNI, J.H.; BAGYARAJ, D.J. Protozoa in relation to *Rhizobium* S-12 and *Azotobacter chroococcum* in soil. **Plant and Soil**, Hague, v.47, p.75-80, 1977.
- SCHLAMMAN, H.R.M.; OKKER, R.J.H.; LUGTENBERG, B.J.J. Regulation of nodulation gene expression by NodD in rhizobia. **Journal of Bacteriology**. Washington, v.174, p.5177-5182, 1992.
- SCHOLLA, M.H.; ELKAN, G.H. *Rhizobium fredii* sp. nov., a fast-growing species that effectively nodulates sowbeans. **International Journal of Systematic Bacteriology**. Washington, v.34, p.484-486, 1984.
- SCOTTI, M.R.M.M.L.; NEVES, M.C.P.; PAIVA, E.; DÖBEREINER, J. Effect of soybean roots on strain competitiveness and protein profile of *Bradyrhizobium japonicum* adapted to Cerrado soils. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.65, p.427-438, 1993.
- SCOTTI, M.R.M.M.L.; SÁ, N.M.H.; VARGAS, M.A.T.; DÖBEREINER, J. Streptomycin resistance of *Rhizobium* isolates from Brazilian cerrados. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.54, p.733-738, 1982.
- SEGÓVIA, L.; YOUNG, J.P.W.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I as *Rhizobium elli* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**. Washington, v.43, p.374-377, 1993.
- SELDIN, L.; VAN ELSAS, J.D.; PENIDO, E.G.C. *Bacillus azotofixans* sp. nov., a nitrogen fixing species from Brazilian soils and grass roots. **International Journal of Systematic Bacteriology**. Washington, v.34, p.4551-456, 1984.
- SINGLETON, P.W.; BOHLOOL, B.B.; NAKAO, P.L. Legume response to rhizobial inoculation in the tropics: myths and realities. In: **Myths and Science of Soils in the Tropics**. Madison: Soil Science Society of American, 1992. p.135-155. (SSSA Special Publication, 29).
- SOBERÓN-CHAVEZ, G.; NÁJERA, R.; OLIVEIRA, H.; SEGÓVIA, L. Genetic rearrangements of a *Rhizobium phaseoli* symbiotic plasmid. **Journal of Bacteriology**. Washington, v.167, p.487-491, 1986.
- SOMASEGARAM, P.; HOBEN, H.J.; GURGUN, V. Effect of inoculation rate, rhizobial strain competition and nitrogen fixation in chickpea. **Agronomy Journal**, Madison, v.80, p.68-73, 1988.
- SPAINK, H.P. The molecular basis of the host specificity of the *Rhizobium* bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**. Dordrecht, v.65, p.81-98, 1994.
- SPRENT, J.; FARIA, S. M. DE. Mechanisms of infection of plants by nitrogen fixing organisms. In: SKINNER, F.A.; BODDEY, R.M.; FENDRIK, K.I., ed. **Nitrogen fixation with non-legumes**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1989. p.3-11.

- SPRENT, J. Evolution and diversity in the legume-rhizobium symbiosis: chaos theory? **Plant and Soil**, Dordrecht, v.161, p.1-10, 1994.
- SPRENT, J.I.; SPRENT, P. **Nitrogen fixing organisms — pure and applied aspects**. London: Chapman and Hall, 1990. 256p.
- STREETER, J.G.; SALMINEN, S.O.; BEUERLEIN, J.E.; SCHMIDT, W.H. Factors influencing the synthesis of polysaccharide by *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids in field-grown soybean nodules. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.2939-2943, 1994.
- STREIT, W.; KOSCH, K.; WENER, D. Nodulation competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* and *Rhizobium tropici* strains measured by glucuronidase (gus) gene fusion. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.14, p.140-144, 1992.
- TARRAND, J.J.; KRIEG, N.R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.8, p.967-980, 1978.
- THIAGARAJAN, T.R.; AHMAD, M.H. Influence of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus on the competitive ability of *Bradyrhizobium* spp. for nodulation of cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walp in non-sterilized soil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.15, p.294-296, 1993.
- THIES, J.E.; SINGLETON, P.W.; BOHLOOL, B.B. Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, p.19-28, 1991.
- THIES, J.E.; BOHLOOL, B.B.; SINGLETON, P.W. Environmental effects on competition for nodule occupancy between introduced and indigenous rhizobia and among introduced strains. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.38, p.493-500, 1992.
- THOMAS, P.M.; GOLLY, K.F.; ZYSKIND, J.W.; VIRGINIA, R.A. Variation of clonal, mesquite-associated rhizobial and bradyrhizobial populations from surface and deep soils by symbiotic gene region restriction fragment length polymorphism and plasmid profile analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.1146-1153, 1994.
- THOMPSON, J.A. Production and quality control of legume inoculants. In: BERGERSEN, F.J., ed. **Methods for evaluating biological nitrogen fixation**. Brisbane: Wiley, 1980. p.489-553.
- TIEN, T.M.; GASKIN, M.H.; HUBBELL, D.H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.37, p.1016-1024, 1979.
- TRAN VAN, V.; GILLIS, M.; HEBBER, K.P.; FERNANDEZ, M.; SEGERS, P.; MARTEL, M.H.; BERGE, O.; MAYER, J.M.; HEULIN, T. Isolation from the rice rhizosphere of a new species of nitrogen-fixing *Proteobacteria*, belonging to the genus *Burkholderia*. In: HEGAZI, N.A.; FAYEZ, M.; MONIB, M., ed. **Nitrogen fixation with non-legumes**. Cairo: American University in Cairo Press, 1994. p.299-309.
- TRINICK, M.J.; HADOBAS, T.A. The biology of the *Parasponia-Bradyrhizobium* symbiosis. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.110, p.177-185, 1988.
- TRIPLETT, E.W.; BARTA, T.M. Trifoliotoxin production and nodulation are necessary for the expression of superior nodulation competitiveness by *R. leguminosarum* bv. *trifolii* strains T24 on clover. **Plant Physiology**, Rockville, v.85, p.335-342, 1987.
- TRIPLETT, E.W.; SADOWSKY, M.J. Genetics of competition for nodulation of legumes. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.46, p.399-428, 1992.
- VAN BASTELAERE, E.; KEIJERS, V.; VERMEIREN, H.; VANDERLEYDEN, J. Isolation and characterization of plant-inducible genes in *Azospirillum brasilense*. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON NITROGEN FIXATION, 10., St. Petersburg, Rússia, 1995. p.100.
- VARGAS, A.T.; GRAHAM, P.H. Cultivar and pH effects on competition for nodule sites between isolates of *Rhizobium* in beans. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.117, p.195-200, 1989.
- VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.R. Efeito de tipos e níveis de inoculantes na soja (*Glycine max*) cultivada em um solo de cerrados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.15, p.343-347, 1980.
- VARGAS, M.A.T.; MENDES, I.C.; SUHET, A.R.; PERES, J.R.R. Fixação biológica de nitrogênio. In: ARANTES, N.E.; SOUZA, P.I.M., ed. **A Cultura da soja nos cerrados**. Piracicaba: POTAFOS/EMBRAPA, 1993. p.159-182.

- VIDOR, C.; MILLER, R.H. Relative saprophytic competence of *Rhizobium japonicum* strains in soils as determined by the quantitative fluorescent antibody technique (FA). **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.12, p.483-487, 1980.
- VLASSAK, K.; VANDERLEYDEN, J.; FRANCO, A.A. Competition and persistence of *Rhizobium tropici* and *Rhizobium etli* in tropical soil during successive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultures. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.21, p.61-68, 1996.
- WANG, C.L.; BERINGER, J.E.; HIRSCH, P.R. Host plant effects on hybrids of *Rhizobium leguminosarum* biovars *viceae* and *trifolii*. **Journal of General Microbiology**, Reading, v.132, p.2063-2070, 1986.
- WANI, S.P.; RUPELA, O.P.; LEE, K.K. Sustainable agriculture in the semi-arid tropics through biological nitrogen fixation in grain legumes. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.174, p.29-49, 1995.
- WATANABE, I.; BARRAQUIO, W.L. Low levels of fixed nitrogen required for isolation of free-living N₂-fixing organisms from rice roots. **Nature**, London, v.277, p.565-566, 1979.
- WATANABE, I.; LIN, C.; RAMIREZ, C.; LAPIS, M.T.; SANTIAGO-VENTURA, T.; LIU, C.C. Physiology and agronomy of *Azolla-Anabaena* symbiosis. In: SKINNER, F.A.; BODDEY, R.M.; FENDRIK, I., ed. Nitrogen fixation with non-legumes. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1989. p.57-62.
- WEAVER, R.W.; FREDERICK, L.R. Effect of inoculum rate on competitive nodulation of *Glycine max* L. Merrill. II Field studies. **Agronomy Journal**, Madison, v.66, p.233-236, 1974.
- WEBER, D.F.; MILLER, V.L. Effect of soil temperature on *Rhizobium japonicum* serogroup distribution in soybean nodules. **Agronomy Journal**, Madison, v.64, p.796-798, 1972.
- WOLFF, A.B.; STREIT, W.; KIPE-NOLT, J.A.; VARGAS, H.; WERNER, D. Competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* strains in relation to environmental stress and plant defense mechanisms. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.12, p.170-176, 1991.
- WOOMER, P.; SINGLETON, P.W.; BOHLOOL, B.B. Ecological indicators of native rhizobia in tropical soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, p.1112-1116, 1988.
- XU, L.M.; GE, C.; CUI, Z.; LI, J.; FAN, H. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov. isolated from the root nodules of soybean. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.45, p.706-711, 1995.
- YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; Oyaizu, H.; Yano, I.; Hotta, H.; Hashimoto, Y.; Ezaki, T.; Arakawa, M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes, 1981) com. nov. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v.36, p.1251-1275, 1992.
- YOUSSEF, A.N.; AL-NASSIRI, A.S.; AL-AZAWI, S.K.; ABDUL-HUSSAIN, N. Abundance of peanut rhizobia as affected by environmental conditions in Iraq. **Soil Biology**

2

ECOLOGIA DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

Adriana Parada Dias da Silveira

Seção de Microbiologia/Instituto Agronômico
Caixa Postal 28, CEP 13001-970, Campinas, SP

INTRODUÇÃO

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), durante seu ciclo de vida, são capazes de se associar simbioticamente a raízes de plantas, formando a assim denominada micorriza arbuscular. Pertencem à classe Zigomicotina, ordem *Glomales*, com três famílias *Glomaceae*, *Acaulosporaceae* e *Gigasporaceae*, cada uma com dois gêneros, *Glomus* e *Sclerocystis*, *Acaulospora* e *Entrophospora* e *Gigaspora* e *Scutellospora*, respectivamente, e cerca de 150 espécies descritas (Trufem, 1996). Tratando-se de um simbiote obrigatório, necessita do hospedeiro para poder completar seu ciclo vital, assim caracterizado: esporos de resistência germinam no solo e emitem um micélio vegetativo, que ao contactar a raiz de um hospedeiro suscetível produz um apressório, fixando-se a ela. Inicia, então, o processo de colonização da raiz pelo micélio, que se desenvolve inter e intracelularmente e se diferencia em duas estruturas características, arbúsculos e vesículas. Concomitantemente, o micélio externo cresce no solo para além da superfície da raiz, até que, em determinada fase de seu ciclo, o fungo esporula e novos esporos são liberados (Silveira, 1992).

A abundância e o estado fisiológico dos propágulos de FMA presentes no solo em uma determinada época, bem como as condições físicas, químicas e biológicas do solo influenciarão a magnitude dos processos envolvidos no ciclo de vida do fungo (Abbott & Gazey, 1994). Tais processos e fatores envolvidos na micorrização na ausência de competição (quando existe somente uma população de FMA) já são conhecidos e foram sumarizados na Tabela 1. No entanto, do ponto de vista ecológico, a simbiose micorrízica é uma comunidade de organismos, envolvendo muitos hospedeiros e diferentes fungos (Read, 1991), podendo ocorrer interações cujo entendimento é necessário para se prever o efeito de práticas de manejo sobre a colonização radicular por diferentes fungos, inoculados ou nativos.

Os FMAs têm grande potencial para promover o desenvolvimento das plantas e a agregação do solo. Entretanto, muitos fatores relacionados aos processos que permitem o sucesso da micorrização por fungos benéficos são desconhecidos ou muito pouco estudados. Questões como a maneira e extensão da colonização das raízes, capacidade de esporulação, grau de importância de cada estrutura fúngica (hifa, esporos e propágulos dentro de pedaços de raízes vivas ou mortas) quanto à sua capacidade infectiva em relação a diferentes hospedeiros e ecossistemas, as relações entre colonização e esporulação e sua importância para formação de uma subsequente micorriza, bem como os aspectos concernentes ao grau de adaptação ecológica de uma espécie a determinada condição edáfica e planta hospedeira, aos fatores que governam sua distribuição, aos efeitos das interações entre fungos nativos e introduzidos e de FMAs com outros organismos do solo, ainda são aspectos pouco estudados dentro da ecologia de FMA (Abbott & Gazey, 1994). Contudo, entende-se que parte dessa falta de conhecimento é conseqüência da inexistência de métodos simples e eficazes, capazes de quantificar e distinguir diferentes fungos colonizando a mesma raiz, o que, no entanto, está sendo superado com o uso de técnicas de biologia molecular.

O conhecimento sobre a diversidade das populações de FMA, seu papel e interações com o meio abiótico e biótico são requisitos básicos para o estabelecimento de manejo que permita o aumento no crescimento da planta, a sobrevivência e persistência de espécies fúngicas importantes em um determinado ambiente. É imprescindível considerar a importância que a ecologia dos FMAs assume quando o interesse

está no manejo agrícola e ambiental de tais fungos, visando a otimização dos efeitos benéficos da simbiose.

TABELA 1. Aspectos relacionados ao fungo e à planta envolvidos na micorrização.

PROCESSO	ASPECTOS
Disseminação de propágulos	número e estado fisiológico dos propágulos
Germinação de propágulos	tempo necessário para maturidade e quebra de dormência taxa de germinação e emissão do tubo germinativo — fatores intrínsecos do esporo e grau de estímulo provocado pelo meio externo comprimento e distribuição da hifa proveniente de esporos, de hifas velhas e de pedaços de raiz colonizada resposta diferenciada ao grau de estímulo oriundo de fatores abióticos e bióticos fatores de reconhecimento e de atração
Colonização radicular	grau de susceptibilidade da raiz (hospedeiro) ao fungo taxa de crescimento, distribuição e morfologia do micélio interno taxa de crescimento das raízes e morfologia do sistema radicular do hospedeiro resposta aos estímulos provocados por fatores abióticos e bióticos
Formação do micélio externo	comprimento e distribuição da hifa no solo resposta a fatores abióticos e bióticos
Esporulação	número de propágulos e tempo de produção em função do estágio da colonização e das características intrínsecas (genéticas) da espécie fúngica resposta a fatores abióticos e bióticos do meio

OCORRÊNCIA E DIVERSIDADE DE FMAS

A maioria das plantas (70%) é suscetível à formação de micorriza arbuscular, que ocorre em quase todas as famílias de plantas, com exceção das que formam ectomicorriza, *Pinaceae* e *Cupuliferae*, das que possuem associações específicas, *Ericales* e *Orquidaceae*, e de algumas famílias das monocotiledôneas e das dicotiledôneas, como *Brassicaceae*.

Os FMAs são de ocorrência generalizada em todos os ambientes terrestres, predominando nas regiões áridas e semi-áridas e nos solos com baixo teor de matéria orgânica (Allen *et al.*, 1995). Entretanto, vários fatores concorrem para sua redução ou eliminação de um determinado ambiente: sistema de cultivo, sistema de produção — monocultura, cultivo de planta não-hospedeira, sucessão de culturas, pousio prolongado, eliminação da vegetação — desmatamento, fogo, poluição, erosão, compactação, inundação, uso de fertilizantes em quantidades excessivas, uso de agrotóxicos sistêmicos (Abbott & Robson, 1991).

A ocorrência, diversidade e dinâmica de FMAs no solo, e conseqüentemente a formação da associação micorrízica, estão sujeitas a vários fatores abióticos e bióticos, conforme a Tabela 2.

Informações sobre a diversidade e a dinâmica de fungos micorrízicos em condições de campo são decorrência de estudos qualitativos e quantitativos de esporos e da quantidade de colonização radicular. Porquanto a abundância de esporos no solo não seja indicativa da quantidade de colonização e nem mesmo dos efeitos da simbiose, tais informações isoladamente não são essenciais, mas complementares, contribuindo em parte para o entendimento da simbiose.

Estudos ecológicos que visam estudar a diversidade de FMAs no nível de espécies são baseados na extração de esporos, o que possui duas limitações: 1) a ausência de esporos não indica necessariamente a ausência do fungo, pois existe um espaço de tempo entre a colonização e a esporulação e 2) muitos FMAs não podem ser identificados com precisão a partir de esporos coletados no campo, pois a taxonomia é baseada nas características morfológicas do esporo e hifa de sustentação, que nem sempre estão intactas. Portanto, a avaliação de esporos fornece apenas alguma informação sobre dispersão, distribuição de espécies e evidência sobre as interações entre fungos em uma determinada comunidade de plantas. Assim, uma vez colonizando a raiz, é difícil diferenciar espécies fúngicas somente pelo aspecto morfológico,

TABELA 2. Fatores abióticos e bióticos que interferem na ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares.

TIPO	COMPONENTE	FATORES
ABIÓTICOS	Solo	textura, estrutura, umidade, fertilidade, pH, poluição, salinidade, elementos tóxicos
	Meio ambiente	temperatura, luminosidade, poluição atmosférica, precipitação pluviométrica, estação do ano
	Manejo	forma de cultivo, suscetibilidade à erosão, fogo, pousio, compactação, desmatamento, irrigação, drenagem, adubação e correção, controle de pragas, doenças e ervas daninhas, pastagem, agrotóxicos
BIÓTICOS	Planta	cobertura vegetal, idade, ciclo, diversidade, nutrição, sistema radicular, exsudação radicular, produção de substâncias alelopáticas
	Outros organismos	antagonistas, organismos sinérgicos

o que dificulta os estudos de variação sazonal da micorrização, de interações intra e interespecíficas e de sobrevivência e persistência de fungos inoculados ou não. Nos estudos de distinção de FMAs dentro da raiz estão sendo empregados métodos morfológicos, imunológicos e moleculares que, na verdade, são complementares e devem ser usados em conjunto nos estudos de ecologia (Morton & Bentivenga, 1994). Abstendo-se dos detalhes, que não cabem neste capítulo, os principais métodos empregados são:

Morfológicos – Possibilitam discriminar FMAs dentro da raiz através da morfologia de hifa (padrão de crescimento e diâmetro) e de vesículas (Lopez-Aguillar & Mosse, 1987; Sainz *et al.*, 1990). Entretanto, a morfologia pode se alterar com o hospedeiro, com a idade das raízes em uma mesma planta e com o fornecimento de fósforo (P). Têm sido

usados para monitorar a inoculação de fungo no campo (Abbott *et al.*, 1983), estudar a competição entre fungos durante o processo da colonização (Pearson *et al.*, 1993) e quantificar a atividade de fungos de diferentes morfologias no campo (Scheltema *et al.*, 1987).

Isozimas – Fornecem evidências sobre o grau de competição entre fungos no processo de colonização radicular (Hepper *et al.*, 1988), para fungos que apresentem hifas internas similares.

Imunológicos – Empregados na identificação de fungos dentro da raiz (Wright & Morton, 1989) ou de hifa e esporos de diferentes espécies do mesmo gênero ou não (Sanders *et al.*, 1992).

Técnicas moleculares – Permitem identificação e quantificação precisa do fungo colonizando a raiz (Simon *et al.*, 1992), facilitando estudos de diversidade e dinâmica da colonização por diferentes FMAs no campo.

Qualquer perturbação no solo em um ecossistema natural, desde um simples cultivo até um processo de degradação erosiva, poderá modificar a dominância de uma espécie fúngica na formação da micorriza. À medida em que a severidade da perturbação do ecossistema aumenta, a diversidade de FMAs diminui. Em solo submetido à erosão simulada, por exemplo, houve uma queda de 35% na colonização radicular e no número de esporos, não havendo, no entanto, alteração acentuada na composição da comunidade de fungos micorrízicos do solo (Silva *et al.*, 1992).

A manutenção de diversidade de FMA no solo é vantajosa, pois permite que algum fungo favorável passe a dominar se as condições do solo mudarem. Portanto, a diversidade de FMAs está atrelada às condições estritas do ambiente, e a intensidade da perturbação (manejo) pode determinar a predominância de fungos eficientes e infectivos, o que é essencial para se prever quais fungos são mais prováveis de serem favorecidos em um solo e hospedeiros em particular. A calagem do solo, por exemplo, pode alterar a composição de FMAs nativos, favorecendo populações mais eficientes.

A distribuição e abundância de FMAs também é função do pH do solo (Porter *et al.*, 1987a,b), o que determina a ocorrência de certas espécies em meios edáficos específicos. Assim, FMAs já foram encontrados em solos com pH variando de 2,7 a 9,2, com diferenças qualitativas de um local para outro. Por exemplo, espécies do gênero *Gigaspora* normalmente são mais abundantes em solos de pH baixo.

Os FMAs são particularmente importantes em condições edáficas estressantes, como solos ácidos e distróficos, como a grande parte dos solos das regiões tropicais. A baixa disponibilidade de nutrientes, aliada à baixa mobilidade de nutrientes importantes como P, Cu e Zn, fazem da micorrização uma condição imprescindível ao desenvolvimento vegetal nestas condições. Além disso, plantas com sistema radicular pouco ramificado e escasso em pêlos absorventes apresentam acentuado micotrofismo, ou seja, dependem da associação com fungos micorrízicos para absorverem nutrientes e garantirem o crescimento (Baylis, 1975).

Allen *et al.* (1995) apontam que a diversidade de FMAs não segue a de plantas, ou seja, pode haver abundância de populações de FMAs na presença de poucas espécies vegetais ou vice-versa. No entanto, a micorriza pode regular a comunidade de plantas de um determinado ambiente, pois qualquer mudança na comunidade de FMAs pode acarretar alteração na composição da comunidade de plantas (Giovannetti & Gianinazzi-Pearson, 1994) e vice-versa, a comunidade de plantas afeta a composição de fungos (Sanders & Fitter, 1992). Deste modo, o manejo agrícola pode atuar como força de seleção das populações de FMAs. Como se sabe, monocultura e sistema intensivo de manejo reduzem drasticamente a quantidade e a diversidade de FMAs.

Um enfoque interessante no estudo e avaliação da biodiversidade de FMAs é proposto por Giovannetti & Gianinazzi-Pearson (1994). Baseado no fato de serem biotróficos obrigatórios e na conseqüente dificuldade de se obter informações sobre a genética desses fungos, os autores consideram que os aspectos morfológicos, biológicos e moleculares são fontes de variabilidade dos FMAs e devem ser analisados nesses estudos. A Tabela 3 resume os principais atributos que concorrem para a diversidade desses fungos.

DISPERSÃO E DISSEMINAÇÃO

Já é bastante conhecido o fato de os fungos micorrízicos arbusculares serem de distribuição cosmopolita e de ampla ocorrência, sendo que seus propágulos, principalmente esporos, são encontrados nos mais diversos ecossistemas terrestres, como solos agrícolas, florestas, dunas e deserto, e em todas as classes de plantas, tanto terrestres como aquáticas (Silveira, 1992).

TABELA 3. Fontes da biodiversidade de fungos micorrízicos arbusculares (baseado em Giovannetti & Gianinazzi-Pearson, 1994).

CARACTERÍSTICAS	ASPECTOS ABORDADOS	PARÂMETROS DE DIVERSIDADE
MORFOLÓGICAS	esporos	ocorrência, tamanho, formato e cor do esporocarpo ocorrência e características do perídium cor, tamanho e forma do esporo número, cor, espessura e ornamentação da parede do esporo forma e tipo de inserção da hifa de sustentação
	citoquímica e ultra-estrutura da parede padrão de colonização	composição (polímeros) da parede do esporo e da hifa morfologia do micélio interno estruturas típicas: arbúsculos, vesículas e células auxiliares
BIOLÓGICAS	ontogenia de esporos	características da formação de esporos e esporocarpos
	germinação de esporos	padrão de germinação e quantidade de micélio produzido dormência influência de fatores bióticos e abióticos
	infectividade	nível e forma de colonização radicular fatores que afetam a colonização: germinação do esporo, formação do apressório, pontos de infecção, espécie de fungo, hospedeiro
	eficiência simbiótica	grau de eficiência do micélio na absorção e translocação de nutrientes (fósforo) taxa de troca de carbono-fósforo durante a simbiose
	biogeografia, requerimentos edáficos e tolerância ambiental	distribuição das espécies e fatores que interferem na ocorrência e diversidade

CARACTERÍSTICAS	ASPECTOS ABORDADOS	PARÂMETROS DE DIVERSIDADE
MOLECULARES	perfil de proteínas	quantidade e padrão eletroforético de proteínas e polipeptídeos em esporos identificação serológica a partir de proteínas isoladas
	polimorfismo de isoenzimas	variação do padrão de isoenzimas entre espécies e isolados, em esporos e raízes
	análise de DNA	variabilidade genética e filogenética

A descoberta de plantas-fósseis com estruturas semelhantes às formadas por FMA datadas de milhões de anos, sugere que foram largamente disseminados entre os continentes (Hetrick, 1984).

A disseminação ativa de FMA, que diz respeito ao crescimento do micélio através do solo, varia para cada espécie de fungo e depende de fatores ambientais externos. Assim, a velocidade de alastramento do micélio no solo sofre a influência de:

- a) grau de competição entre as populações de FMAs nativas e introduzidas;
- b) presença de plantas suscetíveis ou não à micorrização, o que pode determinar a qualidade e quantidade de populações de FMA no solo;
- c) espécie da planta e tipo de sistema radicular, pois plantas com extenso sistema radicular possuem pequena densidade radicular e reduzida taxa de disseminação do micélio;
- d) fertilidade do solo, flutuação sazonal da umidade e temperatura e atividade microbiana.

A disseminação passiva de FMA ocorre pela ação do vento, da água, de outros microrganismos e animais. A ação de animais, principalmente roedores (ratos e camundongos), como vetores, ocorre pela ingestão de esporos ou mesmo esporocarpos, que, mesmo passando pelo sistema digestivo do animal, permanecem intactos e capazes de germinar (Rabatin & Stinner, 1988). Há casos descritos na literatura de vetores como gafanhotos, grilos, coelhos, minhocas, formigas e pássaros que também podem disseminar esporos, translocando-os do interior para a

superfície do solo, o que favorece sua posterior dispersão pelo vento. A disseminação de FMA por animais parece ser determinante na revegetação de áreas degradadas ou que sofrem atividade vulcânica. Finalmente, a atividade humana, transportando solo aderido a ferramentas e equipamentos agrícolas, plantas e sementes, facilita a disseminação de esporos.

GERMINAÇÃO DE ESPOROS

O fato de os FMAs serem biotróficos obrigatórios, ou seja, não se multiplicarem na ausência do hospedeiro, torna escassos os estudos sobre a ecofisiologia da germinação de esporos. A germinação de esporos de FMA pode, na verdade, ser muito mais influenciada por fatores físicos e químicos do ambiente e por microrganismos do solo do que pela presença ou não da planta hospedeira. Além disso, as técnicas envolvidas nesses estudos, realizados na maioria *in vitro*, ficam limitadas à transferência de inóculo asséptico, esporos ou fragmentos de raiz colonizada para placas com meio de cultura ou outro substrato (solo ou areia). Muitos destes estudos, na verdade, têm como objetivo o cultivo axênico de FMA, contribuindo, no entanto, para o entendimento sobre os fatores ecológicos que regem a germinação de esporos.

Se por um lado a germinação é um processo pouco estimulado por fatores do meio, por outro lado a emissão do tubo germinativo e o crescimento micelial subsequente são efetivamente estimulados por diversos fatores. Tais fatores, que afetam a germinação e o crescimento micelial assimbiótico de FMAs, serão discutidos a seguir.

Fatores Nutricionais

Um grande número de fatores nutricionais tem sido estudado em cultura axênica, verificando-se, entretanto, que poucos exercem efeito benéfico ou estimulante, não causando, na maioria, nenhum efeito ou inibição. Esporos de FMA são capazes de germinar em água ou em ágar. Entretanto, compostos orgânicos, como açúcares e ácidos, podem inibir ou estimular o crescimento micelial, dependendo da concentração (Silva, 1990). Alguns ácidos orgânicos, como oxalacético, pirúvico, acético, cítrico e tartárico estimulam a germinação e o crescimento da hifa, enquanto outros, como aspártico, succínico e málico, reduzem.

Carboidratos, principalmente glicose, apresentam efeito detrimental, enquanto sacarose pode favorecer o crescimento micelial. Alguns poucos aminoácidos, em particular cistina, lisina e glicina estimulam o crescimento, enquanto a maioria deles, bem como os que compõem os exsudatos radiculares, são inibitórios ou pouco influenciam esse crescimento. Algumas vitaminas e cofatores também apresentam efeito estimulante. É interessante salientar, no entanto, que substratos complexos como exsudatos e extratos de raiz, extrato de levedura, peptona, extrato de solo e dialisado de sementes promovem aumentos significativos na germinação e no crescimento micelial (Siqueira & Hubbell, 1986; Elias & Safir, 1987).

Compostos inorgânicos são predominantemente inibidores da germinação. Sais de N, K, Na, Al, Cu, Zn, Mn e Cl podem inibir o crescimento micelial. Pelo menos para o Mn, Cu e Zn já se demonstrou que o efeito sobre a germinação é fungistático. O fósforo também afeta o crescimento, mas de forma variável em função da fonte, concentração e pH. A disponibilidade de P no solo pode afetar a germinação e o crescimento inicial da hifa (Miranda & Harris, 1994), sendo que, por exemplo, a adição de fosfato de cálcio ao meio estimula a germinação. O N não apresenta efeito sobre a germinação e pode inibir o crescimento do tubo germinativo, enquanto fontes de S, sulfitos e metabisulfitos, apresentam efeito estimulatório sobre o crescimento micelial. Estudos *in vitro* têm mostrado que compostos inorgânicos podem causar modificações morfológicas no micélio, como aumento de ramificações e do número de tubos germinativos por esporo, além de alterar a intensidade da corrente citoplasmática do micélio. Na verdade, há necessidade de um balanceamento adequado dos nutrientes para que a germinação seja estimulada.

pH

O pH é um dos fatores edáficos de maior importância, principalmente nos solos tropicais distróficos, uma vez que altera a solubilidade do Al, Fe, Mn, Cu e Zn, que em níveis tóxicos podem reduzir a germinação de esporos e o crescimento do tubo germinativo (Lambais & Cardoso, 1989). A intensidade de redução ou inibição depende do grau de adaptação da espécie fúngica ao pH do meio, que afeta mais a germinação do que o crescimento do tubo germinativo. A natureza do fator fun-

gistático do solo ácido parece ser devida principalmente ao íon H^+ ou ao Al^{3+} . Assim, aumento na quantidade de Al em solução pode reduzir drasticamente a germinação de esporos e o crescimento do tubo germinativo, como observado na Fig. 1, sendo que a intensidade varia com a espécie de fungo.

O pH ótimo para a germinação difere para cada espécie de FMA e está relacionado ao pH do ambiente no qual a espécie é nativa, ou seja, ecologicamente adaptada. Considera-se que, no geral, os gêneros *Gigaspora*, *Scutellospora* e *Acaulospora* preferem pH mais ácido, de 4 a 6, enquanto *Glomus*, na faixa de 6 a 8, ou seja, os primeiros apresentam maior tolerância a pH ácido. Além disso, *Gigaspora* germina em uma ampla faixa de pH, enquanto *Glomus*, em uma faixa mais estreita.

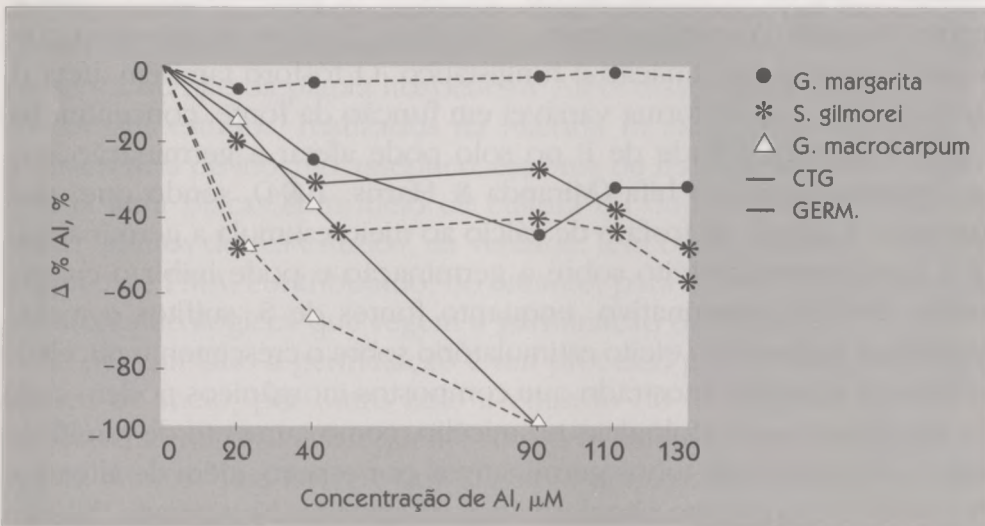


FIGURA 1. Variação percentual média da germinação dos esporos e do crescimento do tubo germinativo de FMAs, em diferentes concentrações de alumínio (extraído de Lambais & Cardoso, 1989).

Temperatura

A faixa de temperatura ótima para a germinação é variável com a espécie fúngica e determinada pela sua adaptação ecológica. No geral, espécies adaptadas a ambientes tropicais e subtropicais germinam melhor entre 25 a 30°C, enquanto as espécies de ambiente de clima temperado, entre 18 a 20°C. O crescimento micelial parece ser pouco sensível às variações de temperatura.

Potencial Hídrico

A umidade é um fator importante, principalmente no início do processo de germinação. A sensibilidade ao potencial hídrico do solo varia com o gênero ou a espécie. *Glomus* germina melhor com a umidade do solo variando entre a saturação e a capacidade de campo; *Gigaspora*, por sua vez, é mais sensível e apresenta baixos níveis de germinação e de crescimento do tubo germinativo em baixos potenciais de água do solo. A relação O_2/CO_2 geralmente não apresenta efeito sobre a germinação, mas um aumento na concentração de CO_2 pode reduzir o crescimento de hifas, que também são sensíveis a baixos potenciais de água e baixas tensões de O_2 .

Fatores Bióticos

O impacto da biota do solo sobre a germinação de esporos pode ter efeitos contrastantes, desde sua supressão em solos não-esterilizados, devido à presença de microbiota antagônica, até mesmo o estímulo por bactérias da rizosfera ou por filtrados livres de células de sua cultura. Também podem ocorrer interações específicas entre *Streptomyces* e diferentes FMAs (Tylka *et al.*, 1991). Microrganismos rizosféricos também podem inibir a germinação de esporos de FMA (Calvet *et al.*, 1992) ou retardá-la, devido à produção de antibióticos por isolados de *Pseudomonas* (Paulitz & Linderman, 1989).

Diversas espécies de fungos das classes Chytridiomicetos e Deuteromicetos são hiperparasitas de FMAs. O uso de antibióticos no meio ou na desinfestação superficial de esporos, para cultivo, pode reduzir a germinação e crescimento do tubo germinativo. Da mesma forma, a aplicação de fungicidas reduz a viabilidade de esporos.

Fatores Intrínsecos ao Esporo

A idade do espora pode ser um fator determinante para a germinação, assim como o período de dormência, que pode variar desde poucas semanas até diversos meses. Assim, a baixa germinação de esporos pode estar associada a barreiras estruturais e dormência, devido à presença de auto-inibidores e/ou desbalanços nutricionais, que bloqueiam ou modificam processos bioquímicos envolvidos na germinação. A viabilidade e a quebra de dormência podem estar relacionadas à temperatura e ao período de armazenamento do espora.

Fatores Inerentes à Planta

A presença de suspensão de células vegetais pode aumentar a germinação e estimular a ramificação e o crescimento micelial (Paula, 1988). O crescimento assimbiótico de FMA *in vitro* ainda pode ser estimulado por exsudados radiculares, pela presença de calos, extratos de células ou compostos estimulantes do crescimento e de raízes intactas (Paula, 1988; Becard & Piché, 1989; Elias & Safir, 1987). Substâncias químicas de origem vegetal, flavonóides e isoflavonóides, também aumentam a germinação de esporos e o crescimento inicial da hifa (Gianninazzi-Pearson *et al.*, 1989; Tsai & Phillips, 1991), o que ainda pode ser incrementado com o enriquecimento do meio com CO₂. No entanto, é interessante notar que os esporos de FMA germinam na ausência total de raízes, na presença de plantas não-hospedeiras e até mesmo ectomicorrízicas, o que reflete a adaptação desses fungos a uma extensa gama de hospedeiros, ou melhor, falta de especificidade.

COLONIZAÇÃO, MICÉLIO EXTERNO E ESPORULAÇÃO

A colonização radicular e a subsequente esporulação são influenciadas por fatores ambientais do hospedeiro e do fungo e estão bastante relacionadas, sendo que os que estimulam ou inibem a colonização também o fazem em relação à esporulação.

A quantidade e os tipos de propágulos de FMA no solo afetam o processo e a dinâmica da colonização radicular. Segundo Abbott & Gazey (1994), para se entender e obter um modelo do processo de colonização não se pode excluir os efeitos do solo e das condições do ambiente sobre o crescimento da hifa a partir dos propágulos, colonização radicular, esporulação e formação de outros propágulos e o crescimento do micélio externo, além dos aspectos relacionados à dormência e à maturidade do esporo, susceptibilidade da raiz à infecção e a relação C/P da planta hospedeira.

Fatores Abióticos

Entre os vários fatores que interferem no estabelecimento da micorriza, o solo desempenha o papel mais importante. Variações nos níveis de pH, umidade, salinidade e, principalmente, de fertilidade afetam de forma drástica os processos de infecção, colonização e esporulação.

No geral, constata-se que o máximo de colonização e esporulação ocorre em condições de baixa fertilidade do solo, podendo acontecer, no entanto, com menor frequência em solos muito férteis com plantas exibindo alto grau de colonização. O efeito da concentração de P disponível na solução do solo sobre a ecologia de FMA ainda é um aspecto controvertido. Quando aplicado em doses elevadas, além de reduzir a colonização das raízes, ou mesmo inibi-la, também diminui o micélio externo e a esporulação, o que entretanto não é regra, pois também se observa efeito neutro ou contrário. Outro aspecto a ser considerado diz respeito à fonte de fosfato, que, devido a diferenças na solubilidade, afeta de forma diferente os FMAs (Fig. 2). Não se sabe exatamente como o P interfere na colonização das raízes, mas sabe-se que mecanismos genéticos, bioquímicos e fisiológicos estão envolvidos (Cooper, 1984; Lambais & Mehdy, 1993). Altos níveis de N podem reduzir a colonização, sendo que o grau de inibição depende também da forma de N aplicada, pois a amoniacal é mais inibitória que a nítrica. Embora altos níveis de P e N no solo inibam ou reduzam a colonização radicular e a esporulação, é principalmente o estado nutricional da planta, e não a fertilidade do solo, que determina o grau de colonização e formação de esporos. Existe correlação negativa entre a porcentagem de colonização e a concentração de Zn, Fe e Cu no solo. Além disso, o Al e Mn podem inibi-la, sendo o Al cinco vezes mais potente que o Mn. O efeito do Al é ilustrado na Fig. 3, onde também se observa que o genótipo da planta hospedeira pode influenciar na colonização e esporulação.

A acidez do solo pode afetar o processo de colonização das raízes (Lambais & Cardoso, 1988; Maluf *et al.*, 1988). A intensidade com que o pH afeta a colonização radicular depende da espécie ou isolado do fungo, bem como da combinação fungo-hospedeiro (Fig. 4). No geral, os gêneros *Gigaspora*, *Scutellospora* e *Acaulospora* apresentam maior colonização em valores de pH mais baixos, enquanto *Glomus*, em valores próximos ao neutro ou alcalino.

Fatores do solo, como textura e grau de compactação, podem afetar tanto a colonização como a esporulação de FMA (Primavesi *et al.*, 1988).

O desenvolvimento e distribuição das hifas externas de FMAs variam com o tipo de solo, planta hospedeira e a espécie de FMA (Sylvia, 1992). Assim como ocorre com o micélio interno, baixo nível de P disponível no solo estimula o crescimento de hifas externas, enquanto altos níveis o inibem (Abbott *et al.*, 1984).

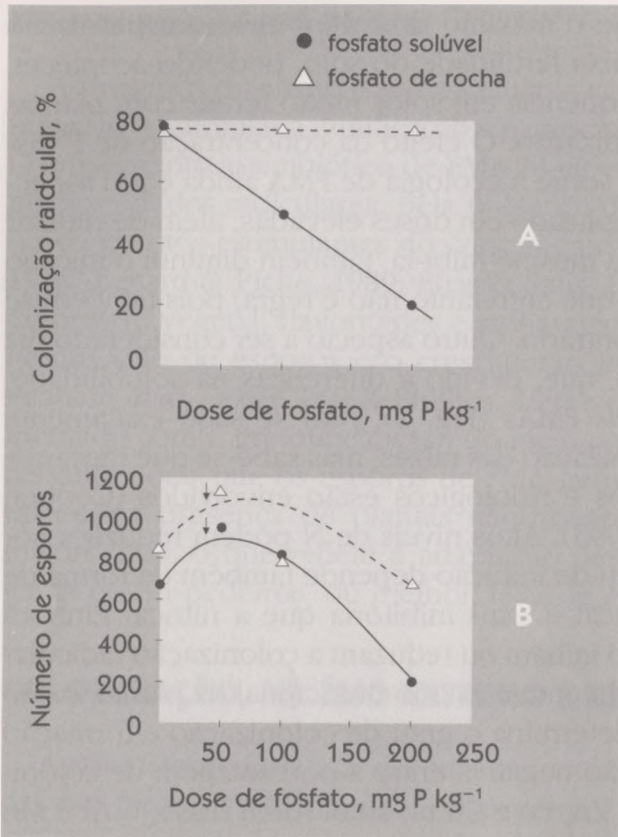


FIGURA 2. Colonização radicular (A) e número de esporos (B) de *Glomus etunicatum*, em plantas cítricas adubadas com doses crescentes de fosfato solúvel e fosfato de rocha (extraído de Antunes & Cardoso, 1991).

Características do solo como pH, concentração de Cu, teor de matéria orgânica e umidade também podem afetar o micélio extra-radicular.

Tanto a colonização como a esporulação são favorecidas quando a umidade do solo é inferior à capacidade máxima de retenção de água (Sieverding, 1981). O máximo de colonização e esporulação foi observado quando 60% do VTP (volume total de poros do solo) estava preenchido com água, o que, entretanto, depende do nível de P disponível no solo (Paula & Siqueira, 1987). A colonização também é influenciada qualitativa e quantitativamente pela concentração de O₂ na atmosfera do solo.

Existe uma variação considerável no grau de resposta de cada espécie de FMA e da combinação fungo-hospedeiro à temperatura, sendo que, em geral, há um aumento na porcentagem de colonização e esporulação ao redor de 30°C. Na verdade, há uma temperatura ideal para a formação de cada estrutura fúngica. A influência da intensidade lumi-

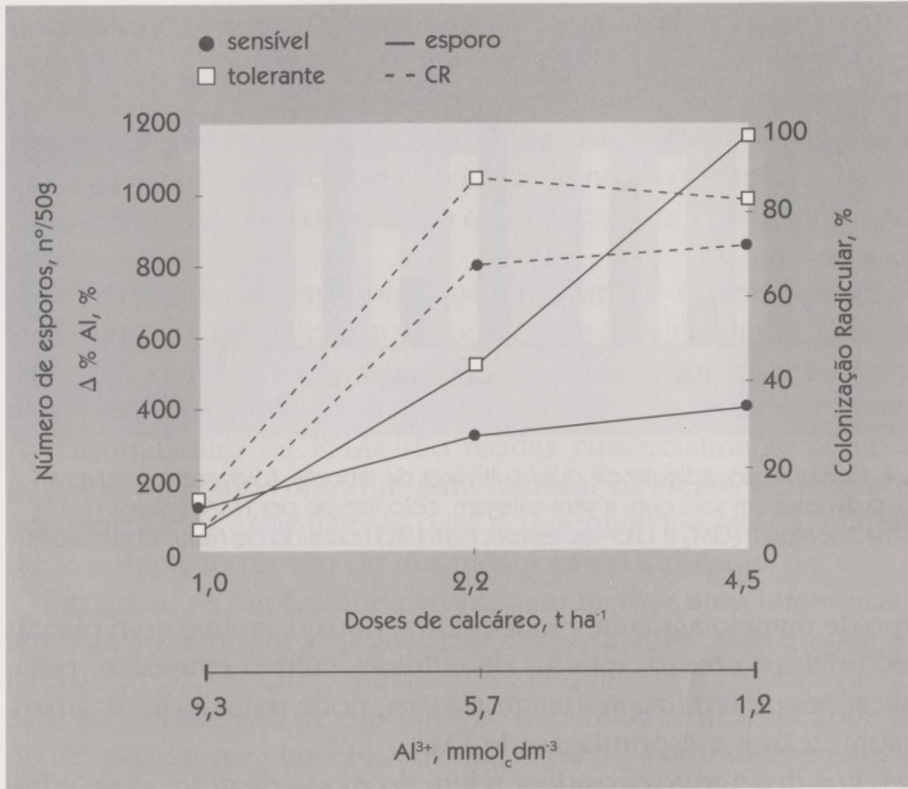


FIGURA 3. Número de esporos de *Glomus* sp. e colonização radicular de plantas de trigo, cultivares Anahuac (sensível) e IAC-5 (tolerante ao Al), cultivadas em um latossolo vermelho escuro argiloso, com adição de doses crescentes de calcáreo (extraído de Silva *et al.*, 1994).

nosa sobre a colonização é conflitante. Comumente se associa maior colonização radicular com alta luminosidade, mas é possível ocorrer uma rápida e extensa colonização sob baixa luminosidade (Furlan & Fortin, 1978). O tipo de estrutura fúngica formada também pode ser alterada pelo grau de sombreamento, ou seja, baixa intensidade de luz pode aumentar o número de arbúsculos e diminuir o de vesículas. A luminosidade também afeta indiretamente a colonização, através de seu efeito na fotossíntese e metabolismo do hospedeiro. Já foi observado que aumento na intensidade luminosa e no fotoperíodo (doze horas ou mais) aumentam a colonização, havendo interação entre estes dois fatores. A intensidade luminosa apresenta efeito menos pronunciado sobre a esporulação. Há um pico de esporulação geralmente no verão, que pode estar relacionado ao clima e à cultura.

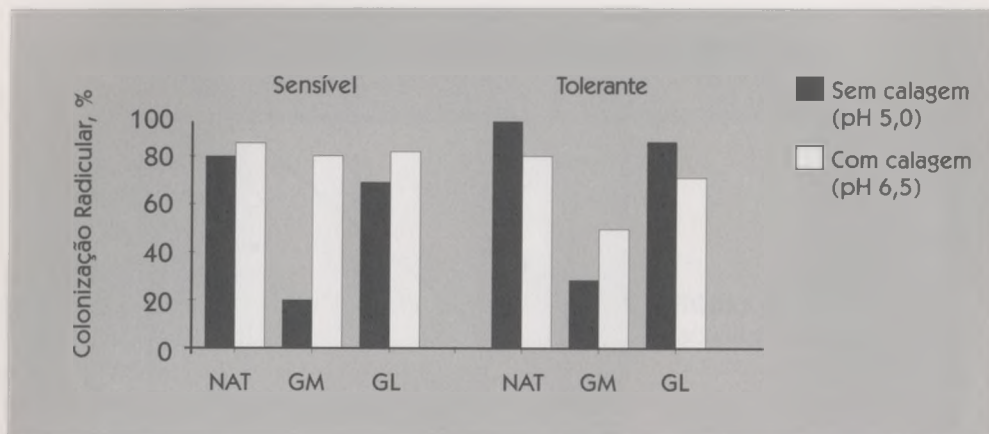


FIGURA 4. Colonização radicular de duas cultivares de leucena, tolerante e sensível ao alumínio, cultivadas em solo com e sem calagem, colonizadas por FMA nativos (NAT), *Glomus macrocarpum* (GM) e *Glomus leptotichum* (GL) (extraído de Maluf *et al.*, 1988).

O tipo de manejo agrícola, monocultura, pousio, cultivo com plantas não micorrízicas, erosão, rotação de culturas, cultivo extensivo, pesadas aplicações de fertilizantes e agrotóxicos, pode reduzir drasticamente a colonização e a esporulação de FMA.

Os efeitos dos agrotóxicos dependem do modo de ação, dose e frequência de aplicação. Geralmente, os herbicidas não são inibitórios, e, ao contrário, alguns estimulam a colonização; nematicidas e inseticidas não causam efeito, enquanto os fungicidas são na maioria inibitórios, principalmente os sistêmicos.

Fatores Bióticos

Planta hospedeira

A presença ou não da planta hospedeira desempenha papel importante na colonização e subsequente esporulação. Plantas consideradas não micorrízicas, como Chenopodiáceas e Crucíferas podem ser colonizadas na presença de plantas hospedeiras. No entanto, a presença de plantas não-hospedeiras pode reduzir a colonização de hospedeiras, provavelmente devido à exsudação de algum composto tóxico. Além disso, há evidência de competição entre plantas micorrízicas, que apresentam redução na colonização quando cultivadas em conjunto, provavelmente devido ao aumento na quantidade de raiz disponível para colonização.

Embora os FMAs tenham uma larga gama de hospedeiros, existem associações preferenciais entre a planta e certas espécies de fungo que podem refletir em maior estímulo no crescimento, colonização radicular mais extensa e esporulação mais abundante, apesar de não haver necessariamente correlação entre eles. O genótipo de ambos tem influência sobre o grau de colonização das raízes, bem como sobre o desempenho da simbiose.

A expressão de genes presentes na planta e no fungo, sob ação do ambiente, resulta em eventos bioquímicos e morfológicos que determinam a colonização radicular. Os flavonóides, fatores químicos ativos originados da planta, estimulam a colonização radicular. Estas substâncias estimulantes de FMAs são usadas comercialmente como aditivo para solo, e visam contribuir para otimizar os efeitos benéficos de fungos inoculados e/ou nativos para o desenvolvimento da cultura, e reduzir o impacto do uso de insumos sobre o ambiente.

Em geral, os fatores que determinam melhor crescimento da planta também influenciam a colonização e esporulação. Assim, poda e desfoliação são fatores que contribuem para diminuir a colonização e esporulação. O processo de esporulação geralmente aumenta após o período de intenso crescimento radicular e/ou na maturidade e senescência do hospedeiro. Fatores ligados à planta hospedeira, tais como a espécie vegetal e a produção de produtos fotossintetizados, também interferem no desenvolvimento do micélio externo. Outras características do hospedeiro, como estado nutricional, ciclo e taxa de crescimento podem interferir.

FMA

Existe uma variação sazonal na colonização radicular, o que depende de cada espécie de fungo (Balota, 1990). A dinâmica da formação da micorriza é característica de cada fungo, devido a diferenças no crescimento da hifa e à capacidade do fungo em usar o substrato carbônico da raiz do hospedeiro (Pearson & Jakobsen, 1993).

O conhecimento sobre a natureza das relações entre colonização e esporulação (ou formação de propágulos infectivos) se restringe a poucos fungos obtidos individualmente (Gazey *et al.*, 1992).

Dentro de limites, aumento na densidade de inóculo resulta em aumento na colonização. Entretanto, o mais importante é que alta densidade de inóculo pode determinar uma colonização mais precoce, o que é desejável principalmente para plantas de ciclo curto.

A influência de uma mistura de espécies de FMAs sobre a colonização e esporulação ainda não está totalmente elucidada, como já foi comentado, devido à similaridade morfológica das estruturas formadas por estes fungos. Só é possível diferenciar espécies ou gêneros que produzam estruturas morfológicamente distintas, como, por exemplo, *Gigaspora* de *Glomus*, já que o primeiro não produz vesículas. Em um inóculo misto, uma espécie pode ser mais competitiva e agressiva, colonizando mais precoce e abundantemente a raiz. Diferenças na habilidade competitiva entre espécies também podem ser atribuídas ao grau de adaptação da espécie a condições específicas do solo.

Biota do solo

Uma vez o esporo germinado, enquanto a hifa se desenvolve em direção à raiz do hospedeiro, o FMA interage com rizobactérias, muitas delas habitantes naturais da risosfera, podendo ocorrer tanto redução como estímulo no crescimento da hifa e colonização, facilitando ou não o estabelecimento da simbiose. A micorrizosfera, ao mesmo tempo em que exerce efeito seletivo sobre a atividade microbiana no solo circunjacente, como consequência da alteração na exsudação radicular, também é influenciada por esta mesma biota: actinomicetos podem aumentar a colonização radicular (Ames, 1989); diferentes isolados de *Pseudomonas* spp. do grupo fluorescente podem estimular ou diminuir a colonização, dependendo do fungo (Silveira *et al.*, 1995); pode ocorrer diminuição na colonização causada por *Streptomyces griseoviridis* (Wyss *et al.*, 1992). No caso de fungos ectomicorrízicos, há bactérias intimamente associadas ao fungo, denominadas "mycorrhization helper bacteria" (MHB), que desempenham um papel positivo na formação e desenvolvimento da micorriza (Garbaye & Bowen, 1989). Da mesma forma, existem as rizobactérias promotoras do crescimento das plantas (RPCPs), representadas principalmente pelas pseudomonas fluorescentes e bacilos, que promovem o crescimento das plantas estimulando o estabelecimento e funcionamento da micorriza arbuscular.

O crescimento do micélio interno do FMA pode sofrer uma competição direta por outros organismos que colonizam também a raiz, como nematóides e fungos patogênicos, ocorrendo competição por espaço físico (Muchovej *et al.*, 1991).

Animais do solo também podem reduzir a colonização das raízes, devido a processo físico de dano mecânico ao micélio externo (Kaiser

& Lussenhop, 1991), ou estimular o crescimento do fungo (Harris & Boerner, 1990). O desenvolvimento do micélio externo é bastante vulnerável a danos causados pela fauna do solo, que causa ruptura da hifa, que pode até ser ingerida pelo animal, limitando o desenvolvimento do micélio ou desconectando-o do micélio interno (Fitter & Garbaye, 1994). Poucos estudos descrevem os efeitos da biota do solo sobre o micélio externo, especulando sobre a possibilidade de actinomicetos estarem envolvidos na inibição do crescimento das hifas externas e de que Colémbolas se alimentariam dessas hifas.

Os esporos também estão vulneráveis ao parasitismo por outros organismos do solo, principalmente fungos (Paulitz & Meyer, 1986) e ameba (Boyetchko & Leveari, 1991). O hiperparasitismo tem o papel de regular a dinâmica da população de esporos de FMA.

INTERAÇÕES ENTRE FMA E OUTROS ORGANISMOS HABITANTES DA RAIZ

Interações de FMA e outros organismos colonizadores da raiz dizem mais respeito a um efeito da simbiose micorrízica do que propriamente do fungo. Como o capítulo deve ater-se aos assuntos relacionados à ecologia do FMA e não da simbiose, somente aspectos gerais de tais interações serão abordados.

Interações com Patógenos

Os mecanismos envolvidos nas interações entre FMA e patógenos são geralmente de antagonismo e incluem proteção física, interações químicas e efeitos indiretos (Fitter & Garbaye, 1994), com significativa redução da doença. Efeito positivo da inoculação de FMA em detrimento de doenças causadas principalmente por *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Fusarium* e *Pythium* é muito bem documentado em várias culturas (Zambolim, 1984). Nas interações entre FMAs e fitonematóides observa-se que o antagonismo entre ambos ocorre dentro da raiz, havendo inibição do desenvolvimento e reprodução do nematóide, devido principalmente a um efeito de competição por espaço físico. Entretanto, a presença do nematóide pode diminuir a esporulação do FMA. As interações nesse caso são altamente específicas e dependem do grau de susceptibilidade do hospedeiro ao fungo e do nível de P no solo (Smith *et al.*, 1986).

Interações entre FMA e vírus são pouco estudadas, mas parece que a presença do fungo estimula a ação do patógeno, aumentando sua virulência e taxa reprodutiva, provavelmente por causa do melhor estado nutricional da planta micorrizada (Jabaji-Hare & Stobbs, 1984).

Muitos autores encaram essa interação como uma forma de controle biológico, devido à eficiência dos mecanismos envolvidos que permitem maior tolerância da planta ao patógeno, oriunda principalmente do melhor desenvolvimento e nutrição mineral do hospedeiro. Contudo, como para a maioria dos sistemas de controle biológico, os resultados são inconsistentes ou altamente específicos, pois estão subordinados a vários fatores: natureza do hospedeiro, do FMA, dos patógenos envolvidos e das condições ambientais.

Interações com Rizobactérias

Contrastando com os patógenos, existe um forte efeito sinérgico entre rizobactérias, principalmente as fixadoras de nitrogênio, e os FMAs, com aumentos significativos na colonização e desenvolvimento da planta. No caso das bactérias fixadoras de N_2 , o efeito é consequência de uma melhor nutrição em P pela planta micorrizada, o que acarreta maior e melhor nodulação e funcionamento da nitrogenase. Essa interação é maior quando existem condições de escassez de N e P, ou seja, depende do grau de disponibilidade desses nutrientes no substrato. Nesse caso pode existir uma grande dependência entre ambos os microsimbiontes, havendo somente efeito da bactéria fixadora de N_2 nas plantas colonizadas por FMA (Tabela 4).

Desde que as interações de RPCPs e FMAs sejam positivas, existe um potencial de utilização e de manipulação de tais interações que pode garantir maior desenvolvimento da planta, empregando insumos biotecnológicos de menor custo.

AGREGAÇÃO DO SOLO

Um aspecto importante da ecologia do desenvolvimento do micélio externo diz respeito à formação de agregados estáveis no solo, principalmente de grãos de areia, como foi constatado em dunas, em decorrência da ação ligante da extensa malha de hifas e da sua persistência no solo (Tisdall & Oades, 1979), ou de um efeito indireto do micélio,

que atuaria como substrato para microrganismos produtores de polissacarídeos, agentes de ligação das partículas no solo (Lynch & Bragg, 1985), atuando na estabilização de agregados.

TABELA 4. Incremento causado pela micorriza -M- (ausência - e presença + de rizóbio) e pelo rizóbio -R- (ausência - e presença + de micorriza) em algumas variáveis, em soja (Silveira & Cardoso, dados não publicados).

EFEITO ISOLADO	INOCULAÇÃO	PARTE AÉREA	TEOR DE P	QUANTIDADE P	TEOR DE N	QUANTIDADE N
				%		
M	-R	-3	67	69	4	1
	+R	54	100	203	12	73
R	-M	17	-11	10	-7	9
	+M	87	7	97	-0,4	86

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, L.K.; GAZEY, C. An ecological view of the formation of VA mycohizas. **Plant and Soil**, The Hague, v.159, n.1, p.69-78, 1994.
- ABBOTT, L.K.; ROBSON, A.D. Factors influencing the occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhizas. **Agriculture, Ecosystems and Environment**. v.35, p.121-150, 1991.
- ABBOTT, L.K.; ROBSON, A.D.; HALL, L.R. Introduction of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi into agricultural soils. **Australian Journal of Agricultural Research**. v.34, p.741-749, 1983.
- ABBOTT, L.K.; ROBSON, A.D.; De BOER, G. The effect of phosphorus on the formation of hyphae in soil by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum*. **New Phytologist**. Oxford, v.97, p.437-446, 1984.
- ALLEN, E.B.; ALLEN, M.F.; HELM, D.J.; TRAPPE, J.M.; MOLINA, R.; RINCON, E. Patterns and regulation of mycorrhizal plant and fungal diversity. **Plant and Soil**, The Hague, v.170, p.47-62, 1995.
- AMES, R.N. Mycorrhiza development in onion in response to inoculation with chitin-decomposing actinomycetes. **New Phytologist**. Oxford, v.112, p.423-427, 1989.
- ANTUNES, V.; CARDOSO, E.J.B.N. Growth and nutrient status of citrus plants as influenced by mycorrhiza and phosphorus application. **Plant and Soil**. The Hague, v.131, p.11-19, 1991.
- BALOTA, E.L. Flutuação sazonal de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares no cafeeiro (*Coffea arabica* L.). Piracicaba: ESALQ, 1989. 145p. Tese Doutorado.
- BAYLIS, G.T.S. The magnolioid mycorrhiza and mycotrophy in root systems derived from it. In: SANDERS, F.E.; MOSSE, B.; TINKER, P.B., ed. **Endomycorrhizas**. London: Academic Press, 1975. p.373-389.
- BECARD, G.; PICHÉ, Y. Fungal growth stimulation by CO₂ and roots exudates in vesicular - arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Applied and Environmental Microbiology**. Baltimore, v.55, p.2350-2355, 1989.
- BOYETCHKO, S.M.; TEWARI, J.P. Parasitism of spores of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus dimorphicum*. **Phytoprotection**. v.72, p.27-32, 1991.
- CALVET, C.; BAREA, J.M.; PERA, J. *In vitro* interactions between the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and some saprophytic fungi isolated from organic substrates. **Soil Biology and Biochemistry**. Oxford, v.24, p.775-789, 1992.

- COOPER, K.M. Physiology of VA mycorrhizal associations. In: POWELL, C.L.; BAGYARAJ, D.J., ed. **VA mycorrhiza**. Boca Raton: CRC Press, 1984. p.155-186.
- ELIAS, K.S.; SAFIR, G.R. Hyphal elongation of *Glomus fasciculatum* in response to root exudates. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.53, n.8, p.1928-1933, 1987.
- FITTER, A.H.; GARBAYE, J. Interactions between mycorrhizal fungi and other soil organisms. **Plant and Soil**, The Hague, v.159, p.123-132, 1994.
- FURLAN, V.; FORTIN, J.A. Effect of light intensity on the formation of vesicular-arbuscular mycorrhizas on *Allium cepa* by *Gigaspora calospora*. **New Phytologist**, Oxford, v.79, p.335-340, 1978.
- GARBAYE, J.; BOWEN, G.D. Stimulation of ectomycorrhizal infection of *Pinus radiata* by some microorganisms associated with the mantle of ectomycorrhizas. **New Phytologist**, Oxford, v.112, p.383-388, 1989.
- GAZEY, C.; ABBOTT, L.K.; ROBSON, A.D. The rate of development of mycorrhizas affects the onset of sporulation and production of external hyphae by two species of *Acaulospora*. **Mycological Research**, v.96, p.643-650, 1992.
- GIANINAZZI-PEARSON, V.; BRANZANTI, B.; GIANINAZZI, S. *In vitro* enhancement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by host root plant exudates and plant flavonoids. **Symbiosis**, v.7, p.243-255, 1989.
- GIOVANNETTI, M.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Biodiversity in arbuscular mycorrhizal fungi. **Mycological Research**, v.98, n.7, p.705-715, 1994.
- HARRIS, K.K.; BOERNER, R.E. Effects of bellow ground grazing by Collembola on growth, mycorrhizal infection, and P uptake of *Geranium robertianum*. **Plant and Soil**, The Hague, v.129, p.203-210, 1990.
- HEPPER, C.M.; AZCÓN-AGUILAR, C.; ROSENDHAL, S.; SEN, R. Competition between three species of *Glomus* used as spatially separated introduced and indigenous mycorrhizal inocula for leek *Allium porrum* L. **New Phytologist**, Oxford, v.110, p.207-215, 1988.
- HETRICK, B.A.D. Ecology of VA mycoehizal fungi. In: POWELL, C.L.; BAGYARAJ, D.J. ed. **VA mycorrhiza**. Boca Raton: CRC Press, 1984. p.35-55.
- JABAJI-HARE, S.H.; STOBBS, L.W. Electron microscopic examination of tomato roots with *Glomus* sp. and tobacco mosaic virus. **Phytopathology**, St. Paul, v.74, n.3, p.277-279, 1984.
- KAISER, P.A.; LUSSENHOP, J. Collembolan effects on establishment of vesicular-arbuscular mycorrhizae in soybean (*Glycine max*). **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.23, p.307-308, 1991.
- LAMBAIS, M.R.; CARDOSO, E.J.B.N. Avaliação da germinação de esporos de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares e da colonização micorrízica de *Stylosanthes guianensis* em solo ácido e distrófico. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.12, n.3, p.249-255, 1988.
- LAMBAIS, M.R.; CARDOSO, E.J.B.N. Germinação de esporos e crescimento do tubo germinativo de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares em diferentes concentrações de Alumínio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.13, n.2, p.151-154, 1989.
- LAMBAIS, M.R.; MEHDY, M.C. Suppression of endochitinase, 1,3-endoglucanase, and chalcone isomerase expression in bean vesicular-arbuscular mycorrhizal roots under different soil phosphate conditions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.6, n.1, p.75-83, 1993.
- LYNCH, J.M.; BRAGG, E. Microorganisms and soil aggregate stability. **Advances in Soil Science**, v.2, p.133-171, 1985.
- LOPEZ-AGUILLON, R.; MOSSE, B. Experiments on the competitiveness of three endomycorrhizal fungi. **Plant and Soil**, The Hague, v.97, p.155-170, 1987.
- LYNCH, J.M.; BRAGG, E. Microorganisms and soil aggregate stability. **Advances in Soil Science**, New York, v.2, p.133-171, 1985.
- MALUF, A.M.; SILVEIRA, A.P.D.; MELO, I.S. Influência da calagem e da micorriza vesículo-arbuscular no desenvolvimento de cultivares de leucena tolerante e intolerante ao Alumínio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.12, n.1, p.17-23, 1988.
- MIRANDA, J.C.C.; HARRIS, P.J. Effects of soil phosphorus on spore germination and hyphal growth of arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, Oxford, v.128, p.103-108, 1994.
- MORTON, J.B.; BENTIVENGA, S.P. Levels of diversity in endomycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes), and their role in defining taxonomic and non-taxonomic groups. **Plant and Soil**, The Hague, v.159, n.1, p.47-60, 1994.

- MUCHOVEJ, J.J.; MUCHOVEJ, R.M.; GONÇALVES, E.J. Effect of kind and method of fungicidal treatment of bean seed on infections by the VA mycorrhizal fungus *Glomus macrocarpum* and by the pathogenic fungus *Fusarium solani*. 2. Temporal-spatial relationships. **Plant and Soil**. The Hague, v.132, p.47-51, 1991.
- PAULA, M.A. Germinação e crescimento micelial de esporos de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares na presença de calos e suspensão de células vegetais *in vitro*. Lavras: ESAL, 1988.128p. Dissertação Mestrado.
- PAULA, M.A.; SIQUEIRA, J.O. Efeitos da umidade do solo sobre a simbiose endomicorrízica em soja: I. Colonização radicular, esporulação, nodulação e acúmulo de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.11, n.3, p.283-287, 1987.
- PAULITZ, T.C.; LINDERMAN, R.G. Interactions between fluorescent pseudomonads and VA mycorrhizal fungi. **New Phytologist**. Oxford, v.113, p.37-45, 1989.
- PAULITZ, T.C.; MEYER, J.A. The effects of a mycoparasite on the mycorrhizal fungus *Glomus deserticola*. **Phytopathology**. St. Paul, v.76, p.351-354, 1986.
- PEARSON, J.N.; JAKOBSEN, I. Intrasymbiotic exchange of carbon and phosphorus between cucumber and three arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**. Oxford, v.124, p.481-488, 1993.
- PEARSON, J.N.; ABBOTT, L.K.; JASPER, D.A. Mediation of competition between two colonizing VA mycorrhizal fungi by the host plant. **New Phytologist**. Oxford, v.123, p.93-98, 1993.
- PORTER, W.M.; ROBSON, A.D.; ABBOTT, L.K. Field survey of the distribution of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in relation to soil pH. **Journal of Applied Ecology**, Oxford, v.24, p.659-662, 1987a.
- PORTER, W.M.; ROBSON, A.D.; ABBOTT, L.K. Factors controlling the distribution of VA mycorrhizal fungi in relation to soil pH. **Journal applied Ecology**, Oxford, v.81, p.663-672, 1987b.
- PRIMAVESI, O.; SILVEIRA, A.P.D.; MELLO, F.A.F. Observações preliminares sobre a presença de micorriza VA em solos sujeitos à compactação e cultivados com feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v.63, n.2, p.159-168, 1988.
- RABATIN, S.C.; STINNER, B.R. Indirect effects of interactions between VAM fungi and soil-inhabiting invertebrates on plant processes. **Agriculture, Ecosystems and Environment**. v.24, p.135-146, 1988.
- READ, D.J. Mycorrhizas in ecosystems. **Experientia**, v.474, p.376-390, 1991.
- SAINZ, M.J.; VILARINO, A.; ARINES, J. Competition between *Glomus tenue* and some coarse fungi for colonizing red clover roots in acid soils. **Agriculture, Ecosystems and Environment**. v.29, p.337-340, 1990.
- SANDERS, J.R.; FITTER, A.H. Evidence for differential responses between host-fungus combinations of vesicular-arbuscular mycorrhizas from a grassland. **Mycological Research**. v.96, p.415-419, 1992.
- SANDERS, I.R.; RAVOLANIRINA, F.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; GIANINAZZI, S.; LEMOINE, M.C. Detection of specific antigens in the vesicular arbuscular mycorrhizal fungi *Gigaspora margarita* and *Acaulospora laevis* using polyclonal antibodies to soluble spore fractions. **Mycological Research**, v.96, p.477-480, 1992.
- SCHELTEMA, M.A.; ABBOTT, L.K.; ROBSON, A.D. Seasonal variation in the infectivity of VA mycorrhizal fungi in annual pastures in a Mediterranean environment. **Australian Journal of Agricultural Research**. v.38, p.707-715, 1987.
- SIEVERDING, E. Influence of soil water regimes on VA mycorrhiza. I. Effect of plant growth, water utilization and development of mycorrhiza. **Journal of Agronomy & Crop Science**, Berlin, v.150, p.400-411, 1981.
- SILVA, L.R.C. Efeitos de compostos orgânicos sobre o crescimento micelial de *Gigaspora margarita in vitro*. Lavras: ESAL, 1990. 77p. Dissertação Mestrado.
- SILVA, L.H.B. da; MIRANDA, J.C.C. de; MIRANDA, L.N. Efeito da micorriza vesículoarbuscular no crescimento de variedades de trigo sensível e tolerante ao alumínio, em solo de cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.18, n.3, p.407-414, 1994.
- SILVA, L.R.C.; SILVEIRA, A.P.D.; LOMBARDI, M.L.C.O.; DECHEN, S.C.; LOMBARDI NETO, F. Atividade da população nativa de fungos micorrízicos arbusculares e *Bradyrhizobium* sp em solo submetido à erosão simulada. In: XX REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 20., Piracicaba, 1992. **Anais** Piracicaba, 1992. p.412-413.
- SILVEIRA, A.P.D. Micorrizas. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P., ed. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p.257-282.
- SILVEIRA, A.P.D.; FREITAS, S.S.; SILVA, L.R.C.; LOMBARDI, M.L.C.O.; CARDOSO, E.J.B.N. Interações de micorrizas arbusculares e rizobactérias promotoras do crescimento em plantas de feijão. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. Campinas, v.19, n.2, p.205-211, 1995.

- SIMON, L.; LALONDE, M.; BRUNS, T.D. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.58, p.291-295, 1992.
- SIQUEIRA, J.O.; HUBBELL, D.H. Effect of organic substrate on germination and germ tube growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus spores *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.21, n.5, p.523-527, 1986.
- SMITH, G.S.; RONCADORI, R.W.; HUSSEY, R.S. Interaction of endomycorrhizal fungi, superphosphate, and *Meloidogyne incognita* on microplot and field studies. **Journal of Nematology**, Lawrence, v.18, p.208-216, 1986.
- SYLVIA, D.M. Distribution, structure, and function of external hyphae of vesicular-arbuscular fungi. In: BOX JUNIOR, J.E.; HAMMOND, L.C. ed **Rhizosphere dynamics**. Gainesville: American Association for the Advancement of Science, 1992. p.144-167.
- TISDALL, J.M.; OADES, J.M. Stabilization of soil aggregates by the root segments of ryegrass. **Australian Journal of Soil Research**, v.17, p.429-441, 1979.
- TRUFEM, S.F.B. Methods for the assessment of diversity in mycorrhizae. In: BICUDO, C.E.M.; MENEZES, N.A. ed. **Biodiversity in Brazil: a first approach**. São Paulo: CNPq, 1996. p.49-63.
- TSAI, S.M.; PHILLIPS, D.A. Flavonoids released naturally from alfalfa promote development of symbiotic *Glomus* spore *in vitro*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.57, n.5, p.1485-1488, 1991.
- TYLKA, G.L.; HUSSEY, R.S.; RONCADORI, R.W. Axenic germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi-effects of selected *Streptomyces* species. **Phytopathology**, St. Paul, v.81, p.754-759, 1991.
- WRIGHT, S.F.; MORTON, J.B. Detection of vesicular arbuscular mycorrhizal fungus colonization of roots by using a dot-immunoblot assay. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.55, p.761-763, 1989.
- ZAMBOLIM, L. Como plantas micorrizadas comportam-se em relação aos fitopatógenos. **O Biológico**, São Paulo, v.50, p.53-69, 1984.

3

RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS: DESCRIÇÃO E POTENCIAL DE USO NA AGRICULTURA

Itamar Soares de Melo

EMBRAPA Meio Ambiente

Caixa Postal 69, CEP 13820-000, Jaguariúna, SP

INTRODUÇÃO

Os microrganismos do solo podem ser divididos em relação ao efeito que causam às plantas, em benéficos, prejudiciais ou neutros. Os prejudiciais são divididos, ainda, em patógenos menores e maiores, de acordo com os sintomas que causam às plantas (Schippers *et al.*, 1987). Os microrganismos benéficos, simbiotes e não simbiotes podem influenciar o crescimento de plantas através do aumento na disponibilidade de nutrientes minerais (Kavimandan & Gaur, 1971; Lifshitz *et al.*, 1987), da produção de hormônios de crescimento como giberelinas e auxinas (Katznelson & Colem, 1965; Brown, 1972) e da supressão de microrganismos deletérios da rizosfera de plantas (Kloepper & Schroth, 1981).

Dentre os microrganismos benéficos, as rizobactérias, assim denominadas por colonizarem agressivamente o sistema radicular, merecem destaque. Essas bactérias podem ser simbiotes ou saprófitas de vida livre, e vários trabalhos relatam o aumento no crescimento de plantas. Dentre as espécies mais bem estudadas podem-se citar *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *Azospirillum brasilense*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Arthrobacter*, *Enterobacter*, *Azotobacter* etc.

Recentemente, esses microrganismos têm sido apontados como essenciais ao ecossistema de plantas em relação ao suprimento de elementos de crescimento como nitrogênio, fósforo e, possivelmente, ferro. Deste modo, a liberação de exsudados pelas raízes cria uma zona rizosférica rica em energia, facilitando aos microrganismos presentes a mineralização dos nutrientes dos restos de matéria orgânica, tornando-os, assim, disponíveis para imediata absorção pelas raízes. Os resíduos finais desta degradação também melhoram a formação de agregados e a estrutura do solo (Schippers *et al.*, 1987).

Dentre as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs), as bactérias do gênero *Pseudomonas* spp. são as mais bem estudadas. Isto se deve, principalmente, à sua grande capacidade de suprimir patógenos de solo, à sua ocorrência de forma natural e em elevadas populações, ao fato de serem nutricionalmente versáteis e possuírem habilidade de crescer numa ampla faixa de condições ambientais, além de produzirem uma grande variedade de antibióticos, sideróforos e hormônios de crescimento vegetal.

As rizobactérias do grupo fluorescente (*P. fluorescens-putida*) possuem um versátil metabolismo, podendo utilizar vários substratos liberados pelas raízes e também moléculas xenobióticas que atingem a rizosfera.

O efeito no crescimento de plantas por RPCP pode ser induzido de forma direta, pela produção de hormônios de crescimento, ou indireta, pela modificação da microbiota da rizosfera, sendo este último considerado um dos principais mecanismos de ação, devido à supressão de microrganismos deletérios da rizosfera (Schippers *et al.*, 1987).

Recentemente, os trabalhos com a utilização de RPCP têm sido intensificados, principalmente por causa do aumento do interesse em alternativas para o controle de fitopatógenos, bem como por causa da substituição de produtos químicos que, além de aumentarem o custo de produção, geram problemas de contaminação ao meio ambiente e podem afetar os seres vivos. Estas bactérias são, também, passíveis de serem empregadas como inoculantes comerciais, facilitando desta forma a sua utilização pelos agricultores.

Como exemplos dos efeitos de RPCP na produção podemos citar os aumentos de até 48% na produção de cenoura com a inoculação de *Bacillus subtilis* (Merriman *et al.*, 1974), aumento de até 37% na produção e nodulação de amendoim com *B. subtilis* (Turner & Backman,

1991), de 33% na produção de ervilha com inoculação de *Pseudomonas fluorescens* (Parke *et al.*, 1991); de até 150% em plantas de rabanete com inoculação de *Pseudomonas* sp. (Kloepper & Schroth, 1981). No entanto, o frágil estabelecimento e sobrevivência de linhagens introduzidas constituem sérios entraves à sua aplicação no solo. Nesse sentido, é necessário o desenvolvimento de estudos relativos à ecologia destes microrganismos na rizosfera, independentemente do propósito da inoculação.

No caso de controle biológico, são necessárias informações como mecanismos de colonização de raízes, especificidade de hospedeiros, eficiência ecológica, influência de fatores ambientais e genética dos sistemas sideróforos e antibióticos.

Este capítulo versará sobre os mecanismos de ação pelos quais as rizobactérias atuam e seus efeitos sobre o desenvolvimento de plantas, tais como emergência e germinação, controle biológico de doenças, aumento na fixação de nitrogênio e possibilidade de uso na biorremediação de solos contaminados com compostos xenobióticos. Efeitos de RPCP sobre o crescimento de plantas e produção de alimentos não serão abordados neste capítulo, dada a existência de vastos artigos versando sobre o assunto (Luz, 1996; De Weger *et al.*, 1995; Weller, 1988; Schroth & Hancock, 1982).

MODOS DE AÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS

Antibiose

Dentre os mecanismos de ação de rizobactérias, a produção de compostos antibióticos tem sido considerada, por muitos autores, como um dos mais importantes mecanismos, pois atua na supressão de patógenos da rizosfera.

Os antibióticos são compostos orgânicos de baixo peso molecular que, em baixas concentrações, são deletérios ao crescimento ou a outras atividades metabólicas de outros organismos (Fravel, 1988). O papel destes na fisiologia e ecologia de microrganismos ainda é desconhecido, embora se saiba que "pirrolnitrina" produzido por *Pseudomonas fluorescens* inibe o crescimento de *Rhizoctonia solani*, *Thielaviopsis basicola*, *Alternaria* sp. e *Verticillium dahliae* (Howell & Stipanovic, 1979). O composto "pioluterina" inibe *Pythium* sp. (Howell & Stipanovic, 1980).

Os antibióticos em geral são inativados no solo e, portanto, sua ação só pode ser efetiva no tratamento de sementes.

Apesar do grande volume de trabalhos relatados na literatura com bactérias do grupo *Pseudomonas putida-fluorescens*, outros gêneros têm merecido atenção (Tabela 4). É possível que o grande número de relatos com o grupo *putida-fluorescens* exista por causa dos métodos de isolamento e seleção utilizados.

Linhagens efetivas de *P. fluorescens* têm sido bem estudadas como agentes potenciais de controle do mal-do-pé do trigo, causado por *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. Thomashow & Weller (1988) caracterizaram o antibiótico ácido 1-carboxílico fenazina, produzido por *P. fluorescens*, capaz de controlar esse patógeno tanto *in vitro* como *in vivo*.

As modernas técnicas de genética têm contribuído para o entendimento dos processos envolvidos de controle biológico. Mutantes negativos para produção de antibióticos têm sido empregados na comparação com as linhagens selvagens, facilitando a interpretação dos dados obtidos (Tomashow & Weller, 1988). Nessa linha de pesquisa, Colyer & Mount (1984) estudaram o comportamento de um mutante antibiótico negativo M74 de *P. putida* com relação ao controle de *Erwinia* spp., comparando-o com a linhagem parental. Observaram que a colonização do rizoplane de plantas de batata foi semelhante para ambas as linhagens, embora a redução da severidade da podridão mole da batata tenha sido intermediária nas plantas tratadas com o mutante. Sugeriram que a antibiose pudesse ter sido responsável pela supressão da doença.

Howie & Suslow (1986) verificaram que um mutante de *P. fluorescens*, negativo para produção de antibiótico, não demonstrou nenhuma atividade *in vitro* contra *Pythium* sp., embora tenha apresentado uma reduzida capacidade de proteção da planta contra o patógeno. Os autores concluíram, nesse caso, que mais de um mecanismo estava envolvido na supressão do patógeno.

Além da produção de antibiótico, que é considerado um mecanismo importante na competição e estabelecimento das RPCPs, estas bactérias devem apresentar outras características que garantam a sua sobrevivência na rizosfera. A colonização de raízes é um pré-requisito para a manutenção e sobrevivência de bactérias, bem como para o eficiente controle de patógenos de solo.

Um importante passo na obtenção de rizobactérias que apresentem atividade antibiótica é a realização de um eficiente esquema de seleção. Naturalmente, essas bactérias devem apresentar uma capacidade seletiva eficiente quanto à sobrevivência na rizosfera. Desse modo, é de se esperar que nos chamados solos supressivos essas bactérias tenham uma vantagem competitiva e, portanto, atuem na inibição dos patógenos causadores de doenças radiculares.

Para propósitos práticos de uso de RPCP na agricultura, deve-se frisar que bactérias do gênero *Bacillus* apresentam certas vantagens em relação às do gênero *Pseudomonas*, principalmente em relação à produção de inoculantes. Dentre estas vantagens, podemos citar a resistência à dessecação, a formação de endosporo de resistência, a maior capacidade de sobrevivência quando formuladas com polímeros e inertes diversos, entre outras.

Competição pela Produção de Sideróforos

Os microrganismos competem por nutrientes e elementos essenciais no solo e na rizosfera. Essa competição entre uma rizobactéria e um patógeno pode resultar em substituição ou exclusão deste último (Weller, 1988).

Kloepper *et al.* (1980b) foram os primeiros a demonstrar a importância da competição por ferro, devido à produção de sideróforos por microrganismos. Sideróforos são substâncias de baixo peso molecular produzidas por alguns microrganismos em condições limitantes de ferro, com grande afinidade por íons de Fe^{3+} (Leong, 1986). De fato, quase todas as bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas produzem sideróforos, diferindo, contudo, na eficiência de produção. Certas espécies do gênero *Pseudomonas* produzem sideróforos que quelam o ferro férrico na rizosfera, privando e inibindo o crescimento de outros microrganismos, incluindo fitopatógenos, que têm menor capacidade de competição por ferro. Tal competição em um ambiente com baixa concentração de ferro explica os efeitos observados sobre a promoção de crescimento de plantas e sobre a produção em algumas culturas (Kloepper *et al.*, 1980).

O mecanismo para produção de sideróforos é operável somente sob condições de baixa disponibilidade de ferro. Sua concentração na solução do solo está relacionada com os níveis de pH. À medida em que o pH do solo abaixa, a disponibilidade de ferro aumenta e os sideróforos

se tornam menos efetivos. O nível crítico de ferro, necessário para a supressão do crescimento de um patógeno fúngico por uma linhagem de *P. putida*, é menor que 10^{-6} mol m^{-3} (Simeoni *et al.*, 1987). A supressão ótima aconteceu com níveis entre 10^{-19} e 10^{-24} mol m^{-3} de Fe^{3+} .

Estudos para comprovar se a supressão de doenças era causada pela produção de sideróforos e/ou antibióticos já foram bem documentados. Kloepper *et al.* (1980b) demonstraram, em experimentos controlados, que a adição de ferro, na forma de etilenodiamina tetracetato de ferro III (Fe EDTA), aboliu a ação antagonística *in vitro*. Observaram, também, que o sideróforo pseudobactina purificado de *P. fluorescens* B-10 exibiu a atividade bacteriostática contra *Erwinia carotovora*, fato que não ocorreu com o pseudobactina férrica, um sideróforo complexado com ferro. Em outro experimento, os mesmos pesquisadores observaram que o sideróforo pseudobactina induziu um aumento significativo no crescimento de plantas de batata, enquanto que o sideróforo complexado com Fe EDTA não foi capaz. Evidencia-se aqui um mecanismo de ação através da produção de sideróforos, demonstrando a sua capacidade de sequestrar o Fe^{3+} da rizosfera, tornando-o indisponível a microrganismos deletérios prejudiciais às plantas (Kloepper *et al.*, 1980; Xu & Gross, 1986).

Mutações induzidas por irradiação com luz ultravioleta ou com agentes químicos (Kloepper & Schroth, 1981) ou transposons (Marugg *et al.*, 1985) produziram linhagens deficientes para a produção de sideróforos que foram inefetivas como antagonistas.

Em geral, os patógenos de plantas são sensíveis à ação de sideróforos produzidos pelos antagonistas, em virtude de não os produzirem ou produzirem-nos com menor afinidade pelo ferro. Ademais, podem haver casos onde os patógenos sejam incapazes de usar os sideróforos dos antagonistas ou de outros microrganismos, e ainda o fato de produzirem sideróforos que possam ser utilizados pelos antagonistas (Buyer & Leong, 1986; Leong, 1986)

Produção de Reguladores de Crescimento de Plantas

Reguladores de crescimento de plantas (RCPs) são substâncias orgânicas que influenciam os processos fisiológicos de plantas em baixas concentrações. Muitos RCPs ou seus derivados podem ser produzidos por microrganismos do solo e da rizosfera. A produção de RCPs como metabólitos microbianos no solo está diretamente ligada à disponibili-

dade de substratos, incluindo exsudados de plantas e resíduos de animais. Os microrganismos produtores exercem um importante papel no controle de seu próprio ambiente, afetando o metabolismo da planta. Os microrganismos, por sua vez, afetam a composição química de exsudados liberados e, assim, seu suprimento nutricional.

A utilização de RPCP visando o aumento no crescimento de plantas e conseqüentemente da produção, teve início na Rússia na década de 50 (Kloepper *et al.*, 1989). Contudo, somente na década de 60 respostas positivas no aumento de crescimento de plantas foram obtidas com a inoculação de *Azotobacter* sp. em trigo, tomate e milho (Brown *et al.*, 1962; Rovira, 1963; Brown *et al.*, 1964). O motivo do aumento no crescimento não ficou claro na época. Mais tarde, Brown & Burlington (1968) observaram a existência dos ácidos giberélico e indole-acético em culturas de *Azotobacter* sp. e sugeriram o possível efeito dessas substâncias no crescimento de plantas.

Inúmeras rizobactérias estão envolvidas ativamente na síntese de giberelinas e substâncias análogas (Tabela 1), auxinas e substâncias análogas (Tabela 2) e citocininas (Tabela 3).

TABELA 1. Rizobactérias produtoras de Giberelinas.

ORGANISMO	GIBERELINAS	REFERÊNCIAS
<i>Arthrobacter</i> sp.	Giberelina	Strzelczyk & Pokojaska-Burdziej, 1984
<i>A. globiformis</i>	Giberelina	Katznelson <i>et al.</i> , 1962
<i>Azospirillum brasilense</i>	Giberelina	Tien <i>et al.</i> , 1979
<i>A. lipoferum</i>	GA ₁ , GA ₃	Bottini <i>et al.</i> , 1989
<i>Azotobacter</i> sp.	Giberelina, GA ₃	El-Bahrawy, 1983
<i>A. beijerinckii</i>	Giberelina	Azcon & Barea, 1975
<i>A. paspali</i>	Giberelina, GA ₃	Barea & Brown, 1974
<i>Bacillus</i> sp.	Giberelina	Katznelson & Cole, 1965
<i>B. megaterium</i>	Giberelina	Hussain & Vancura, 1970
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Giberelina	Hussain & Vancura, 1970
<i>Rhizobium phaseoli</i>	GA ₁ , GA ₃ , GA ₄ , GA ₉	Atzorn <i>et al.</i> , 1988

TABELA 2. Rizobactérias produtoras de auxinas.

ORGANISMO	AUXINAS ¹	REFERÊNCIAS
<i>Arthobacter</i> spp.	AIA	Strzelcgg & Pokojaska-Burdziieg, 1984
<i>A. lipoferum</i>	AIA, AIM	Hartmann <i>et al.</i> , 1983
<i>Azotobacter</i> sp.	AIA	Mahmoud <i>et al.</i> , 1984; El Bahrawy, 1983
<i>A. beijernickii</i>	AIA	Azcon & Barea, 1975
<i>A. chroococum</i>	heteroauxina, AIA	Brown & Burlingham, 1968; Brown & Walker, 1970
<i>A. paspali</i>	AIA	Barea & Brown, 1974
<i>Bacillus</i> spp.	heteroauxina, auxina	Kampert <i>et al.</i> , 1975
<i>Pseudomonas</i> sp.	AIA	Brown, 1972
<i>P. fluorescens</i>	AIA, heteroauxina	Hussain & Vancura, 1970
<i>P. putida</i>	AIA, heteroauxina	Hussain & Vancura, 1970
<i>Rhizobium</i> sp.	AIA	Burlard <i>et al.</i> , 1963
<i>R. leguminosarum</i>	AIL	Badenoch-Jones <i>et al.</i> , 1982
<i>R. leguminosarum</i>	AIP	Clark, 1974
<i>R. meliloti</i>	AIA	Clark, 1974
<i>R. phaseoli</i>	AIS	Atzorn <i>et al.</i> , 1988

¹AIA – ácido indole acético; AIC – ácido indole carboxílico; AIM – ácido indole acetamida; AIP – ácido indole piruvico; AIL – ácido indole láctico.

Alguns trabalhos, então, demonstraram a síntese desses hormônios em fermentadores.

Brown (1972) estudou bactérias do rizoplano e rizosfera quanto à habilidade de produzirem substâncias reguladoras de crescimento em trigo. Observou, através de cromatogramas, que muitas bactérias produziram reguladores de crescimento do tipo giberelinas e auxinas quando crescidas em meio de cultura líquido. Loper & Schroth (1986) observa-

TABELA 3. Rizobactérias produtoras de citocininas.

ORGANISMO	CITOCININAS ¹	REFERÊNCIAS
<i>Arthrobacter</i> sp.	citocinina	Kampert & Stozelczyk, 1984
<i>Azospirillum brasilense</i>	citocinina, i ⁶ Ade, io ⁶ Ade, i Ado	Tien <i>et al.</i> , 1979 Horemans <i>et al.</i> , 1986
<i>A. lipoferum</i>	citocinina	Tien <i>et al.</i> , 1979
<i>Azotobacter beijerinckii</i>	citocinina	Azcon & Barea, 1975
<i>A. paspali</i>	citocinina	Barea & Brown, 1974
<i>A. vinelandii</i>	citocinina	Azcon & Barea, 1975
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	citocinina	Nieto & Frankenberger, 1989a
<i>P. putida</i>	citocinina	Nieto & Frankenberger, 1989
<i>Rhizobium japonicum</i>	io ⁶ Ade, io ⁶ Ado, i ⁶ Ade, i ⁶ Ado	Phillips & Toorey, 1972
<i>R. leguminosarum</i>	i ⁶ Ade, i ⁶ Ado	Giannattasio & Coppola, 1969 Wang <i>et al.</i> , 1982
<i>R. phaseoli</i>	citocinina	Puppo & Rigand, 1978

¹i⁶Ade, N⁶(Δ^2 -isopentenil)adenina; i⁶Ado, N⁶(Δ -isopentenil)adenosina; io⁶Ade, cis-zeatina; io⁶Ado, cis-zeatina ribosídeo.

ram, em filtrados de culturas de rizobactérias, um acúmulo de ácido índole-acético. Estas bactérias, quando inoculadas em sementes de beterraba açucareira, proporcionaram um aumento na produção de brotos da planta.

Lifshitz *et al.* (1987) observaram que isolados de RPCPs foram capazes de promover o crescimento de plantas de colza em solo esterilizado e Broadbent *et al.* (1977) observaram aumentos significativos no peso de plantas de várias espécies, quando as sementes foram inoculadas com *Bacillus* spp. e cultivadas em solos tratados com vapor (100°C-60°C), por 30 minutos.

De modo geral, é sugerido, mas não aceito por muitos pesquisadores, que hormônios de crescimento estejam envolvidos diretamente na ação das rizobactérias, já que em alguns trabalhos foi observada uma redução de efeitos no crescimento de plantas, quando estas foram desenvolvidas em solo autoclavado ou quando foram cultivadas sob condições gnotobióticas (Suslow & Schroth, 1982).

A maioria dos trabalhos da literatura sobre aumento no crescimento de plantas atribui este fenômeno a um efeito indireto associado ao controle biológico de patógenos menores, os quais interferem negativamente no crescimento de plantas (Kloepper *et al.*, 1980b; Kloepper & Schroth, 1981c). A falta de evidências para quaisquer efeitos estimulatórios no crescimento de plantas pela aplicação de hormônios de crescimento, exogenamente às raízes, faz acreditar que RPCPs estimulem o crescimento de plantas por meio de outros mecanismos que serão mencionados a seguir. Tem sido bem documentada a inoculação com RPCPs que produzem RCPs, particularmente quando estes metabólitos são liberados como resultado de interação inóculo-precursor. Entre as rizobactérias que têm apresentado esses efeitos estão as fixadoras de N_2 que penetram o córtex radicular. É possível, portanto, que o uso destes inoculantes, juntamente com precursores de RCPs, possa melhorar o crescimento de plantas e a produção.

Aumento na Absorção de Fosfato

Íons de nutrientes se movem no solo em direção às raízes por fluxo de massa com a água presente no solo e por difusão. Esses nutrientes nem sempre estão prontamente disponíveis às plantas: o fósforo, por exemplo, encontra-se no solo combinado em compostos de ferro, alumínio, cálcio e na matéria orgânica, sendo de baixa solubilidade.

Adubações com fosfatos naturais, com o objetivo de elevar o teor de fósforo na solução do solo, apresentam sérias restrições devido à baixa solubilidade.

Uma alternativa para maior eficiência na utilização de fosfatos naturais é a solubilização biológica, onde as bactérias, dentre elas algumas rizobactérias, exercem papel importante.

O efeito da solubilização é geralmente devido à produção de ácidos orgânicos no meio em que o microrganismo se desenvolve, cuja ação tem sido atribuída às suas propriedades quelantes, que possibilitam a formação de complexos estáveis com os íons Ca^{++} , Mg^{++} , Fe^{+++} e Al^{+++} .

Vários estudos têm sido realizados com diferentes fontes de fosfatos a fim de quantificar o fósforo disponível às plantas por intermédio de microrganismos solubilizadores. Tais estudos têm sido feitos em solos naturais e em solos esterilizados com e sem microrganismos. Em um dos estudos, hidroxiapatita foi usada para avaliar o efeito da inoculação de sementes com *Pseudomonas* sp. (Kavimandan & Gaur, 1971). Verificou-se que a quantidade de hidroxiapatita dissolvida pela bactéria não diferiu significativamente do controle não inoculado. Por outro trabalho, Lifshitz *et al.* (1987) demonstraram que uma linhagem de *P. putida* aumentou a absorção de fosfato radiomarcado por plântulas de canola, bem como os níveis de ^{32}P em raízes e folhas.

Bacillus megaterium e *P. fluorescens* têm sido empregadas como inoculantes para aumentar a disponibilidade de P às plantas através da solubilização de fosfatos orgânicos via ação das fosfatases ou através da solubilização de fosfatos inorgânicos via ácidos orgânicos (Katznelson & Bose, 1959; Duff *et al.*, 1963; Martin, 1973). Em estudos conduzidos em câmaras de crescimento, inoculantes à base de *B. circulans* e *B. megaterium* var. *phosphatium* aumentaram o peso de plantas e a absorção de P em *milheto* e ervilha, respectivamente (Saber *et al.*, 1977; Raj *et al.*, 1981). Do mesmo modo, Gaing & Gaur (1991) relataram que uma linhagem de *B. subtilis* aumentou a biomassa, produção de grãos e absorção de P e N de feijão desenvolvido em um solo de campo deficiente em P, suplementado com fosfato de rocha. Em condições naturais de campo, Datta *et al.* (1982) também constataram que uma linhagem de *B. firmus*, solubilizadora de fosfato e produtora de ácido índole-acético e acético, aumentou a produção de grãos e absorção de P de arroz em um solo deficiente de P e suplementado com fosfato de rocha.

Diferentes espécies de *Bacillus*, como *B. thuringiensis*, *B. sphaericus*, *B. megaterium*, *B. polymixa* e *B. brevis* e uma linhagem de *Xanthomas maltophilia*, todas isoladas da rizosfera e com potencial de solubilizar fosfato de rocha, aumentaram a produção de vagens de *Brassica napus* L., mas não aumentaram, entretanto, a absorção de P pelas plantas (Freitas *et al.*, 1997). Embora o crescimento de plantas e produção de grãos varie em resposta à inoculação com bactérias solubilizadoras de P em estudos conduzidos em laboratórios e em campo, é aparente que o aumento da produção possa ser explicado por um ou vários mecanismos. Nesse sentido, Laheurte & Berthelin (1988) inocularam sementes de milho com uma linhagem de *Enterobacter agglomerans* solubilizadora

de fosfato, e avaliaram exsudados de raízes para verificar sua capacidade de solubilizar P. Os autores não observaram nenhuma correlação entre exsudados e solubilizados de P provenientes de fosfato de rocha, e a bactéria não causou nenhum efeito na absorção de P por plantas de milho. Sugeriram que *E. agglomerans* metaboliza os exsudados a substâncias de crescimento de plantas responsáveis pelo incremento na biomassa.

As RPCPs, especificamente linhagens de *Azospirillum*, também podem melhorar a eficiência na absorção de água pelas plantas em condições naturais de campo. Essas linhagens podem apresentar um coeficiente de extração da umidade do solo da ordem de 15% quando comparadas com plantas não inoculadas. Sobre esse assunto aconselha-se a leitura de Kapulnik *et al.* (1985).

Alguns autores observaram que *A. brasilense*, quando inoculada em trigo, sorgo e milho, tem resultado num aumento significativo na absorção de nitrato, potássio e fósforo (Lin *et al.*, 1983; Kapulnik *et al.*, 1983). Segundo os mesmos autores, estes incrementos na absorção devem ter sido consequência de um aumento geral causado na superfície radicular e não de uma aceleração específica do processo de absorção.

Embora os exatos mecanismos pelos quais as rizobactérias solubilizadoras de fosfatos estimulem o crescimento de plantas não estejam bem claros, pode-se, no entanto, verificar o grande potencial de uso dessas bactérias como biofertilizantes de culturas agrícolas desenvolvidas em solos pobres em fósforo.

Promoção da Simbiose entre RPCP e Bactérias Fixadoras de Nitrogênio

Certas linhagens de RPCP estimulam a nodulação de plantas leguminosas por *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. Uma linhagem de *P. putida*, selecionada como agente de biocontrole, estimulou a nodulação por *Rhizobium* em feijoeiro (Grimes & Mount, 1984). Uma linhagem de *P. syringae* pv. *tabaci*, produtora de uma toxina identificada como *talotoxinina- β -lactam*, quando inoculada em alfalfa aumentou o crescimento das plantas, estimulou a atividade da nitrogenase, o número de nódulos, o aumento no peso total de nódulos e a produção de nitrogênio sob condições controladas (Knight & Langston-Unkefer, 1988).

Linhagens de *Azotobacter vinelandii* promoveram um aumento no número de nódulos em soja, vigna e trigo. Em experimentos para se

comprovar os mecanismos responsáveis por tais efeitos, Burns *et al.* (1981) obtiveram mutantes negativos para fixação de N_2 (fix^-). Demonstraram que a fixação de N_2 por *Azotobacter* não foi responsável pelo aumento na nodulação. Os autores comprovaram que extratos livres de células de *Azotobacter* da linhagem selvagem tiveram efeito sobre a nodulação. Sugere-se que substâncias reguladoras de crescimento de plantas sejam responsáveis pelo seu estímulo.

Uma bactéria que coloniza a rizosfera de soja e controla *Phytophthora* em plântulas, *Bacillus cereus* UW85, quando aplicada às sementes tem aumentado a nodulação de soja em condições de campo e em experimentos de laboratório (Halverson e Handelsman, 1991). A capacidade desta linhagem em aumentar a nodulação em um solo esterilizado sugere que UW85 tenha um efeito direto sobre a planta ou sobre *Bradyrhizobium*. A atividade de redução do acetileno foi aumentada de 25% a 73% quando sementes de soja foram tratadas com *B. cereus*, em comparação com o controle não tratado. Os autores concluíram que *B. cereus* provavelmente afeta o processo de nodulação logo após o plantio, por estimular infecções por *Bradyrhizobium*.

Estudos de co-inoculação com RPCR e *B. japonicum* têm demonstrado que aumentos na produção de grãos, vigor da planta, nodulação e fixação de nitrogênio têm sido resultado da presença de RPCR (Yahalon *et al.*, 1987; Lie & Alexander, 1988). Polonenko *et al.* (1987), trabalhando com soja, obtiveram um incremento na nodulação por *B. japonicum* e na promoção do crescimento de plantas. Similarmente, Dashti *et al.* (1997), numa tentativa de vencer os efeitos das baixas produções de soja cultivada sob baixa temperatura, co-inocularam sementes de soja com *B. japonicum* e *Serratia liquefaciens* ou *S. proteamaeulans*. Os autores observaram aumentos significativos na produção de grãos e produção de proteína em uma área com temperaturas baixas. Verificaram também que as interações existentes entre RPCP e cultivares de soja sugerem que as RPCPs aplicadas às cultivares mais produtivas foram mais efetivas.

Aumentos na produção de grãos, matéria seca de nódulos e atividade da nitrogenase também foram obtidos em grão-de-bico inoculado com uma mistura de *Azospirillum brasilense* e *Rhizobium* (Rai, 1983).

Verifica-se que, tanto em inoculação individual quanto conjunta com bactérias fixadoras de N_2 , as RPCPs têm aumentado o crescimento de plantas e a nodulação.

CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS

Um grande desafio na exploração de rizobactérias para o controle biológico recai na capacidade de transferir os sucessos alcançados em escala de laboratório para as condições naturais de campo. Embora muitos gêneros de rizobactérias sejam mencionados como agentes de biocontrole, as *Pseudomonas* do grupo *putida-fluorescens* têm sido usadas como inoculantes de sementes com bastante sucesso. Neste particular aconselha-se a leitura da revisão de Weller (1988).

A inoculação de antagonistas em sementes ou outras partes da planta envolve o estabelecimento destes no local da possível infecção, inibindo o microrganismo patogênico, proporcionando, desta forma, a proteção biológica do hospedeiro (Cook & Baker, 1983). Esta aplicação direta oferece uma vantagem competitiva sobre os patógenos, que deverão competir pelos mesmos sítios ecológicos antes de ocorrer a infecção (Schroth & Hancock, 1982).

Rizobactérias benéficas, fortes competidoras para um ou mais nutrientes na superfície da raiz, bem como boas colonizadoras e inibidoras de patógenos pela produção de antibióticos ou outros metabólitos, podem proporcionar uma melhor e mais consistente proteção de raízes e, conseqüentemente, um maior crescimento de plantas (Cook & Baker, 1983).

A Tabela 4 mostra alguns exemplos do controle biológico de fitopatógenos utilizando-se rizobactérias.

Os mecanismos pelos quais as RPCPs podem sobreviver na rizosfera e suprimir o ataque de patógenos são vários, podendo ocorrer mais de um ao mesmo tempo. Os antibióticos, quando produzidos na rizosfera, exercem função primordial na supressão da microflora deletéria; os sideróforos do tipo pioverdina, produzidos por rizobactérias em condições limitantes de ferro e proteínas receptoras de membrana, funcionam como mecanismos de biocontrole nestas condições ambientais, e a competição por nutrientes exsudados, pelas sementes e raízes de plantas. O estabelecimento de grandes populações bacterianas pode esgotar a disponibilidade de nutrientes na rizosfera, reduzindo a quantidade de carbono, nitrogênio e micronutrientes disponíveis utilizados pelos fungos patogênicos no seu crescimento.

TABELA 4. Relação de fitopatógenos onde rizobactérias têm sido utilizadas como agentes de controle.

CULTURA	RIZOBACTÉRIA	PATÓGENO	REFERÊNCIAS
Milho	<i>Pseudomonas cepacea</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>	Hebbat <i>et al.</i> , 1992
Milho	<i>Bacillus</i> sp.	<i>F. roseum</i> f.sp. <i>cerealis</i>	Chang & Kommedahl, 1968
Trigo	<i>P. fluorescens</i>	<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>	Cook & Weller, 1987
Pepino	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>F. solani</i>	Melo & Valarini, 1995
Batata	<i>P. putida</i>	<i>Erwinia carotovora</i>	Mantovanelo & Melo, 1994
Maçã	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Phytophthora cactorum</i>	Lévesque <i>et al.</i> , 1993
Tulipa	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pythium ultimum</i>	Westersteijn, 1990
Algodão	<i>Enterobacter cloaceae</i> , <i>Erwinia herbicola</i>	<i>Pythium</i> sp.	Nelson, 1988
Algodão	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. ultimum</i>	Howell & Stipanovic, 1980
Beterraba e algodão	<i>P. fluorescens</i>	<i>Pythium</i> sp.	Walter & Gindrat, 1988
Trigo	<i>P. fluorescens</i>	<i>Pythium</i> sp.	Weller & Cook, 1986
Cenoura	<i>B. subtilis</i> , <i>Agrobacterium radiobacter</i>	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>A. tumefaciens</i>	Merriman <i>et al.</i> , 1974
Tomate	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas solanacearum</i>	Peixoto <i>et al.</i> , 1995

Indução de Resistência Sistêmica

Estudos sobre os mecanismos de controle biológico por RPCPs têm verificado que estas protegem as plantas do ataque de patógenos atra-

vés de vários mecanismos, dentre os quais está a **indução de resistência sistêmica** (IRS). Esta é considerada um efeito indireto das RPCPs sobre os fitopatógenos. Um sistema de defesa localizado provocado pelo patógeno, chamado "hipersensibilidade", envolve a acumulação de fitoalexinas e requer síntese acelerada de enzimas associadas com a biossíntese fenólica. Estas enzimas incluem fenilalanina, amônia-liase, calcone sintase, peroxidase e proteínas relacionadas com o processo de patogênese, localizadas freqüentemente em espaços intercelulares e solúveis em ácido. É possível que RPCPs ativem também o sistema de defesa da planta.

Van Peer & Shippers (1992) relataram que plantas de cravo foram protegidas do ataque de *Fusarium* spp. através da IRS por *Pseudomonas* sp. Da mesma forma, Wei *et al.* (1991a) relataram IRS em folhas de pepino contra *Colletotrichum orbiculare* após a inoculação de sementes com linhagens selecionadas de RPCPs. *P. putida* e *Serratia marcescens*, que previamente haviam induzido resistência sistêmica à antracnose em pepino, também induziram resistência à mancha foliar causada por *P. syringae* pv. *lachrymans* (Liu *et al.*, 1995).

Efeitos sistêmicos após a inoculação com *P. putida*, *P. tolaasii* (P9A) e *P. aureofaciens* REW1-I-1 foram observados em folhas de feijão. Os níveis de proteínas solúveis em ácido aumentaram nas folhas de plantas inoculadas. Fitoalexinas e compostos fenólicos se acumularam nos cotilédones inoculados com o isolado REW1-I-1 (Zdor & Anderson, 1992). Segundo os autores, o isolado REW1-I-1 produziu HCN, um fator relacionado aos mecanismos de defesa da planta.

Essas RPCPs podem ser aplicadas tanto no solo como em sementes ou hipocótilos. O fenômeno de resistência induzida reside no fato de que a ação do indutor se faz sentir no metabolismo da planta hospedeira. De modo geral, a indução de resistência depende, em grande parte, do intervalo de tempo entre a aplicação do indutor e a inoculação com o patógeno; isso porque a planta precisa ativar seu mecanismo de defesa.

Trabalhos recentes mostram que a indução de resistência sistêmica mediada por RPCP apresenta-se bastante parecida com os trabalhos clássicos. Neste caso, a IRS requer indução via pré-inoculação com patógenos fracos, o que, em última análise, dificultaria o desenvolvimento de formulações comerciais. Já a IRS mediada por RPCP poderá ser utilizada via produção de inoculantes para o controle efetivo de doenças de plantas.

COLONIZAÇÃO DE RAÍZES

A capacidade das RPCPs de colonizarem o sistema radicular é de fundamental importância para o seu efetivo uso como agentes de controle biológico. No entanto, tem sido sugerido que uma colonização variável seja, provavelmente, uma razão para que o controle seja inconsistente (Weller, 1988). A colonização compreende uma série de passos: migração em direção às raízes, ataque, distribuição ao longo das raízes, crescimento e estabelecimento da população. Após o contato inicial, vem a fase crucial que é a manutenção ou persistência, onde a bactéria utiliza exsudados das raízes para se multiplicar e sobreviver.

Quimiotactismo tem sido demonstrado em muitas bactérias associadas, particularmente, linhagens de *Pseudomonas* migram ativamente em direção a sementes no solo. Scher *et al.* (1985) hipotetizaram que este evento poderia ser o primeiro passo no estabelecimento da colonização de sementes e de raízes.

Para explicar o fenômeno de colonização de raízes por rizobactérias, alguns pesquisadores (Anderson *et al.*, 1988; Tari & Anderson, 1988) mostraram que uma linhagem de *P. putida* se aglutinou às raízes de feijão e pepino através de seu complexo de glicoproteínas. Essas evidências foram comprovadas com a obtenção de mutantes negativos (Agg^-) para aglutinação. Comparados à linhagem selvagem, os mutantes Agg^- aderiram-se às raízes em menor extensão, colonizando-as moderadamente e levando a uma menor proteção de plantas de pepino contra *Fusarium oxysporum*.

Com relação à motilidade, Howie *et al.* (1987) e Scher *et al.* (1988) constataram que mutantes imóveis colonizaram as raízes de forma semelhante às linhagens selvagens; de onde se concluiu que a motilidade não é requerida nesse processo. Já De Weger *et al.* (1987) observaram que um mutante não-móvel de *Pseudomonas* spp. foi incapaz de colonizar as regiões inferiores das raízes de batata quando comparado com a linhagem parental.

Moléculas de polissacarídeos da superfície celular de *Agrobacterium* e *Rhizobium* mediam seu ataque e subsequente interação com células de plantas (Halverson & Stacey, 1986). As linhagens de *Pseudomonas* WCS 358 e WCS 374 têm polissacarídeos com longas cadeias laterais de O-antigênico. Destas linhagens, De Weger *et al.* (1987b) construíram

mutantes que não produziam as cadeias laterais de O-antigênico e que não diferiram das linhagens selvagens com relação ao ataque a partículas de sefadex ou raízes esterilizadas de batata. Estes achados conflitantes sobre o papel dos flagelos podem ser atribuídos a possíveis diferenças nos isolados bacterianos, na espécie de planta e nas condições físicas do solo, particularmente a umidade. Outros fatores não inerentes à bactéria podem facilitar ou não a colonização de raízes; dentre estes, podemos citar o potencial matricial, embora a bactéria introduzida possa se difundir a partir do material semeado para as raízes em uma ampla faixa de potencial osmótico (Weller, 1988).

Ainda com relação às bactérias associadas à planta hospedeira, os genes responsáveis pela nodulação em *Rhizobium* são induzidos por flavonas e compostos relacionados (Djordjevic *et al.*, 1987), e alguns genes em *Agrobacterium* são induzidos por acetosiringone e compostos relacionados (Stachel *et al.*, 1985). Esses compostos são liberados na rizosfera pela planta hospedeira e a indução dos genes é crítica para infecções subseqüentes. No caso das *Pseudomonas* não-patogênicas, essas interações não têm sido demonstradas, ou seja, a presença da planta não cria um ambiente que favoreça uma maior colonização.

De acordo com alguns estudos, as maiores populações de bactérias ocorrem em pressões na faixa de -0,3 a 0,7 bar, na qual Howie *et al.* (1987) observaram que a disponibilidade de oxigênio e o potencial de turgor das células e/ou a disponibilidade de nutriente seriam adequados para o desenvolvimento de células bacterianas. A área de percolação pode servir também para estender a população bacteriana introduzida na direção das extremidades das raízes.

O pH e a temperatura são também fatores importantes na colonização. Para o crescimento *in vitro* de linhagens de *P. fluorescens* e *P. putida*, a temperatura seria de 25-30°C, e o pH de neutro a alcalino. No solo, porém, a colonização é favorecida nas temperaturas de 12 a 18°C e em pH de 6,0 a 6,5. Isso ocorre porque temperatura e pH abaixo do ideal refletem na menor competição com a microbiota indígena.

A colonização de raízes, portanto, diz respeito ao crescimento da bactéria ao longo das raízes. Essa característica é pré-requisito primário na rizosfera, onde a colonização de novas superfícies radiculares formadas é realizada pela migração da microflora existente ou pelo inóculo do solo.

RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE EMERGÊNCIA DE PLÂNTULAS

Tem-se descoberto que algumas rizobactérias podem aumentar a emergência de plântulas. Experimentos em condições controladas e em condições de campo mostraram aumento da emergência de plântulas em até 100% (Kloepper *et al.*, 1986). Estas bactérias, chamadas “rizobactérias promotoras de emergência” – RPE, têm aumentado a emergência de plântulas, principalmente em condições de baixa temperatura do solo. Espécies de bactérias já conhecidas como promotoras do crescimento de plantas têm sido identificadas como RPEs, quais sejam: *Pseudomonas fluorescens* e *P. putida*. Todavia, um novo grupo de bactérias, não previamente relatadas como RPCP, foi descoberto: *Enterobacter aerogenes*, *Serratia liquefaciens* e *Beijerinckia* spp. (Kloepper *et al.*, 1986).

Uma linhagem de *P. aeruginosa* 7NSk2 e uma de *P. fluorescens* ANPI5 promotoras do crescimento de plantas (Höfte *et al.*, 1991b) induziram um aumento na germinação de sementes que haviam sido submetidas por 10 dias em condições de baixa temperatura. Plantas originadas de sementes tratadas com *Pseudomonas* que haviam sido submetidas a um período de frio tiveram um conteúdo de matéria seca superior ao das plantas-controle.

Os autores relataram que a produção de antibiótico por essas bactérias parece não estar envolvida na promoção da emergência de plântulas.

Rizobactérias isoladas do rizoplano de milho de inverno, cv. piranão de inverno – ESALQ, ou seja, variedade com antocianina nas folhas, plantada sob condições de baixa temperatura (16°C), foram selecionadas visando obter bactérias que aumentassem a germinação de sementes, por ocasião do plantio de inverno. Cerca de 72% dos isolados bacterianos, principalmente do gênero *Pseudomonas* spp., aumentaram a germinação de sementes em 31% (Melo & Lucon, 1995).

As constatações de rizobactérias promotoras da emergência que operam em condições de baixa temperatura têm fundamental importância na indústria de inoculantes microbianos. Estas bactérias podem atuar como antagonistas de microrganismos deletérios nas sementes em condições de baixa temperatura, como também podem produzir fatores de crescimento estimulados pelos exsudados das sementes durante a germinação.

RIZOBACTÉRIAS DELETÉRIAS

A rizosfera é geralmente ocupada também por rizobactérias deletérias (RD) que inibem o crescimento de plantas e têm sido envolvidas em declínios na produção, associados com monocultivo contínuo. Inicialmente as RDs não eram consideradas colonizadoras de endorrizosfera e foram descritas como patógenos não-parasíticos (Woltz, 1978). Atualmente, sabe-se que as RDs freqüentemente penetram no córtex intercelularmente (Campbell *et al.*, 1987; van Peer *et al.*, 1990; Aström *et al.*, 1993).

Inúmeros relatos têm sido feitos sobre a presença de RD em várias culturas, gramíneas forrageiras e ervas-daninhas (Nehl *et al.*, 1996), e muitas delas incluem *Enterobacter taylore*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *Bacillus* sp., *B. polymixa*, *B. cereus*.

As dificuldades em se isolar RD devem-se ao fato de não se identificar os sintomas causados por esse tipo de rizobactéria. Os sintomas podem incluir inibição do crescimento da parte aérea e de raízes e não causar, no entanto, nenhum sintoma visual. Os sintomas foliares são freqüentemente similares àqueles de deficiência de nutrientes (Gerhardson *et al.*, 1985). As RDs também causam escurecimento e descoloração de raízes, necroses e inibição do desenvolvimento de pêlos radiculares (Suslow & Schroth, 1982; Schippers *et al.*, 1987).

Rizobactérias deletérias inibem primariamente o crescimento de plantas através da produção de fitotoxinas. Bakker & Schippers (1987) propuseram que a produção de cianida por rizobactérias era a responsável pela inibição do crescimento de batata em solo cultivado continuamente com batata. Sua hipótese foi baseada no fato de que 50% das pseudomonas da rizosfera produziram cianida *in vitro*, enquanto isolados que promoveram o crescimento de plantas não produziram cianida. As RDs também podem produzir metabólitos fitotóxicos não-voláteis. Aström *et al.* (1993) verificaram que um filtrado de cultura de *Pseudomonas* A313 inibiu a alongação de raízes de trigo. Contudo, Kirkegaard *et al.* (1995) notaram que os metabólitos examinados por Aström *et al.* (1993) poderiam reduzir o crescimento de raízes, mas os sintomas sobre a parte aérea eram produzidos somente na presença da bactéria.

Um outro mecanismo que deve afetar o crescimento de plantas pelas RDs é a produção de fitohormônios. Ácido Indol Acético (AIA) produzido por RD inibiu o crescimento radicular de beterraba (Loper & Schroth, 1986), enquanto linhagens de *Pseudomonas* não produtoras de AIA

não reduziram o crescimento radicular. Sarwar & Kremer (1995) verificaram que a inibição do crescimento radicular de algumas plantas cultivadas e ervas daninhas por uma linhagem de *Enterobacter taylore* que produz grandes quantidades de AIA foi aumentada sinergisticamente por triptofano, um precursor do AIA.

As rizobactérias deletérias também afetam o crescimento das plantas por competição de nutrientes. Competição da rizosfera de *Plantago major* L. causado por RD reduziu a absorção de P e, conseqüentemente, o crescimento da planta (Bass, 1990).

Verifica-se que as rizobactérias têm o potencial de agir tanto como RD como RPCP. As RDs representam um grupo importante de patógenos de plantas, cujo diagnóstico em condições de campo e controle torna-se bastante difícil devido à ausência de sintomas visuais e de mortalidade de plantas. Está claro que grande parte dos efeitos deletérios dessas rizobactérias estão associados com a prática da monocultura. Nesse sentido, a rotação de culturas deveria ser considerada uma prática de controle efetiva (Schippers *et al.*, 1987).

RIZOBACTÉRIAS QUE METABOLIZAM MOLÉCULAS XENOBIÓTICAS

A biodegradação de alguns compostos xenobióticos sintetizados pelo homem e estranhos ao meio-ambiente tem sido favorecida na presença de raízes e exsudados de raízes de plantas (Hsu & Bartha, 1979; Walton & Anderson, 1990, 1992; Ferro *et al.*, 1994). Isso porque na rizosfera há uma grande biomassa microbiana e uma maior atividade como resultado de substratos de carbono fornecidos pela rizodeposição. As plantas são expostas a compostos tóxicos de ocorrência natural, incluindo fenóis, diterpenos e alcalóides, e também a compostos antropogênicos potencialmente tóxicos. Por outro lado, a microbiota na rizosfera é capaz de degradar muitos dos compostos alelopáticos de ocorrência natural e substâncias xenobióticas sintéticas. As pseudomonas, muito comuns em solos rizosféricos, parecem ser bem adaptadas aos exsudados de raízes e utilizam prontamente substâncias orgânicas liberadas pelas plantas. Já espécies de *Arthobacter* são abundantes a baixos níveis de exsudados.

Em alguns casos, análogos estruturais de vários xenobióticos que fazem parte dos exsudados de raízes, componentes das paredes de

células e lisados, assim como produtos secundários de decomposição desses materiais, podem selecionar microrganismos que metabolizam ou cometabolizam xenobióticos.

Por outro lado, plantas podem ser úteis na estabilização e biorremediação de solos poluídos, atuando diretamente através de seu próprio metabolismo (Scheel *et al.*, 1984) ou através da estimulação de rizobactérias indígenas que podem metabolizar esses poluentes (Walton & Anderson, 1990; Boyle & Shann, 1995). No entanto, muitos poluentes na superfície do solo são fitotóxicos e, nesses casos, seria vantajoso combinar o tratamento de solos contaminados com a utilização de plantas e rizobactérias, de modo que a detoxicação por bactérias melhoraria o crescimento das plantas e evitaria a absorção e bioconcentração no tecido vegetal. Tem sido proposto que a atividade microbiana de rizobactérias pode proteger certas espécies de plantas que se desenvolvem em solos contaminados com herbicidas (Anderson *et al.*, 1994) e Pentaclorofenol (Pfender, 1996). Rizobactérias com potencial catabólico para diferentes tipos de poluentes poderiam servir como base de um sistema planta-bactéria para purificação do solo (Barkovskii *et al.*, 1995). Bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Azospirillum* e *Azotobacter* são organismos ideais para esse propósito, pois colonizam o rizoplano e rizosfera de muitas espécies de plantas. Elas são bem estudadas como rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e fixadoras de N₂, e, portanto, apresentam inúmeras vantagens quanto à produção de inoculantes. Nesse sentido, Venkateswarlu & Sethunatan (1984) isolaram uma linhagem de *Azospirillum lipoferum* com potencial de metabolizar o inseticida-nematicida carbofuran. Na mesma linha de pesquisa, Barkovskii *et al.* (1995) estudaram a capacidade de 31 linhagens de *A. brasilense* e *A. lipoferum*, isoladas da rizosfera e do rizoplano de diferentes plantas para degradar fenol e benzoato. Os autores observaram que nove das 31 linhagens possuíam a capacidade de degradar benzoato e 3 linhagens possuíam a capacidade de degradar fenol, e que o metabolismo desses compostos pelas bactérias foi dependente da presença de extrato de levedura.

A capacidade de linhagens de *Azospirillum* degradarem fenol e benzoato indica a presença das enzimas monoxigenases, dioxigenases e isomerases, cujas funções são a clivagem dos anéis aromáticos e a conversão dos produtos resultantes para metabolismo energético.

Hoagland *et al.* (1995) encontraram duas linhagens de *Pseudomonas* isoladas da rizosfera de arroz que hidrolisaram o herbicida propanil.

Essas linhagens apresentam alta atividade aril acilamidase (completa dissipação de propanil [N-(3,4-dichlorofenil) propanamida] a dicloroanilina – DCA). Embora DCA e outras cloroanilinas sejam resistentes à biodegradação no solo, algumas rizobactérias podem metabolizar tais compostos (You & Bartha, 1982; Zeyer & Kearney, 1982; Roque *et al.*, 1997). Aril acilamidases específicas responsáveis pela hidrólise de acetanilidas, tais como propanil, fenilureias e carbamatos, têm sido descritas para várias linhagens bacterianas, incluindo *Pseudomonas* (Kearney, 1965; Hirase & Matsunaka, 1989), *Alcaligines* (Hirase & Matsunaka, 1989), *Bacillus* (Wallnöfer & Bader, 1969) e *Corynebacterium* (Nakamura *et al.*, 1992).

Hsu & Bartka (1979) verificaram que a presença de plantas ou irrigação do solo com exsudados de raízes aumentou a taxa de degradação de parathion. A degradação do herbicida Mecoprop por uma comunidade microbiana isolada da rizosfera de trigo também tem sido documentada por Lappin *et al.* (1985).

A possibilidade de que raízes de plantas aumentam a degradação microbiana de moléculas xenobióticas pode abrir novos horizontes para resolver problemas relacionados com contaminação ambiental, através do uso de vegetação para remediação de solos. Também rizobactérias benéficas podem proteger plantas cultivadas dos efeitos tóxicos de pesticidas.

CONCLUSÕES

Os resultados dos experimentos com a utilização de RPCPs na agricultura têm despertado o interesse de muitos pesquisadores, dado o seu potencial de controlar pragas, fixar N₂, detoxificar xenobióticos, entre outros atributos. No entanto, há inúmeros relatos indicando que inoculação com RPCPs nem sempre conduz a aumentos significativos da produção. Várias são as razões para essas inconsistências, incluindo, principalmente, caracteres intrínsecos das bactérias com competência ecológica (capacidade de competir e sobreviver na rizosfera) e perda de características importantes quando a bactéria é cultivada *in vitro*. Além disso, a natureza da microflora do solo pode afetar o comportamento das RPCPs. Essas devem competir com microrganismos indígenas por nutrientes e água.

A produção de metabólitos tóxicos pelas RPCPs que reduzem o crescimento da microflora competitiva pode, de certo modo, favorecer uma

maior competência na rizosfera. Ademais, uma eficiente colonização de raízes é um requisito fundamental para proteção de plantas contra fitopatógenos. Vários caracteres têm sido identificados como relevantes para colonização. Entre eles estão a presença de flagelo, a capacidade de sintetizar aminoácidos e a presença da cadeia lateral O-antigenic de polissacarídeo.

Todos esses caracteres mencionados não são fáceis de serem identificados e selecionados *in vivo*, e os testes envolvendo plantas são laboriosos, principalmente quando se trabalha com centenas de linhagens e/ou mutantes. No entanto, apesar desse inconveniente, os testes *in vivo* são os preferidos para se selecionar RPCPs.

AGRADECIMENTO

O autor agradece a valiosa colaboração da Dra. Cleusa Maria Mantovanelo-Lucon pelas sugestões e revisão do manuscrito.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation**. San Diego: Academic Press, 1994. 302p.
- ANDERSON, A.J.; TARI, P.H.; TEPPER, C.S. Molecular studies on the role of the root surface agglutinin in adherence and colonization by *Pseudomonas putida*. **Applied and Environmental Microbiology**. v.54, p.375-380, 1988.
- ANDERSON, T.A.; KRUGER, E.L.; COATS, J.R. Biological degradation of pesticide wastes in the root zone of soil collected at an agrochemical dealership. In: **Bioremediation through rhizosphere technology** Washington: American Chemistry Society, 1994. p.199-209 (ACS Symposium Series, 0097-6156).
- ASSAF, N.A.; TURCO, R.F. Accelerated biodegradation of atrazine by a microbial consortium is possible in culture and soil. **Biodegradation**. v.5, p.29-35, 1994.
- ÄSTRÖM, B.; GUSTAFSSON, A.; GERHATDSON, B. Characteristics of a plant deleterious rhizosphere pseudomonad and its inhibitory metabolites. **Journal of Applied Bacteriology**. v.74, p.20-28, 1993.
- ATZORN, R.; CROZIER, A.; WHEELER, C.T.; SANDBERG, G. Production of gibberellins and indole-3-acetic acid by *Rhizobium phaseoli* in relation to nodulation of *Phaseolus vulgaris* roots. **Planta**. v.175, p.532-538, 1988.
- AZCON, R.; BAREA, J.M. Synthesis of auxins, geberellins and cytokinins by *Azotobacter vinelandii* and *Azotobacter beijerinckii* related to effects produced on tomato plants. **Plant Soil**. v.43, p.609-619, 1975.
- BADENOCH-JONES, J.; SUMMONS, R.E.; DJORDJENIC, M.A.; SHINE, J.; LETHAM, D.S.; ROLFE, B.G. Mass spectrometric quantification of indole-3-acetic acid in *Rhizobium* culture supernatants: relation to root hair curling and nodule initiation. **Applied Environmental Microbiology**. v.44, p.275-280, 1982.
- BAKKER, A.W.; SCHIPPERS, B. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp.-mediated plant growth-stimulation. **Soil Biology and Biochemistry**. v.19, p.451-457, 1987.
- BARDELEAV, M.E.; BARTHA, R. Rapid technique for enumeration and isolation of peroxidase-producing microorganisms. **Applied Microbiology**. v.18, p.274-275, 1969.
- BAREA, J.M.; BROWNM, E. Effects on plant growth produced by *Azotobacter paspali* related to synthesis of plant growth regulating substances. **Journal Applied Bacteriology**. v.37, p.583-593, 1974.

- BARKOVSKII, A.L.; KORSHUNOVA, V.E.; POZDNYACOVA, L.I. Catabolism of phenol and benzoate by *Azospirillum* strains. **Applied Soil Ecology**, v.2, p.17-24, 1995.
- BARTHA, R. Isolation of microorganisms that metabolize xenobiotic compounds. In: LABEDA, D., ed. **Isolation of biotechnological organisms from nature**. New York: MacGraw-Hill, 1990. p.283-307.
- BASS, R. Effects of *Glomus fasciculatum* and isolated rhizosphere microorganisms on growth and phosphate uptake of *Plantago major* ssp. *pleioperma*. **Plant and Soil**, v.124, p.187-193, 1990.
- BOTTINI, R.; FULCHIERI, M.; PEARCE, D.; PHARIS, R.P. Identification of gibberellins A₁, A₃ and iso-A₃ in cultures of *Azospirillum lipoferum*. **Plant Physiology**, v.90, p.45-47, 1989.
- BOYLE, J.; SHANN, J. Biodegradation of phenol, 2,4-DCP, and 2,4,5-T in the field-collected rhizosphere and nonrhizosphere soils. **Journal of Environmental Quality**, v.24, p.782-785, 1995.
- BROADBENT, P.; BAKER, K.F.; FRANKS, N.; HOLLAND, J. Effect of *Bacillus* spp. on increased growth of seedling in steamed and in nontreated soil. **Phytopathology**, v.67, p.1027-1034, 1977.
- BROWN, M.E. Plant growth substances produced by microorganisms of soil and rhizosphere. **Journal Applied Bacteriology**, v.35, p.443-451, 1972.
- BROWN, M.E.; BURLINGHAM, S.K. Production of plant growth substances by *Azotobacter chroococcum*. **Journal General Microbiology**, v.53, p.135-144, 1968.
- BROWN, M.E.; BURLINGHAM, S.K. Production of plant substances by *Azotobacter chroococcum*. **Journal of General Microbiology**, v.53, p.135-144, 1968.
- BROWN, M.E.; BURLINGHAM, S.K.; JACKSON, R.M. Studies on *Azotobacter* species in soil. III. Effects of artificial inoculation on crop yield. **Plant and Soil**, v.20, p.194-214, 1964.
- BROWN, M.E.; BURLINGHAM, S.K.; JACKSON, R.M. Studies on *Azotobacter* species in soil. II. Populations of *Azobacter* in the rhizosphere and effects of artificial inoculation. **Plant and Soil**, v.17, p.320-332, 1962.
- BROWN, M.E.; WALKER, N. Indolyl-3-acetic acid formation by *Azotobacter chroococcum*. **Plant Soil**, v.32, p.250-253, 1970.
- BULARD, C.; GUICHARDON, B.; RIGAUD, J. Mise en évidence de substances de nature auxinique synthetisees par *Rhizobium* cultive en presence de thryptophane. **Ann. Inst. Pasteur**, v.105, p.150-157, 1963.
- BUYER, J.S.; LEONG, J. Iron transport-mediated antagonism between plant growth-promoting and plant-deleterious *Pseudomonas* strains. **Journal of Biological Chemistry**, v.261, p.791-794, 1986.
- CAIN, R.B.; MITCHELL, J.A. Enhanced degradation of the fungicide vinclozolin: isolation and characterization of a responsible organism. **Pesticide Science**, v.48, p.13-23, 1996.
- CAMPBELL, J.N.; CASS, D.D.; PETEYA, D.J. Colonization and penetration of intact canola seedling roots by an opportunistic fluorescent *Pseudomonas* sp. and the response of host tissue. **Phytopathology**, v.77, p.1166-1173, 1987.
- CLARK, A.G. Indole acetic acid production by *Agrobacterium* and *Rhizobium* species. **Microbios**, v.11A, p.29-35, 1974.
- COLYER, P.D.; MOUNT, M.S. Bacterization of potatoes with *Pseudomonas putida* and its influence on postharvest soft rot diseases. **Plant Disease**, v.68, p.703-706, 1984.
- COOK, R.J.; BAKER, K.F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St. Paul: Amercian Phytopathology Society, 1983. 539 p.
- COTTERILL, E.G.; OWEN, P.G. Enhanced degradation in soil of triallate and other carbamate pesticide following application of triallate. **Weed Research**, v.29, p.65-68, 1989.
- DASHTI, N.; ZHANG, F.; HYNES, R.; SMITH, D.L. Application of plant growth-promoting rhizobacteria to soybean (*Glycine max*) increases protein and dry matter yield under short-season conditons. **Plant and Soil**, v.188, p.33-41, 1997.
- DATTA, M.; BANIK, S.; GUPTA, R.K. Studies on the efficacy of a phytohormone producing phosphate solubilizing *Bacillus firmus* in angmenting paddy yield in acid soils of Nagaland. **Plant and Soil**, v.69, p.365-373, 1982.
- DE WEGER, L.A.; VAN DER BIJ, A.J.; DEKKERS, L.C.; SIMONS, M.; WIJFFELMAN, C.A.; LUGTENBERG, B.J.J. Colonization of the rhizosphere of crop plants by plant-beneficial pseudomonas. **FEMS Microbiology Ecology**, v.17, p.221-228, 1995.

- DE WEGER, L.A.; van der VLUET, G.I.M.; WIJFJES, A.H.M.; BAKKER, P.A.H.M.; SCHIPPES, B.; LUGTENBERG, B. Flagella of a plant-growth stimulating *Pseudomonas fluorescens* strain are required for colonization of potato roots. **Journal of Bacteriology**, v.169, p.2769-2773, 1987.
- DJORDJEVIC, M.A.; GABRIEL, D.W.; ROLFE, B.G. Rhizobium - the refined parasite of legumes. **Annual Review of Phytopathology**, v.25, p.145-168, 1997.
- DUFF, R.B.; WEBLEY, D.M.; SCOTT, R.O. Solubilization of minerals and related materials by 2-ketogluconic acid-producing bacteria. **Soil Science**, v.95, p.105-114, 1963.
- EL-BAHRAWY, S.A. Associative effect of mixed cultures of *Azotobacter* and different rhizosphere fungi with *Rhizobium japonicum* on nodulation and symbiotic nitrogen fixation of soybean. **Zentrbl. Mikrobiol.**, v.138, p.443-449, 1983.
- FERRO, A.M.; SIMS, R.C.; BUGBEE, B. Hycrest crested wheatgrass accelerated the degradation of pentachlorophenol in soil. **Journal of Environmental Quality**, v.23, p.272-279, 1994.
- FORREST, M.; LORD, K.A.; WALJER, N.; WOODVILLE, H.C. The influence of soil treatments on the bacterial degradation of diazinon and other organophosphorus insecticides. **Environmental Pollution. Series A**, v.24, p.93-104, 1981.
- FRAVEL, D.R. Role of antibiotics in the biocontrol of plant diseases. **Annual Review of Phytopathology**, v.26, p.75-91, 1988.
- FREITAS, J.R.; BANERJEE, M.R.; GERMIDA, J.J. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). **Biology and Fertility of Soils**, v.24, p.358-364, 1997.
- GAING, S.; GAUR, A.C. Thermotolerant phosphate solubilizing microorganisms and their interaction with mung bean. **Plant and Soil**, v.133, p.141-149, 1991.
- GERHARDSON, B.; ALSTRÖM, S.; RÄMERT, B. Plant reactions to inoculation of root with fungi and bacteria. **Phytopathologische Zeitschrift**, v.114, p.108-117, 1985.
- GIANNATTASIO, M.; COPPOLA, S. Isolamento di citochinine dal *Rhizobium leguminosarum* Frank. **G. Bot. Ital.**, v.103, p.11-17, 1969.
- GRIMES, H.D.; MOUNT, M.S. Influence of *Pseudomonas putida* on nodulation of *Phaseolus vulgaris*. **Soil Biology and Biochemistry**, v.16, p.27-30, 1984.
- HALVERSON, J.L.; STACEY, G. Signal exchange in plant microbial interactions. **Microbiological Review**, v.50, p.193-225, 1986.
- HALVERSON, L.J.; HANDELSMAN, J. Enhancement of soybean nodulation by *Bacillus cereus* UW 85 in the field and in a growth chamber. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, n.9, p.2767-2770, 1991.
- HARTMANN, A.; SINGH, M.; KLINGMULLER, W. Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indoleacetic acid. **Canadian Journal Microbiology**, v.29, p.916-923, 1983.
- HIRASE, K.; MATSUNAKA, S. Properties of propanil hydrolase in soil bacteria. **Proceedings Brighton Crop Protection Conference Weeds**, v.2, p.419, 1989.
- HOAGLAND, R.; ZABLOTOWICZ, R. Rhizobacteria with exceptionally high aryl acylamidase activity. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.52, p.190-200, 1995.
- HÖFTE, M.; BOELEN, J.; VERSTRAETE, W. Seed protection and promotion of seedling emergence by the plant growth beneficial *Pseudomonas* strains 7NSK2 and ANPIS. **Soil Biology and Biochemistry**, v.23, n.5, p.407-410, 1991b.
- HÖFTE, M.; SEONG, K.Y.; JURKEVITCH, E.; VERSTRAETE, W. Pyoverdinin production by the plant growth beneficial *Pseudomonas* strain 7NSK2 - ecological significance in soil. In: CHENT, Y.; HADAR, Y., ed **Iron nutrition and interactions in plants**. Dordrecht: Kluwer, 1991. p.289-297.
- HOREMANS, S.; KONINCK, K.D.; NEURAY, J.; HERMANS, R.; VLASSAK, K. Production of plant growth substances by *Azospirillum* sp. and other rhizobacteria. **Symbiosis**, v.2, p.341-346, 1986.
- HOWELL, C.R.; STIPANOVIC, R.D. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. **Phytopathology**, v.69, p.480-482, 1979.
- HOWELL, C.R.; STIPANOVIC, R.D. Suppression of *Pythium ultimum* - induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluteorin. **Phytopathology**, v.70, p.712-715, 1980.

- HOWIE, C.R.; SUSLOW, T.V. The effect of antifungal compound biosynthesis on cotton root colonization and *Pythium* suppression by a strain of *Pseudomonas fluorescens* and its antifungal minus isogenic mutant. **Phytopathology**, v.76, p.1069 (abstract), 1986.
- HOWIE, W.J.; COOK, R.J.; WELLER, D.M. Effects of soil matric potential and cell motility on wheat root colonization by fluorescent pseudomonadas suppressive to take-all. **Phytopathology**, v.77, p.286-292, 1987.
- HSU, T.S.; BARTHA, R. Accelerated mineralization of two organophosphate insecticides in the rhizosphere. **Applied Environmental Microbiology**, v.37, p.36-41, 1979.
- HUSSAIN, A.; VANCURA, V. Formation of biologically active substances by rhizosphere bacteria and their effect on plant growth. **Folia Microbiol.**, v.15, p.468-478, 1970.
- KAMPERT, M.; STRZELCZYK, E.; POKOJSKA, A. Production of auxins by bacteria isolated from roots of pine seedlings (*Pinus silvestris* L.). **Acta Microbiol.** Pol, v.7, p.135-143, 1975.
- KAMPERT, M.; STRZELCZYK, E. Effect of pH on production of cytokinin-like substances by bacteria isolated from soil, rhizosphere and mycorrhizosphere of pine (*Pinus sylvestris* L.). **Acta Microbiol.** Pol., v.33, p.77-85, 1984.
- KAPULNIK, Y.; GAFNY, R.; OKON, Y. Effect of *Azospirillum* spp. inoculation on root development and NO³ uptake in wheat (*Triticum aestivum* cv. miriam) in hydroponic systems. **Canadian Journal of Biology**, v.63, p.627-631, 1983.
- KAPULNIK, Y.; OKON, Y.; HENIS, Y. Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation. **Canadian Journal of Microbiology**, v.31, p.881-887, 1985.
- KATZNELSON, H.; BOSE, B. Metabolic activity and phosphate dissolving capability of bacterial isolates from wheat roots, rhizosphere and non-rhizosphere soil. **Canadian Journal of Microbiology**, v.5, p.79-85, 1959.
- KATZNELSON, H.; COLE, S.E. Production of gibberellin-like substances by bacteria and actinomycetes. **Canadian Journal Microbiol.**, v.11, p.733-741, 1965.
- KATZNELSON, H.; SIROIS, J.C.; COLE, S.E. Production of a gibberellin-like substance by *Arthrobacter globiformis*. **Nature**, v.196, p.1012-1012, 1962.
- KAVIMANDAN, S.K.; GAUR, A.C. Effect of seed inoculation with *Pseudomonas* sp. on phosphate uptake and yield of maize. **Current Science**, v.40, p.439-440, 1971.
- KEARNEY, P.C. Purification and properties of an enzyme responsible for hydrolysing phenylcarbamates. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.13, p.561, 1965.
- KIRKEGAARD, J.A.; MUNS, R.; JAMES, R.A.; GARDNER, P.A.; ANGUS, J.F. Reduced growth and yield of wheat with conservation cropping. Soil biological factors limit growth under direct drilling, 2. **Australian Journal of Agriculture Research**, v.46, p.75-88, 1995.
- KLOEPPER, J.W.; LEONG, J.; TEINTZE, M.; SCHROTH, M.N. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. **Nature**, v.286, p.885-886, 1980b.
- KLOEPPER, J.W.; LEONG, J.; TEINTZE, M.; SCHROTH, M.N. Pseudomonas siderophores: a mechanism explaining disease-suppressive soils. **Current Microbiology**, v.4, p.317, 1980a.
- KLOEPPER, J.W.; SCHER, F.M.; LALIBERTE, M.; TIPPING, B. Emergence-promoting rhizobacteria: description and implication for agriculture. In: SWINBURNE, T.R., ed. **Iron, Siderophores and plant diseases**. New York: Plenum Press, 1986. p.155-181.
- KLOEPPER, J.W.; SCHROTH, M.N. Plant growth-promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions. **Phytopathology**, v.71, p.642-644, 1981.
- KLOEPPER, J.W.; SCHROTH, M.N.; MILLER, T.D. Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. **Phytopathology**, v.70, p.1078-1082, 1980.
- KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S.; KUÉ, J. Proposed definitions related to induce disease resistance. **Biocontrol Science and Technology**, v.2, p.349-351, 1992.
- KNIGHT, T.J.; LANGSTON-UNKEFER, P.J. Enhancement of symbiotic dinitrogen fixation by a toxin-releasing plant pathogens. **Science**, v.241, p.951-954, 1988.
- LAHEURTE, F.; BERTHELIN, J. Effect of a phosphate-solubilizing bacteria on maize growth and root exudation over four levels of labile phosphorus. **Plant and Soil**, v.105, p.11-17, 1988.
- LAPPIN, H.M.; GREAVES, M.P.; SLATER, J.H. Degradation of the herbicide Mecoprop [2-(2-methyl-4-chlorophenoxy) propionic acid] by a synergistic microbial community. **Applied and Environmental Microbiology**, v.49, p.429-433, 1985.

- LEONG, J. Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.24, p.187-209, 1986.
- LIE, D.M.; ALEXANDER, A. Co-inoculation with antibiotic producing bacteria to increase colonization and nodulation by rhizobia. **Plant and Soil**, v.108, p.211-219, 1988.
- LIFSHITZ, R.; KLOPPER, J.W.; KOZLOWSKIM M.; SIMONSON, C.; CARLSON, J.; TIPPING, E.M.; ZALESKA, I. Growth promotion of canola (rapeseed) seedling by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, v.33, p.390-395, 1987.
- LIM, W.; OKON, Y.; HARDY, R.W.F. Enhanced mineral uptake by *Zea mays* and *Sorghum bicolor* roots inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.45, p.1775-1779, 1983.
- LIU, L.; KLOPPER, J.W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, v.85, p.843-847, 1995.
- LOPER, J.E.; SCHROTH, M.N. Influence of bacterial sources of indol-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. **Phytopathology**, v.76, p.386-389, 1986.
- LUZ, W.C. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.4, p.1-50, 1996.
- MAHMOUD, S.A.Z.; RAMADAN, E.M.; THABET, F.M.; KHATER, T. Production of plant growth promoting substances by rhizosphere microorganism. **Zentrbl. Mikrobiol.**, v.139, p.227-232, 1984.
- MANTOVANELO, C.M.; MELO, I.S. Isolamento e seleção de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*). **Summa Phytopathologica**, v.20, p.123-126, 1994.
- MARTIN, J.K. The influence of rhizosphere microflora on the availability of ³²P-myoinositol hexophosphate phosphorus to wheat. **Soil Biology and Biochemistry**, v.5, p.473-483, 1973.
- MELO, I.S.; LUCON, C.M.M. Efeito de rizobactérias na germinação de sementes e no crescimento de plantas de milho, em baixa temperatura. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, p.350 (suplemento), 1995.
- MELO, I.S.; VALARINI, P.J. Potencial de rizobactérias no controle de Fusarium solani (Mart.) Sacc. em pepino (*Cucumis sativum* L.). **Scientia Agricola**, v.52, p.326-330, 1995.
- MERRIMAN, P.R.; PRICE, R.D.; KOLLMORGEN, J.F.; PIGGOTT, T.; RIDGE, E.H. Effect of seed inoculation with *Bacillus subtilis* and *Streptomyces griseus* on the growth of cereals and carrots. **Journal of Agriculture Research**, series A, v.25, p.219-226, 1974.
- NAKAMURA, T.; MOCHIDA, K.; LI, W.X.; OZOE, Y. Isolation of aryl acylamidase - producing bacteria and some properties of the extracellular enzyme. **Journal of Pesticide Science**, v.17, p.99, 1992.
- NEHL, D.B.; ALLEN, S.J.; BROWN, J.F. Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. **Applied Soil Ecology**, v.5, p.1-20, 1996.
- NIETO, K.F.; FRANKENBERGER JR., W.T. Biosynthesis of cytokininins by *Azotobacter chroococcum*. **Soil Biology Biochemistry**, v.21, p.967-972, 1989a.
- OBRIGAWITCH, T.; MARTIN A.R.; ROETH, F.W. Degradation of thiocarbamate herbicides in soils exhibiting rapid EPTC breakdown. **Weed Science**, v.31, p.187-192, 1983.
- OBRIGAWITCH, T.; WILSON, R.G.; MARTIN, A.R.; ROETH, F.W. The influence of temperature, moisture and prior EPTC application on the degradation of EPTC in soils. **Weed Science**, v.30, p.175-181, 1982.
- PARKE, J.L.; RAND, R.E.; JOY, A.E.; KING, E.B. Biological control of *Pythium* damping-off and *Aphanomyces* root rot of peas by application of *Pseudomonas cepacia* or *P. fluorescens* to seed. **Plant Disease**, v.75, p.987-992, 1991.
- PEIXOTO, A.R.; MARIANO, R.L.R.; MICHHEREFF, S.J.; OLIVEIRA, S.M.A. Colonização, sobrevivência e mecanismos de ação de isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, agente potencial para o biocontrole de *Pseudomonas solanacearum*, em tomate. **Summa Phytopathologia**, v.21, p.213-218, 1995.
- PFENDER, W.F. Bioremediation bacteria to protect plants in pentachlorophenol-contaminated soil. **Journal of Environmental Quality**, v.25, p.1256-1260, 1996.
- PHILLIPS, D.A.; TORREY, J.G. Studies on cytokinin production by *Rhizobium*. **Plant Physiol.**, v.49, p.11-15, 1972.
- POLONENKO, D.R.; SCHER, F.M.; KLOPPER, J.W.; SINGLETON, C.A.; LALIBERTE, M.; ZALESKA, I. Effects of root colonization bacteria on nodulation of soybean roots by *Bradyrhizobium japonicum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.33, p.498-503, 1987.

- PRIKRYL, Z.; VANCURA, V.; WURST, M. Auxin formation by rhizosphere bacteria as a factor of root growth. **Biol. Plant.**, v.27, p.159-163, 1985.
- PUPPO, A.; RIGAUD, J. Cytokinins and morphological aspects of French-bean roots in the presence of *Rhizobium*. **Physiol. Plant.**, v.42, p.202-206, 1978.
- RACKE, K.D.; COATS, J.R. Enhanced degradation of isofenphos by soil micro-organisms. **Journal of Agriculture and Food Chemistry.** v.35, p.94-99, 1987.
- RAI, R. Efficacy of associative N₂-fixation by streptomycin resistant mutants of *Azospirillum brasilense* with genotypes of chick pea *Rhizobium* strains. **Journal of Agriculture Science.** v.100, p.75-80, 1983.
- RAJ, J.; BAGYARAJ, D.J.; MANJUNATH, A. Influence of soil inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhiza and a phosphate dissolving bacterium on plant growth and ³²P-uptake. **Soil Biology and Biochemistry**, v.13, p.105-108, 1981.
- READ, D.C. Enhanced microbial degradation of carbofuran and fensulfothion after repeated applications to acid mineral soil. **Agriculture Ecosystems and Environment**, v.10, p.37-46, 1983.
- ROQUE, M.R. A.; FERRACINI, V.L.; COELHO, K.C.; MELO, I.S. Biodegradação do herbicida diuron por rizobactérias. XIX Congresso Brasileiro de Microbiologia, 11-15 de novembro, Rio de Janeiro, p.193, 1997.
- SABER, M.S.M.; YOURSY, M.; KABESH, M.O. Effect of manganese application on the activity of phosphate dissolving bacteria in a calcareous soil cultivated with pea plants. **Plant and Soil**, v.47, p.335-339, 1977.
- SARWAR, M.; KREMER, R.J. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan derived compounds by deleterious rhizobacteria. **Plant and Soil**, v.172, p.261-269, 1995.
- SHELL, D.; SCHAFER, W.; SANDERMAN JR.; H. Metabolism of pentachlorophenol in cell suspension cultures of soybean (*Glycine max* L.) and wheat (*Tritium aestivum* L. general results and isolation of lignin metabolism. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.32, p.1237-1241, 1984.
- SCHER, F.M.; KLOEPPER, J.W.; SINGLETON, C.; ZALESKA, I.; LALIBERTE, M. Colonization of soybean root by *Pseudomonas* and *Serratia* species: relationship to bacterial motility, chemotaxis and generation time. **Phytopathology**, v.78, p.1055-1059, 1988.
- SCHER, F.M.; KLOEPPER, J.W.; SINGLETON, C.A. Chemotaxis of fluorescent *Pseudomonas* spp. to soybean seed exudates *in vitro* and in soil. **Canadian Journal of Microbiology**, v.31, p.570-570, 1985.
- SCHIPPERS, A.B.; BAKKER, A.W.; BAKKER, P.A.H.M.A Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. **Annual Review of Phytopathology**, v.25, p.339-358, 1987.
- SCHROTH, M.N.; HANCOCK, J.C. Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. **Science**, v.216, p.1376, 1381, 1982.
- SIMEONI, L.A.; LINDSAY, W.L.; BAKER, R. Critical iron level associated with control of Fusarium wilt. **Phytopathology**, v.77, p.1957-2061, 1987.
- SLADE, E.A.; FULLERTON, R.A. Degradation of the dicarboxide fungicides iprodione, vinclozolin and procymidone in patumahoe clay loam soil, New Zealand. **Pesticide Science**, v.35, p.95-100, 1992.
- STACHEL, S.E.; MESSENS, E.; VAN MONTAGU, M.; ZAMBRYSKI, J. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature**, v.318, p.624-629, 1985.
- STRZELCZYK, E.; POKOJSKA-BURDZIEJ, A. Production of auxins and gibberellin-like substances by mycorrhizal fungi, bacteria and actinomycetes isolates from soil and mycorrhizosphere of pine (*Pinus silvestris* L.) **Plant Soil**, v.81, p.185-194, 1984.
- SUSLOW, T.V.; SCHROTH, M.N. Role of deleterious rhizosphere as minor pathogens in reducing crop growth. **Phytopathology**, v.72, p.111-115, 1982.
- TARI, P.H.; ANDERSON, A.J. Fusarium wilt suppression and agglutinability of *Pseudomonas putida*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.2037-2041, 1988.
- THOMASHOW, L.S.; WELLER, D.M. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. tritici. **Journal Bacteriology**, v.170, p.3499-3508, 1988.
- TIEN, T.M.; GASKINS, M.H.; HUBBELL, D.H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied Environmental Microbiology**, v.37, p.1016-1024, 1979.

- TURNER, J.T.; BACKMAN, P.A. Factors relating to peanut yield increases following *Bacillus subtilis* seed treatment. **Plant Disease**. v.75, p.347-353, 1991.
- VAN PEER, R.; PUNTE, H.L.M.; WEGEG, L.A.; SCHIPPERS, B. Characterization of root surface and endorhizosphere pseudomonads in relation to their colonization of roots. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.2462-2470, 1990.
- VAN PEER, R.; SCHIPPERS, B. Lipopolysaccharides of plant growth promoting *Pseudomonas* sp. strain wes417r induce resistance in carnation to *Fusarium* wilt. **Netherland Journal of Plant Pathology**. v.98, p.129-139, 1992.
- VENKATESWARLU, K.; SETHUNATAN, N. Degradation of carbofuran by *Azospirillum lipoferum* and *Streptomyces* spp. isolated from floted aluvial soil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v.33, p.556-560, 1984.
- WALKER, A. Further observations on the enhanced degradation of iprodione and vinclozolin in soil. **Pesticide Science**, v.21, p.219-231, 1987.
- WALLNÖFFER, P.R.; BADER. The decomposition of urea herbicide by *Bacillus sphaericus*, isolated from soil. **Weed Research**, v.9, p.333, 1969.
- WALTON, B.T.; ANDERSON, T.A. Microbial degradation of trichloroethylene in the rhizosphere: potencial application to biological remediation of waste sides. **Applied Environmental Microbiology**. p.1012-1016, 1990.
- WANG, T.L.; WOOD, E.A.; BREWING, N.J. Growth regulators, *Rhizobium* and nodulation in peas: the cytokinin content of a wild typoe and a ti-plasmid-containing strain of *R. leguminosarum*. **Planta**. v.155, p.350-355., 1982.
- WEI, G.; KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by selected strains of plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**. v.81, p.1508-1512, 1991a.
- WEI, G.; KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S. Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under field conditions. **Phytopathology**. v.86, p.221-224, 1996.
- WELLER, D.M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopathology**. v.26, p.379-407, 1988.
- WELLER, D.M.; COOK, R.J. Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads. **Phytopathology**. v.73, p.463-469, 1983.
- WOLTZ, S.S. Nonparasitic plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**. v.16, p.403-430, 1978.
- XU, G.W.; GROSS, D.C. Selection of fluorescent pseudomonads antagonistic to *Erwinia carotovora* and suppressive of potato seed piece decay. **Phytopathology**. v.76, p.414-422, 1986.
- YAHALON, E.; OKON, Y.; DOVRAT, A. *Azospirillum* effects on susceptibility to *Rhizobium* nodulation and on nitrogen fixation of several forage legumes. **Canadian Journal of Microbiology**. v.33, p.510-514, 1987.
- YARDEN, O.; KATAN, J.; AHARONSON, N.; BEN-YEPHET, Y. Delayed and enhanced degradation of benomyl and carbendazim in desinfested and fungicide treated soil. **Phytopathology**. v.75, p.763-767, 1985.
- YOU, I.S.; BARTHA, R. Metabolism of 3,4-dicloroaniline by *Pseudomonas putida*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v.30, p.330, 1991.
- ZDOR, R.E.; ANDERSON, A.J. Influence of root colonizing bacteria on the defense responses of bean. **Plant and Soil**. v.140, p.99-107, 1992.
- ZEYER, J.; BARTHA, R. Accelerated mineralization of two organophosphate insecticides diazinon, parathion in the rhizosphere of the bush bean plant. **Applied and Environmental Microbiology**, v.37, p.36-41, 1979.

4

MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS

João Lúcio Azevedo

Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Goiás, UFGO, Campus Samambaia
CEP 74001-970, Goiânia, GO

INTRODUÇÃO

Microrganismos endofíticos são principalmente fungos e bactérias que vivem no interior das plantas, habitando, de modo geral, suas partes aéreas, como folhas e caules, sem causar aparentemente nenhum dano a seus hospedeiros. Portanto, eles se diferenciam dos microrganismos fitopatogênicos, que são prejudiciais às plantas, causando-lhes doenças. São também distintos dos microrganismos epifíticos, que vivem na superfície dos órgãos e tecidos vegetais. Evidentemente, essas distinções têm finalidades apenas didáticas, havendo sobreposição entre esses grupos de microrganismos. Assim, um endófito, que vive no interior de uma planta de acordo com as condições do ambiente e o próprio estado fisiológico do hospedeiro, pode ser considerado um patógeno latente. De fato, há duas maneiras de se estudar um microrganismo endofítico, conforme o enfoque seja patológico ou ecológico. Na primeira, microrganismos são inoculados em plantas ou partes vegetais para verificar se eles produzem doenças, muitas vezes sem a preocupação de preservar as condições naturais em que a planta vive, ou seja, favorecendo o microrganismo. O enfoque ecológico está muito

mais relacionado com as interações planta-microrganismo em condições naturais como um ecossistema tendendo ao equilíbrio. Nessas condições, um microrganismo endofítico, do ponto de vista ecológico, pode ser também considerado patogênico. Também um microrganismo epifítico pode eventualmente alojar-se no interior de um tecido vegetal e nesse caso ser erroneamente considerado como endofítico. Microrganismos endofíticos também podem ser encontrados não apenas nas partes aéreas vegetais mas inclusive em raízes, que são, aliás, uma das principais portas de entrada dos mesmos. A distinção, no caso, é feita apenas para não incluir as bactérias fixadoras de nitrogênio entre os endófitos, que vivem em simbiose com as plantas formando nódulos nas mesmas, e também os fungos micorrízicos. Eles são microrganismos endofíticos, mas constituem grupos muito mais estudados que os outros que habitam principalmente as partes aéreas das plantas. A respeito destes, as pesquisas ainda são poucas, comparadas com as existentes sobre micorrizas e bactérias, como por exemplo em *Rhizobium*. No presente capítulo não serão abordados fungos micorrízicos que vivem em associação com raízes de plantas e bactérias fixadoras de nitrogênio que formam nódulos em seus hospedeiros.

DESCOBERTA E CRESCENTE IMPORTÂNCIA DOS MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS

Microrganismos endófitos foram mencionados pela primeira vez no início do século XIX, mas foi Bary (1866) quem primeiro delineou uma possível distinção entre eles e patógenos de plantas. Definidos como assintomáticos, não produzindo, portanto, efeitos benéficos ou prejudiciais aos seus hospedeiros, permaneceram praticamente esquecidos até o final dos anos 70, quando, por uma série de motivos, começaram a chamar atenção. Nessa época verificou-se que, longe de serem meros habitantes do interior de vegetais, possuíam propriedades de interesse, como por exemplo conferir proteção contra insetos-pragas, outros microrganismos patogênicos e inclusive contra herbívoros. Atualmente, sabe-se que endófitos podem produzir toxinas, antibióticos e outros fármacos, fatores de crescimento e muitos produtos de potencial interesse biotecnológico, além de exercerem outras funções de importância para a sobrevivência do hospedeiro.

INSTALAÇÃO DE UM MICROORGANISMO ENDOFÍTICO NO HOSPEDEIRO

Em geral, microrganismos endofíticos adentram as plantas por aberturas naturais e feridas. Uma das portas de entrada mais utilizadas pelos endófitos são as raízes; a emergência de raízes secundárias laterais sempre é acompanhada por uma “ferida”, que serve de entrada para os microrganismos. O próprio crescimento das raízes, penetrando no solo, gera abrasões que facilitam a entrada de germes. Outras portas de entrada são aberturas naturais como estômatos e hidatódios, aberturas causadas por insetos e até por estruturas de fungos patogênicos, como os apressórios. Eles podem também ser encontrados dentro de estruturas fúngicas. Esse é o caso constatado por Paula *et al.* (1991), que identificaram um fungo micorrízico, o *Glomus clarum*, contendo a bactéria endofítica *Acetobacter diazotrophicus* no seu interior. Especialmente em plantas perenes, podem ser causadas feridas como as que fatalmente ocorrem, por exemplo, na época da colheita de frutos. Elas constituem pontos de penetração de endófitos. Também pode ocorrer entrada ativa de endófitos pela produção de enzimas ou estruturas que facilitam a penetração dos microrganismos. No caso de bactérias endofíticas, como as fixadoras de nitrogênio, penetram via raízes laterais emergentes ou pela região apical meristemática da raiz. Outras podem entrar via estômatos (Döbereiner *et al.*, 1993). Há, em seguida, movimento dos microrganismos dentro da planta, atingindo os diversos órgãos e tecidos. Alguns microrganismos endofíticos são transmitidos via semente. Em plantas com propagação vegetativa, eles passam de uma para outra através das estruturas utilizadas nessa propagação. Para mais detalhes sobre o assunto, consultar Sprent & James (1995).

ISOLAMENTO DE MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS

Embora microrganismos endofíticos possam ser detectados no interior de tecidos vegetais por meio de microscopia ótica ou eletrônica (Bernstein & Carroll, 1977), seu isolamento envolve cuidados especiais para que sejam excluídos os microrganismos que vivem na superfície do hospedeiro, ou seja, os epífitos. Um dos processos mais comuns de

isolamento vem a ser a lavagem de folhas, caules e outros órgãos vegetais em estudo com etanol 70%, seguido de tratamento com hipoclorito de sódio 3% e novamente tratamento com etanol ou água esterilizada. Os tempos de tratamento e a própria concentração de hipoclorito de sódio podem variar de acordo com a textura do material a ser utilizado. Testes preliminares têm que ser feitos para determinação dos tempos ideais de tratamento, que eliminem microrganismos epifíticos sem destruir os endófitos (Pereira, 1993; Pereira *et al.*, 1993; Schultz *et al.*, 1993; Fisher *et al.*, 1995). Para testes mais quantitativos, que dão uma idéia do número de microrganismos endofíticos no interior de um determinado tecido vegetal, podem ser feitas suspensões aquosas ou em solução salina, a partir de tecidos previamente tratados e esmagados. Pode-se ter assim uma estimativa do número de microrganismos por grama de tecido vegetal. O isolamento pode também ser feito a partir de seiva vegetal coletada assepticamente.

A próxima etapa no isolamento vem a ser a transferência dos fragmentos ou suspensões de células para meios apropriados. Para o isolamento de fungos podem ser usadas placas de Petri com meios de cultura como o sabouraud, batata-dextrose-ágar ou outros, quase sempre adicionados de antibióticos para impedir o crescimento de bactérias. Para o isolamento de bactérias são usados meios como o ágar nutriente, o LB e outros, em geral contendo fungicidas para impedir o desenvolvimento de fungos. Quando é desejável o isolamento de um grupo bem definido de microrganismos, tais como bactérias fixadoras de nitrogênio, actinomicetos e muitos outros, podem ser usados meios altamente seletivos, que permitam somente o crescimento do grupo ou até mesmo de apenas uma determinada espécie que se queira isolar (Paula *et al.*, 1993).

As placas de Petri com meio de cultura e o material contendo os endófitos são então incubadas. A temperatura e o tempo de incubação variam de acordo com as finalidades e o tipo de microrganismos endofíticos que estão sendo pesquisados. Em um meio não seletivo, um tempo de incubação muito pequeno não permitirá a emergência de microrganismos de crescimento lento. Por outro lado, um tempo excessivo poderá permitir grande crescimento de microrganismos mais agressivos, que mascararão aqueles de crescimento mais demorado e circunscrito a uma pequena área no meio de cultura. Há ainda a conside-

rar que certos microrganismos endofíticos crescem mal ou mesmo não crescem na ausência do hospedeiro ou de partes dele. Tudo isso dificulta o processo de isolamento de endofíticos, e em cada caso são necessárias a criatividade e a imaginação do pesquisador para que os resultados obtidos sejam favoráveis.

Finalmente, há necessidade de uma meticulosa purificação dos microrganismos isolados, seguida de estocagem por meio de processo apropriado de preservação entre os vários disponíveis (Azevedo, 1991). Com isso será possível sua posterior classificação.

Outros pontos importantes a considerar no isolamento de endófitos são a idade da planta e dos órgãos utilizados, o local e principalmente a época da coleta. Tudo isso pode ter influência no número e tipos de microrganismos isolados. Também há necessidade de várias coletas e repetições para distinguir os reais endófitos daqueles microrganismos epifíticos que eventualmente possam ser isolados e até mesmo contaminantes. É a recorrência de uma espécie de microrganismo isolado que revela seu verdadeiro estado endofítico.

OCORRÊNCIA DE MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS

Provavelmente todas as plantas possuem microrganismos endofíticos. Uma mesma planta pode albergar vários deles, incluindo fungos e bactérias. Em geral, existem espécies bastante frequentes em um determinado hospedeiro. São chamadas de espécies dominantes, em contraposição a outras mais raras, que são as secundárias. Existe um certo grau de especificidade endófito-hospedeiro. Assim, em *Citrus* são encontrados poucos fungos, quando comparamos com o número de espécies e gêneros encontrados em, por exemplo, *Stylosanthes* e *Musa* (Pereira, 1993; Pereira *et al.*, 1993; Araújo & Azevedo, 1995; Glienke, 1995; Glienke *et al.*, 1995). A Tabela 1 dá uma idéia dos principais fungos encontrados em quatro espécies vegetais estudadas em nosso laboratório. Por outro lado, há espécies microbianas de ocorrência mais geral, isoladas de muitos hospedeiros, como pode ser visto nas revisões de Isaac (1992) em fungos e de Di Fiore & Del Gallo (1995) em bactérias. A Tabela 2 apresenta as bactérias mais comumente encontradas no interior de plantas.

TABELA 1. Fungos endofíticos mais frequentemente isolados de quatro espécies de plantas no estado de São Paulo, Brasil (os números representam porcentagem de fragmentos analisados contendo o fungo).

TAXON	STYLOSANTHES (1)	BANANEIRA (2)	MILHO (3)	TANGERINAS (4)
<i>Alternaria</i> sp.	1,4	0,08	0,0	0,0
<i>Aspergillus</i> sp.	0,0	0,08	1,0	0,0
<i>Cordana musa</i>	0,0	5,2	0,0	0,0
<i>Curvularia</i> sp.	0,0	0,4	0,03	0,0
<i>Dreschlera</i> sp.	0,0	0,9	0,1	0,0
<i>Epicoccum purpuracens</i>	0,0	1,4	0,0	0,0
<i>Fusarium</i> sp.	0,0	0,6	6,3	0,0
<i>Glomerella cingulada</i>	15,4	5,8	0,3	0,0
<i>Glomerella</i> sp.	1,7	0,0	0,0	56,5
<i>Humicola</i> sp.	0,0	0,04	0,04	0,0
<i>Nigrospora oryzae</i>	1,7	2,6	0,01	0,0
<i>Nodulisporium</i> sp.	0,08	0,0	0,0	0,0
<i>Penicillium</i> spp.	0,0	0,0	1,0	0,0
<i>Periconia</i> sp.	0,9	0,2	0,01	0,0
<i>Phomopsis</i> sp.	0,3	0,3	0,04	0,0
<i>Phylosicla</i> sp.	0,4	1,2	0,0	27,0
<i>Rhizopus</i> sp.	0,0	0,0	0,3	0,0
<i>S. poromiellae minima</i>	1,1	1,0	0,0	0,0
<i>Syncephalastrum</i> sp.	0,0	0,0	0,03	0,0
<i>Trichoderma</i> sp.	0,0	0,04	0,18	0,0
<i>Xylaria</i> spp.	6,3	7,2	0,0	0,0
Outros	8,3	3,7	3,0	11,8

TABELA 2. Bactérias endofíticas encontradas em diversas espécies vegetais (modificado e ampliado de Di Fiore & Del Gallo, 1995).

HOSPEDEIRO	BACTÉRIAS ENCONTRADAS
Abeto (<i>Picea glauca</i>)	<i>Pseudomonas putida</i> , <i>Staphylococcus hominis</i>
Alfafa (<i>Medicago sativa</i>)	<i>Pseudomonas corrugata</i>
Algodão (<i>Gossypium hirsutum</i>)	<i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Agrobacterium radiobacter</i> , <i>Arthrobacter</i> spp., <i>Aureobacterium barkeri</i> , <i>A. saperdae</i> , <i>Bacillus brevis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>Bacillus</i> spp., <i>Brevibacterium</i> spp., <i>Burkholderia solanacearum</i> , <i>Cellulomonas</i> spp., <i>Citrobacter testaceum</i> , <i>Clavibacter</i> spp., <i>Curtobacterium</i> spp., <i>Erwinia</i> spp., <i>Flavobacterium</i> spp., <i>Hydrogenophaga flava</i> , <i>H. pseudoflava</i> , <i>Kluyvera</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Listeria innocua</i> , <i>Methylobacterium</i> spp., <i>Micrococcus</i> spp., <i>Morganella</i> spp., <i>Phyllobacterium</i> spp., <i>Providencia alcalifaciens</i> , <i>Rhotia</i> spp., <i>Salmonella</i> spp., <i>Serratia</i> spp., <i>Shigella</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp., <i>Xanthomonas</i> spp., <i>Yersinia</i> spp.
Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	<i>Azoarcus</i> spp.
<i>Azolla</i> spp.	<i>Arthrobacter globiformis</i>
Batata (<i>Solanum tuberosum</i>)	<i>Agrobacterium</i> spp., <i>Bacillus megaterium</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. sphaericus</i> , <i>Bacillus</i> spp., <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Flavobacterium</i> spp., <i>Klebsiella aerogenes</i> , <i>K. ozaene</i> , <i>Micrococcus</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Xanthomonas</i> spp.
Batata-doce (<i>Ipomea batatas</i>)	<i>Acetobacter diazotrophicus</i>
Beterraba (<i>Beta vulgaris</i>)	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Corynebacterium sepedonicum</i> , <i>Corynebacterium</i> spp., <i>Erwinia herbicola</i> , <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>Xanthomonas</i> spp.
Cana-de-açúcar (<i>Saccharum officinarum</i>)	<i>Acetobacter diazotrophicus</i>
Carvalho (<i>Quercus</i> spp.)	<i>Bacillus</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp.
Feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	<i>Enterobacter asburiae</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i>
Gramíneas (várias)	<i>Acetobacter diazotrophicus</i> , <i>Azoarcus</i> spp., <i>Azospirillum</i> spp., <i>Clavibacter xyly</i> , <i>Herbaspirillum seropedicae</i>

HOSPEDEIRO

BACTÉRIAS ENCONTRADAS

Milho comum e doce
(*Zea mays*)

Alcaligenes spp., *Arthrobacter* spp.,
Aurobacterium barkeri, *A. sapedae*,
Bacillus cereus, *Bacillus* spp. (1),
Brevibacterium spp., *Burkholderia picketii*,
Citrobacter testaceum, *Curtobacterium* spp.,
Enterobacter agglomerans, *E. cloacae*, *Erwinia* spp.,
Flavinomonas oryzihabitans, *Flavobacterium* spp.,
Hydrogenophaga flava, *H. pseudoflava*,
Klebsiella terrigena, *Kluyviera* spp.,
Lactobacillus spp., *Mathylobacterium* spp.,
Microbacterium imperiale, *Microbispora* spp. (3),
Micrococcus spp. (1), *Moraxella* spp.,
Morganella spp., *Ochrobactrum anthropi*,
Phyllobacterium spp., *Pseudomonas corrugata*,
P. fluorescens, *P. marginalis*, *P. viridoflava*,
Pseudomonas spp., *Rhotia* spp., *Salmonella* spp.,
Serratia marcescens, *Shigella* spp.,
Streptomyces spp. (3), *Streptosporangium* spp. (3),
Staphylococcus spp., *Vibrio* spp., *Xanthobacter* spp.

Olmo (*Ulmus americana*)

Methanobacterium spp.

Pepino (*Cucumis sativus*)

Citrobacter spp., *Enterobacter cloacae*,
Erwinia carotovora, *Erwinia* spp., *Proteus mirabilis*

Plantas cítricas (*Citrus* spp.)

Achromobacter spp., *Alcaligenes* spp (2),
Arthrobacter spp., *Bacillus cereus* (2),
B. megaterium (2), *B. lentus* (2), *B. pumilus* (2),
Bacillus spp. (2), *Burkholderia cepacia*,
Citrobacter freundii, *Corynebacterium* spp.,
Enterobacter aerogenes, *E. cloacae*,
E. sakazakii, *Erwinia herbicola* (2),
Flavobacterium spp., *Lactobacillus* spp.,
Providencia spp., *Pseudomonas aeruginosa*,
P. putida, *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp.,
Serratia liquefaciens, *Shigella* spp., *Yersinia* spp.

Populus deltoides

Methanobacterium spp.

Salgueiro (*Salix nigra*)

Methanobacterium spp.

Tomate (*Lycopersicum
esculentum*)

Pseudomonas fluorescens, *P. putida*,
Pseudomonas spp.

Trigo (*Triticum* spp.)

Pseudomonas fluorescens

*Para referências bibliográficas ver Di Fiore & Del Gallo, 1995. Ver também Souza, 1996; Araújo, 1996; Silva *et al.*, 1995, nas bactérias assinaladas respectivamente com os números 1, 2 e 3.

EFEITOS DOS MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS EM SEUS HOSPEDEIROS

Apesar de haverem sido inicialmente descritos como assintomáticos, e muitos dos endófitos isolados até o momento não terem efeitos conhecidos sobre seus hospedeiros vegetais, vários deles já demonstraram ter uma função bem determinada nas plantas que os albergam. Assim, alguns possuem capacidade de modificar morfológicamente os tecidos do hospedeiro, outros acarretam modificações fisiológicas e outros, como já mencionado, protegem as plantas contra o ataque de insetos ou patógenos. Serão apresentados, a seguir, exemplos de endófitos que interagem com seus hospedeiros, produzindo efeitos que vão desde proteção da planta contra predadores e patógenos até inibição na formação de estruturas reprodutivas na mesma.

ENDÓFITOS E CONTROLE BIOLÓGICO DE INSETOS

Vários casos de controle biológico natural de insetos por meio de microrganismos endofíticos têm sido relatados. Por exemplo, *Rhizoctonia parkeri*, um fungo endofítico isolado de pinheiros, infecta também as galhas formadas na planta pelo inseto-praga da mesma, pertencente ao gênero *Contarinia*. Isso ocasiona mortalidade das larvas que habitam o interior das galhas, provavelmente devido à produção de uma toxina pelo fungo. Mesmo fungos entomopatogênicos bastante conhecidos e já largamente empregados no controle biológico de insetos-pragas da agricultura são encontrados como endófitos. Esse é o caso de *Beauveria bassiana*, encontrado como endófito no milho, protegendo o hospedeiro contra o ataque de insetos (Bing & Lewis, 1993). Muitos outros casos são relatados, como pode ser apreciado na revisão de Breen (1994).

Em certas gramíneas, a presença de fungos endofíticos reduz o ataque de insetos, como *Spodoptera frugiperda* e *S. eridana* (Breen, 1993). Nesse caso, é interessante o fato de *S. frugiperda* discriminar plantas infectadas por fungos endofíticos do gênero *Acremonium*. Não sendo atacadas por insetos, essas plantas tornam-se mais vigorosas e, conseqüentemente, resistem mais ao ataque de doenças e são selecionadas. Essa é uma maneira de seleção de determinados endófitos dentro de plantas (Clay *et al.*, 1993). Também em algumas plantas de clima temperado, como os olmeiros, coleópteros transmitem certas doenças, como a causada pelo fungo

Ceratocystis ulmi. Na presença do fungo endofítico *Phomopsis oblonga*, as árvores são menos afetadas pela doença graças à proteção que o fungo endofítico proporciona, por diminuição do ataque dos insetos. Casos específicos de proteção direta contra doenças de plantas, proporcionados por microrganismos endofíticos, serão vistos no próximo seguinte.

ENDÓFITOS E CONTROLE DE FITOPATÓGENOS

A produção de certos compostos como os antibióticos (Fisher *et al.*, 1986) e outros metabólitos, por microrganismos endofíticos, já sugeria que eles podem controlar doenças de plantas. De fato, *Acremonium coenophialum*, um endófito comumente encontrado em gramíneas, tem efeitos inibitórios sobre vários patógenos (White & Cole, 1985). Tomateiros contendo o fungo endofítico *Acremonium kilense* também apresentam maior proteção contra patógenos, como *Fusarium oxysporum* e *Clavibacter michiganense*. Bactérias do gênero *Erwinia* ocorrem no interior de plantas de soja e produzem metabólitos que protegem a planta contra a “queima bacteriana da soja”, causada por *Pseudomonas syringae* *pv. glycinea* (Voltsch *et al.*, 1992). O patógeno de *Pinus* *Gremmeniella abietina* também é controlado por endófitos que reduzem ou até suprimem seu crescimento. Interessante, nesse caso, é a redução da população de endófitos em solos com alto teor de níquel, o que ocasiona maior incidência da doença nesses solos (Ranta *et al.*, 1994).

Em alguns casos, nematóides podem ser controlados por endófitos. O *Fusarium oxysporum* de tomateiro pode ocorrer tanto como endófito quanto como patógeno, dependendo das condições e possivelmente da presença de certas raças fisiológicas. De qualquer forma, ele produz metabólitos contra o nematóide *Meloidogyne incognita*. Além disso, inibe, pelo menos *in vitro*, outros fungos patogênicos, como *Phytophthora ultimum* e *Rhizoctonia solani* (Hallman & Sikora, 1996).

EFEITOS DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS SOBRE HERBÍVOROS

Descobriu-se que toxicoses induzidas em herbívoros domésticos, por ingestão de certas plantas, estão relacionadas com microrganismos endofíticos, principalmente fungos. Gado alimentando-se de certas gramíneas

fORAGEIRAS contendo endófitos desenvolvem certos sintomas, tais como diminuição de peso, aumento de temperatura do corpo e gangrena, que podem levar os animais à morte. Na Nova Zelândia há relatos de casos de intoxicação em carneiros alimentados com a planta *Lolium perenne* contendo fungos endofíticos, que produzem alcalóides, com a ocorrência de espasmos musculares e perda de capacidade de manter-se em pé. Muitos outros casos são citados na literatura, inclusive relatos de fungos endofíticos, como o *A. coenophialum* que, produzindo alcalóides, protegem os hospedeiros contra herbivoria, facilitando a dispersão de suas sementes, como ocorre em *Festuca arundinacea* (Knoch *et al.*, 1993)

EFEITOS FISIOLÓGICOS, MORFOLÓGICOS E PRODUÇÃO DE METABÓLITOS POR ENDÓFITOS

Várias modificações fisiológicas em plantas foram relacionadas com a presença de microrganismos que habitam seu interior. Alguns endófitos associados a folhas e pecíolos têm alta produção de enzimas, como celulasas e ligninases. Esses fungos, principalmente os pertencentes ao gênero *Xylaria*, podem iniciar o processo de queda das folhas atuando por degradação da celulose e lignina, após a morte do tecido (Carroll & Carroll, 1978). Em gramíneas, endófitos podem inibir a reprodução da planta hospedeira, pois sua presença dentro dos óvulos produz esterilidade. Outros fungos endofíticos, como o *Epicoccum purpuraceus*, aumentam o poder germinativo das sementes que os contêm. Há ainda vários relatos de fungos endofíticos produzindo fatores de crescimento como o *Fusarium moniliforme* que produz giberelina, ocasionando, inclusive, modificações morfológicas teratogênicas nas plantas hospedeiras. Outros endófitos, como as bactérias, produzem antibióticos, fatores de crescimento, como o ácido indol-acético (IAA) (Fuentes-Ramirez *et al.*, 1993) e metabólitos de utilidade ou potencialmente úteis. Embora não totalmente confirmado, o taxol, um diterpenóide produzido pela planta *Taxus brevifolia* e largamente utilizado no tratamento do câncer mamário e de útero, é também produzido por um fungo endofítico, o *Taxomyces andreanae* encontrado dentro de *T. brevifolia* (Stierle *et al.*, 1993). É interessante notar que alguns compostos de origem vegetal também são produzidos por fungos que habitam esses vegetais. É o caso de hormônios de crescimento e o próprio taxol. Tudo parece indi-

car uma transposição de genes entre plantas e fungos em uma verdadeira engenharia genética *in vivo*. Se esses e outros casos forem confirmados, ficará evidente que vegetais e fungos transgênicos podem ocorrer naturalmente pela transferência de genes entre espécies pertencentes a diferentes reinos.

Além dos já citados, outros efeitos de microrganismos endofíticos em plantas cultivadas são de grande importância na agricultura. Alguns fungos endofíticos aumentam a tolerância de plantas à seca, enquanto outros promovem a fixação não simbiótica do nitrogênio atmosférico. Nesse particular, trabalhos em cana-de-açúcar (Döbereiner, 1992) demonstram que endófitos, como *Acetobacter diazotrophicus*, além de outras bactérias, geram um aumento de produção sem elevar custos com o emprego de insumos como adubos nitrogenados. Uma excelente revisão sobre a ocorrência de bactérias endofíticas diazotróficas em não leguminosas é a de Döbereiner *et al.* (1995). Há também efeitos negativos de endófitos sobre as plantas, como aqueles causados pela redução de infecções micorrízicas ou ao menos potencialmente pela redução de bactérias fixadoras de nitrogênio.

ENDÓFITOS COMO PATÓGENOS DE PLANTAS

Como mencionado na introdução, é difícil estabelecer um limite definido entre microrganismos endofíticos e patogênicos. Muitos endófitos são relacionados com patógenos, e pode ser, inclusive, levantada a hipótese de que todos os patógenos tenham sido derivados de endófitos e vice-versa. Muitos endófitos estão intimamente relacionados com patógenos, como o caso do fungo endofítico *R. parkeri*, isolado de crucíferas e relacionado com outros fungos desse gênero e patógenos do mesmo hospedeiro. Vários patógenos de plantas de clima temperado e tropical, estas últimas estudadas no Brasil, como *Stylosanthes*, bananeira e plantas cítricas, estão presentes em plantas aparentemente saudáveis (Pereira *et al.*, 1993; Glienke, 1995; Glienke *et al.*, 1995). Foi detectada também uma modificação genética em *Colletotrichum magna*, que normalmente causa antracnose em cucurbitáceas, resultando em um endófito que não produz nenhum efeito patogênico no hospedeiro mas, ao contrário, o protege contra fungos fitopatogênicos como *Fusarium* e o próprio *C. magna* (Freeman & Rodrigues, 1993). Certos endófitos, que não

causam sintomas em determinado hospedeiro, podem ser patógenos para outros. Mais detalhes são encontrados em outras revisões sobre o assunto, em fungos (Azevedo, 1996) e em bactérias (Di Fiore & Del Gallo, 1995; Sprent & James, 1995).

ENDÓFITOS EM CULTURAS DE TECIDOS VEGETAIS

Contaminações que ocorrem frequentemente em culturas de tecidos vegetais podem ser consequência não da ineficiência da técnica ou descuido do manipulador, mas sim da presença de microrganismos endofíticos. É certo que muitas culturas vegetais derivadas de pequenos segmentos da planta resultam em plantas axênicas, isto é, sem microrganismos no seu interior. Essas plantas, muitas vezes livres de microrganismos prejudiciais, como vírus, podem ter sua produção melhorada posteriormente em campo. Exemplo típico é o que ocorre em plantas de moranguinho que, derivadas de cultura de tecidos e livres de vírus, apresentam incremento na produção. Por outro lado, a limpeza de endófitos pode levar a perdas em vigor e surgimento de outros efeitos colaterais em plantas derivadas de cultura de tecidos. Principalmente se essas plantas axênicas são levadas a locais onde os endófitos não forem encontrados, prejuízos poderão advir pela eliminação de microrganismos úteis, que protegem as plantas contra pragas e patógenos, além de causar outros efeitos favoráveis.

VARIABILIDADE EM MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS

Tem-se conhecimento de que microrganismos endofíticos existem em praticamente todas as plantas, e também se sabe que ocorrem variações dentro das espécies, inclusive tornando-as patogênicas ou não (ver item anterior). Entretanto, não existem ainda muitas informações sobre a variabilidade dentro de espécies ou gêneros que ocorrem no interior de uma mesma planta, em seus diferentes órgãos ou tecidos, ou entre endófitos isolados da mesma espécie vegetal, porém em diferentes épocas do ano ou locais distintos. Sabe-se que a variação fenotípica é comum entre isolados de uma mesma espécie de fungo (Fig. 1).

A verificação da extensão dessa variabilidade genética torna-se importante para futuros estudos, inclusive de genética e melhoramento genéti-

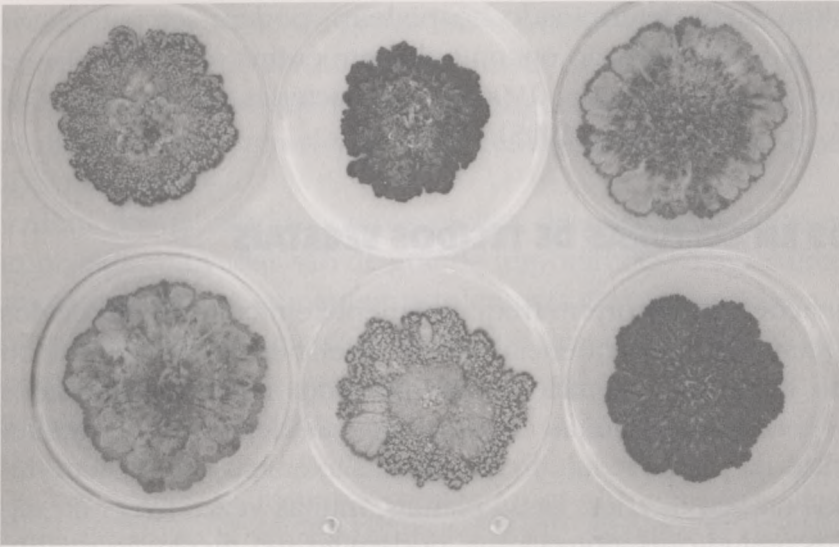


FIGURA 1. Variabilidade fenotípica observada em isolados do fungo *Guignardia citricarpa*, forma teleomorfa de *Phyllosticta*, obtidos de plantas cítricas (tangerinas) (Glienke, 1995).

co em microrganismos endofíticos. Atualmente, além da morfologia e de técnicas já tradicionais, como a eletroforese isoenzimática, existem outras, conhecidas por siglas como RFLP, PCR e RAPD (ver capítulo 8 sobre aplicações da PCR, nesta mesma publicação), que permitem um estudo mais detalhado da variabilidade existente dentro e entre espécies. Em fungos endofíticos já foram feitos diversos estudos, estimando-se a variabilidade existente em *Xylaria*, por exemplo, utilizando-se eletroforese isoenzimática (Brunner & Petrini, 1992). Com técnicas mais modernas de análise direta do DNA, estudos já foram feitos em *R. parkeri* por RAPD (McCutcheon *et al.*, 1993), onde foi encontrada maior variabilidade genética em fungos coletados em folhas maduras, em comparação com uma menor variabilidade achada em fungos provenientes de folhas jovens. Wilson *et al.* (1994) estudaram via RFLP o endófito *Leptostroma*, anamorfo de *Lophodermium pinastri*, em *Pinus resinosa*, distinguindo entre os isolados 27 genótipos. Eletroforese em campo pulsado foi também usada para detectar variabilidade em isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* de *Stylosanthes*, na Austrália. Verificou-se, no caso, a ocorrência de minicromossomos que, presume-se, têm um papel na patogenicidade da espécie (Masel *et al.*, 1992). Nos laboratórios do Setor de Genética de Microrganismos do departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, em Piracicaba,

estudos têm sido realizados sobre variabilidade genética por meio da RAPD em endófitos derivados de bananeira, milho e plantas cítricas utilizando tanto fungos como bactérias (Fig. 2).

Além da técnica de RAPD, também foram utilizadas técnicas de eletroforese em campo pulsado (Fig. 3) e perfil plasmidial, esse último, de amostras bacterianas como mostra a Fig. 4.

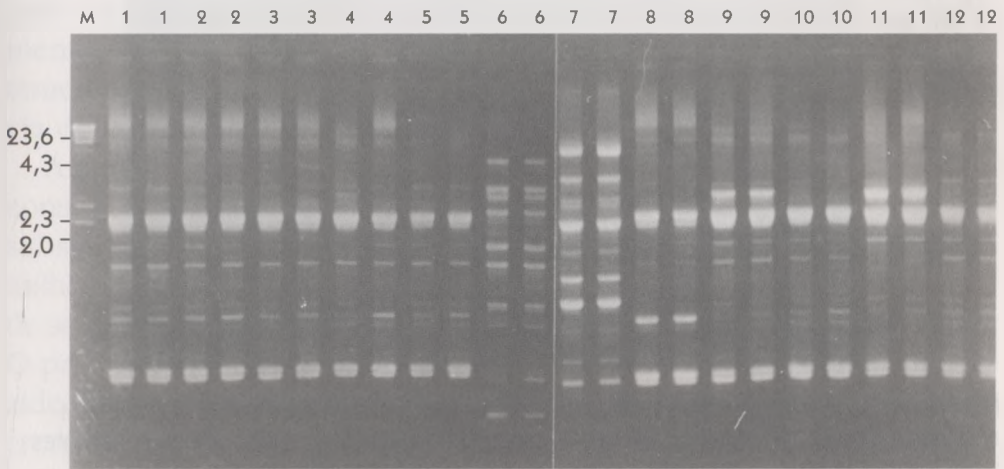


FIGURA 2. Variabilidade genética em isolados de *Guignardia citricarpa*, provenientes de plantas cítricas, detectada pela técnica de RAPD. A reação de amplificação utilizou o oligonucleotídeo OPX6. Os números de 1 a 12 referem-se a diferentes isolados do fungo (em duplicata). M é o marcador de peso molecular (Glienke, 1995).

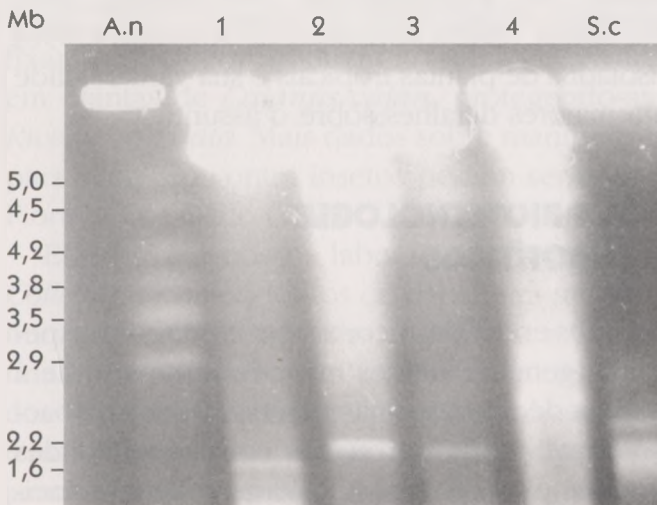


FIGURA 3. Variabilidade cariotípica em *Colletotrichum musae* detectada pela técnica de eletroforese em campo pulsado. Diferentes isolados do fungo (1,2,3,4) mostram uma variação no número e tamanho dos seus cromossomos. A.n é o controle (cromossomos do fungo *Aspergillus nidulans* que possui 8 cromossomos e 6 bandas visíveis), Mb é o peso molecular em mega-bases.

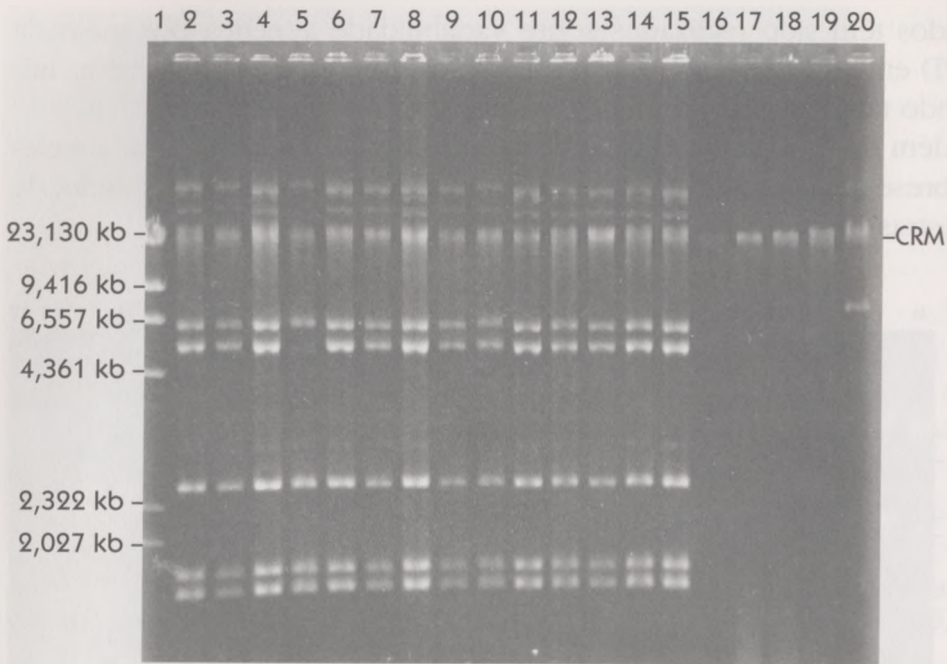


FIGURA 4. Bandas plasmidiais detectadas em isolados de *Erwinia herbicola*, bactéria endofítica isolada de plantas cítricas. As canaletas de 2 a 15 correspondem a diferentes isolados da bactéria. A canaleta 1 corresponde ao marcador de peso molecular. Bactérias endofíticas também isoladas de milho correspondem às canaletas 16 (*Alcaligenes* sp.), 17, 18, 20 (*Pseudomonas* spp.) e 19 (*Bacillus* sp.). CRM corresponde ao DNA cromossômico (Araújo, 1996).

Em muitos casos houve indicação de alta variabilidade dentro e entre espécies de endófitos (Glienke, 1995; Pamphile *et al.*, 1995; Ribeiro, 1995; Araújo, 1996; Longo, 1996; Souza, 1996). A revisão de Azevedo (1996) sobre fungos endofíticos isolados de plantas tropicais e sua variabilidade poderá ser consultada para maiores detalhes sobre o assunto.

MANIPULAÇÃO GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA EM MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS

Uma vez que microrganismos endofíticos coexistem com seus hospedeiros, qualquer modificação genética nesses microrganismos poderá introduzir novas características de interesse nas plantas. Genes da bactéria *Bacillus thuringiensis*, que produz proteínas com propriedades inseticidas já foram transferidos para plantas. Resultaram, dessa manei-

ra, plantas transgênicas com resistência a determinados insetos. Entretanto, o processo traz problemas metodológicos que ainda precisam ser solucionados, como os de biossegurança e de rápida emergência de resistência nos insetos-pragas. A modificação, por tecnologia do DNA recombinante, de um microrganismo endofítico, introduzindo-se nele, por exemplo, o gene da proteína cristal de *B. thuringiensis*, é metodologicamente mais simples e reduzem-se os problemas de biossegurança, pois há espécies vegetais que não transmitem microrganismos via semente. A produção constante de microrganismos endofíticos, diferentemente modificados, também poderá reduzir o problema da emergência de formas resistentes de insetos.

A primeira tentativa de manipulação de um microrganismo endofítico consistiu na introdução do gene de *B. thuringiensis* em *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*, uma bactéria que habita o interior de plantas de milho. Essa bactéria modificada foi reintroduzida no milho, via inoculação de sementes, para o controle da broca do colmo do milho (Fahey, 1988). O produto, conhecido pelo nome geral de "incide", está sendo produzido por uma empresa de biotecnologia que vem desenvolvendo microrganismos modificados geneticamente para outras plantas, além do milho. Embora ainda existam problemas metodológicos a resolver, o produto, ao menos potencialmente, apresenta valor biotecnológico. Tester (1992) verificou que a bactéria assim modificada não sobrevive naturalmente fora da planta, o que torna o produto mais seguro. O gene de *B. thuringiensis* também foi usado em *Bradyrhizobium*, que produz fixação biológica do nitrogênio atmosférico em leguminosas (Nambiar *et al.*, 1990). O gene foi capaz de se expressar, e a bactéria, além de fixar N_2 , também produziu a toxina codificada pelo gene introduzido em plantas de *Cajanus cajan*, protegendo-as contra larvas do inseto *Rivelia angulata*. Mais dados sobre manipulação genética em endófitos para proteção contra insetos podem ser encontrados na revisão de Di Fiore & Del Gallo (1995).

Estudos em nossos laboratórios, primeiramente com linhagens de *Colletotrichum* endófitos de bananeira modificados geneticamente por mutação espontânea para resistência a fungicidas, revelaram que os mutantes inoculados em plantas axênicas derivadas de cultura de tecidos vegetais, em competição com linhagens selvagens, foram estáveis e mantiveram-se na planta por até 45 dias e, em alguns casos, sobrepujaram mesmo as linhagens selvagens sensíveis (Pereira, 1993; Azevedo,

1996). Por outro lado, linhagens do mesmo fungo, nas quais foi introduzido o gene de resistência ao fungicida benomil, via transformação por gene de fungo resistente ao benomil, não apresentaram tão alto grau de competitividade junto à linhagem selvagem, o que pode indicar que a manutenção de linhagens endofíticas engenheiradas em plantas pode se constituir em um problema, dificultando seu uso (Longo, 1996). A utilização desses microrganismos geneticamente modificados também pode ser problemática, se a concentração do produto que se quer introduzir na planta não atingir níveis adequados em todos os locais do vegetal onde ele deveria atuar, como, aliás, foi salientado anteriormente. No caso de *C. xyli*, já mencionado, houve uma perda do gene introduzido em cerca de 15% das linhagens no interior de plantas de milho, até o período da colheita (Turner *et al.*, 1991).

Talvez o principal uso de microrganismos endofíticos no futuro seja derivado não da manipulação genética por meio da tecnologia do DNA recombinante, mas sim da extração de compostos deles derivados, como metabólitos que podem ser empregados como fármacos e agroquímicos. Vários exemplos citados neste capítulo demonstram a sua potencialidade na produção de substâncias de valor biotecnológico.

CONCLUSÕES

Os microrganismos endofíticos, embora já descritos no século XIX, começaram a ser efetivamente estudados somente no final dos anos 70, primeiro timidamente e com interesse mais acadêmico. Nos últimos anos, entretanto, eles adquiriram grande importância. Verificou-se que não se tratam de simples espectadores dentro de seus hospedeiros, como eram considerados até então. Eles passaram a ser vistos como atores em importantes processos, por exemplo, protegendo a planta contra seus inimigos. Mais ainda, foram identificados como realizadores de funções de alto interesse agrônomo, como a fixação de nitrogênio atmosférico, produção de metabólitos úteis para a planta hospedeira, e outras, o que os colocou no mesmo nível de microrganismos como os fungos micorrízicos e as bactérias simbiotes, que também fixam N_2 atmosférico. Com a possibilidade de manipulação genética de microrganismos endofíticos e a alta variabilidade que hoje sabemos que ocorre, programas de melhoramento genético devem produzir resultados

que levem à sua utilização mais racional. Os métodos de melhoramento genético de plantas praticamente nunca consideraram os microrganismos endofíticos. Isso pode ocasionar alterações no equilíbrio interno entre endófitos e levar a respostas patogênicas, ou seja, muitos patógenos de plantas melhoradas geneticamente ou submetidas a condições artificiais de cultivo devem ser, na realidade, endófitos em desequilíbrio pelas condições artificiais a que foram submetidos seus hospedeiros. Isso é agravado pelo uso abusivo e, muitas vezes, indiscriminado de agroquímicos, que também podem reduzir ou eliminar certos microrganismos endofíticos essenciais para a manutenção de um estado de equilíbrio entre planta-endófito-ambiente. Também fica claro que a técnica de cultura de tecidos vegetais pode levar a desequilíbrios entre plantas e endófitos. Enfim, há um longo caminho a percorrer para que todas as interações entre microrganismos endofíticos e seus hospedeiros sejam bem entendidas e, mais ainda, aproveitadas com sucesso. Também parece ter ficado claro que apenas uma ínfima quantidade de endófitos é atualmente conhecida, especialmente em espécies vegetais de clima tropical. Pode-se esperar, portanto, que pesquisas com os microrganismos endofíticos devam levar a novas e surpreendentes descobertas de interesse.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, W.L. Isolamento, identificação e caracterização genética de bactérias endofíticas de porta-enxertos de citros. Piracicaba: ESALQ/USP, 1996. 85p. Dissertação de Mestrado.
- ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L. Isolamento e identificação de microrganismos endofíticos de 11 porta-enxertos de citros. In: REUNIÃO ANUAL DE GENÉTICA DE MICROORGANISMOS, 20., 1995, Piracicaba. **Resumos**. Piracicaba: ESALQ/USP, 1995. p.111.
- AZEVEDO, J.L. Melhoramento genético e preservação de fungos utilizados no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (coord.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991, p.237-251.
- AZEVEDO, J.L. Endophytic fungi and their roles mainly in tropical plants. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MICROBIAL ECOLOGY, 7., 1996, Santos. No prelo.
- BARY, A. **Morphologie und physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten**. Leipzig: Engelamn, 1866, 316p.
- BERNSTEIN, M.E.; CARROLL, G.C. Internal fungi in old-growth douglas fir foliage. **Canadian Journal of Botany**, v.55, p.644-653, 1977.
- BING, L.A.; LEWIS, L.C. Occurrence of the entomopathogen *Beauveria bassiana* (Balsanto) Vuillemin in different tillage regimes and in *Zea mays* L. and virulence towards *Ostrinia nubilalis* (Hübner). **Agriculture Ecosystems and Environment**, v.45, p.147-156, 1993.
- BREEN, J.P. Enhanced resistance to fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in *Acremonium* endophyte-infected turfgrasses. **Journal of Economic Entomology**, v.86, p.621-629, 1993.

- BREEN, J.P. *Acremonium* endophyte interactions with enhanced plant resistance to insects. **Annual Review of Entomology**, v.39, p.401-423, 1994.
- BRUNNER, F.; PETRINI, O. Taxonomy of some *Xylaria* spp. and xylariaceae endophytes by isozyme electrophoresis. **Mycological Research**, v.96, p.723-733, 1992.
- CLAY, K.; MARKS, S.; CHEPLICK, G.P. Effects of insect herbivory and fungal endophyte infection on competitive interactions among grasses. **Ecology**, v.74, p.1767-1777, 1993.
- CARROLL, G.C.; CARROLL, F.E. Studies on the incidence of coniferous endophytes in the Pacific Northwest. **Canadian Journal of Botany**, v.56, p.3034-3043, 1978.
- DI FIORE, S.; DEL GALLO, M. Endophytic bacteria: their possible role in the host plants. In: FENDRIK, I.; DEL GALLO, M.; VANDERLEYDEN, J.; DE ZAMAROCZY, M. ed. **Azospirillum VI and related microorganisms**. Berlin: Springer-Verlag, 1995, p.169-187. (NATO ASI Series, 37).
- DÖBEREINER, J. Recent changes in the concept of plant-bacteria interactions: endophytic N₂ fixing bacteria. **Ciência e Cultura**, v.44, p.310-313, 1992.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M. Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops. In: FENDRIK, I.; DEL GALLO, M.; VANDERLEYDEN, J.; ZAMAROCZY, M. de, ed. **Azospirillum VI and related microorganisms**. Berlin: Springer-Verlag, 1996, p.3-14 (NATO AI Series, 37).
- DÖBEREINER, J.; REIS, V.M.; PAULA, M.A.; OLIVARES, F. Endophytic diazotrophic in sugar cane, cereals and tuber plants. In: PALACIOS, R.; MORA, J.; NEWTON, W.F., ed. **New horizons in nitrogen fixation**. 1993, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993, p.671-676.
- FAHEY, J.W. Endophytic bacteria for the delivery of agrochemicals to plants. In: CUTLER, H.O., ed. **Biologically active natural products: potential use in agriculture**. Washington: American Chemical Society, 1988, p.120-128. (ACS Symposium Series, 380).
- FISHER, P.J.; ANSON, A.F.; PETRINI, O. Antibiotic activity of some endophytic fungi from *Ulex europaea* and *Ulex gallii*. **Botanica Helvetica**, v.96, p.37-41, 1986.
- FISHER, P.J.; GRAF, F.; PETRINI, L.E.; SUTTON, B.C.; WOOKEY, P.A. Fungal endophytes of *Dryas octopetala* from a high arctic polar semidesert and from the Swiss alps. **Mycologia**, v.87, p.319-323, 1995.
- FREEMAN, S.; RODRIQUES, R.J. Genetic conversion of a fungal plant pathogen to a non pathogenic endophytic mutualist. **Science**, v.260, p.75-78, 1993.
- FUENTES-RAMIREZ, L.E.; JIMENEZ-SALGADO, T.; ABARCA-OCAMPO, I.R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Acetobacter diazotrophicus* an indolacetic acid producing bacteria from sugarcane cultivars of Mexico. **Plant and Soil**, v.154, p.145-150, 1993.
- GLIENKE, C. Variabilidade genética no fungo endofítico *Guignardia citricarpa* Kiely detectada por RAPD. Dissertação de Mestrado, Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1995. 115p. Dissertação de Mestrado.
- GLIENKE, C.; LIMA, E.A.L.A.; AZEVEDO, J.L. Isolamento e identificação de fungos endofíticos de quatro variedades de tangerinas. In: REUNIÃO ANUAL DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, 20., 1995, Piracicaba **Resumos**. Piracicaba: ESALQ/USP, 1995, p.114.
- ISAAC, S. **Fungal-plant interactions**. London: Chapman & Hall, 1992, 418 p.
- HALLMANN, J.; SIKORA, R.A. Toxicity of fungal endophyte secondary metabolites to plant parasitic nematodes and soil-borne plant pathogenic fungi. **European Journal of Plant Pathology**, v.102, p.155-162, 1996.
- KNOCH, T.R.; FAETH, S.H.; ARNOTT, D.L. Endophytic fungi alter foraging and dispersal by desert seed-harvesting ants. **Oecologia**, v.95, p.470-473, 1993.
- LONGO, A.C. Transformação genética e variabilidade detectada por RAPD em isolados endofíticos de *Colletotrichum musae*. Piracicaba: ESALQ/USP, 1996. 101p. Tese de Doutorado
- MASEL, A.M.; IRWIN, J.A.G.; MANNERS, J.M. DNA addition or deletion is associated with a major karyotypic polymorphism in the fungal phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. **Molecular and General Genetics**, v.237, p.73-80, 1992.
- MCCUCHEON, T.L.; CARROLL, G.C.; SCHWAB, S. Genotypic diversity in populations of a fungal endophyte from douglas fir. **Mycologia**, v.85, p.180-186, 1993.
- NAMBIAR, P.T.C.; MA, S.W.; IYER, V.N. Limiting and insect infestation of nitrogen-fixing root nodules of the Pigeon pea (*Cajanus cajan*) by engineering the expression of an entomocidal gene in its root nodules. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.2866-2869, 1990.

- PAMPHILE, J.A.; VIEIRA, M.L.C.; AZEVEDO, J.L. Isolamento e caracterização molecular por RAPD de linhagens endofíticas de *Fusarium* spp. isoladas de milho. In: Reunião Anual de genética de Microrganismos, 20., Piracicaba, 1995. **Resumos**. Piracicaba: ESALQ/USP, 1995, p.122.
- PAULA, M.A.; REIS, V.M.; DÖBEREINER, J. Interactions of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infections of sweet potato (*Ipomea batata*), sugar cane (*Sccharum* spp.) and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*). **Biology and Fertility of Soils**, v.11, p.111-115, 1991.
- PAULA, M.A.; SIQUEIRA, J.O.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares e de bactérias diazotróficas em batata doce (*Ipomea batata*) **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.17, p.349-356, 1993.
- PEREIRA, J.O. Fungos endofíticos dos hospedeiros tropicais *Stylosanthes guyanensis* e *Musa cavendish*. Piracicaba: ESALQ/USP, 1993. 105p. Tese de Doutorado.
- PEREIRA, J.O.; AZEVEDO, J.L. PETRINI, O. Endophytic fungi of *Stylosanthes*: a first report. **Mycologia**, v.85, p.362-364, 1993
- RANTA, H.; NEUVONEN, S.; KAARIAINEN, S.; VESANTO, S. Cooper and nickel pollution: frequency of endophytic fungi in Scots pine shoots and endophyte growth in vitro. **Canadian Journal of Botany**, v.72, p.93-99, 1994.
- RIBEIRO, L.A. Variabilidade genética por RAPD em fungos endofíticos do gênero *Penicillium* provenientes de *Zea mays*. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1995. 90p. Dissertação de Mestrado.
- SHULTZ, B.; WANKE, U.; DRAEGER, S.; AUSTIN, J. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. **Mycological Research**, v.97, p.1447-1450, 1993.
- SILVA, A.C.; ARAUJO, J.M.; AZEVEDO, J.L. Ocorrência de Actinomicetos endofíticos em milho (*Zea mays*). In: REUNIÃO ANUAL DE GENÉTICA DE MICROORGANISMOS, 20., 1995, Piracicaba. **Resumos**. Piracicaba: ESALQ/USP, 1995. p.125.
- SOUZA, A.O. Isolamento e identificação de bactérias endofíticas de milho (*Zea mays* L.) e análise de sua variabilidade genética por RAPD. Piracicaba: ESALQ/USP, 1996. 88p. Dissertação de Mestrado.
- SOUZA, A.O.; AZEVEDO, J.L. Interação de bactérias e fungos endofíticos isolados de milho (*Zea mays* L.). In: Reunião Anual de Genética de Microrganismos, 20., 1995, Piracicaba. **Resumos**. Piracicaba: ESALQ/USP, 1995. p.126.
- SPRENT, J.I.; JAMES, E.K. N-fixation by endophytic bacteria : questions of entry and operation. In: I.FENDRIK; M. DEL GALLO; J. VANDERLEYDEN; M. DE ZAMAROCZY, ed. **Azospirillum VII and related microorganisms**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p.15-29. (NATO ASI Series, 37).
- STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreane* an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**, v.260, p.214-216, 1993.
- TESTER, C.F. Influence of a genetically modified endophytic bacterium on composition and decomposition of corn residue. **Soil Biology and Biochemistry**, v.24, p.1107-1112, 1992.
- TURNER, J.T.; LAMPEL, J.S.; STEARMEN, R.S.; SUNDIN, G.W.; GUNYUZLU, U.P.; ANDERSON, J.J. Stability of the alfa-endotoxyn gene from *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki* in a recombinant strain of *Clavibacter xyli subsp. cynodontes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p.3522-3528, 1991.
- VOLKSCH, B.; ULLRICH, M.; FRITSCH, W. Identification and population dynamics of bacteria in leaf spots of soybean. **Microbial Ecology**, v.24, p.305-311, 1992.
- WHITE, J.F.; COLE, G.T. Endophyte-host associations in forage grasses: I. Distribution of fungal endophytes in some species of *Lolium* and *Festuca*. **Mycologia**, v.77, p.323-327, 1985.
- WILSON, R.; WHEATCROFT, R.; MILLER, J.D.; WHITNEY, N.J. Genetic diversity among populations of endophytic *Lophodermium pinastri* from *Pinus resinosa*. **Mycological Research**, v.98, p.740-744, 1994.

5

ECOLOGIA DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS FORMADORES DE ESCLERÓDIOS

Ana Maria Rodrigues Cassiolato

Departamento de Biologia, UNESP, Campus de Ilha Solteira
Caixa Postal 31, CEP 15385-000, Ilha Solteira, SP

INTRODUÇÃO

Os escleródios têm recebido considerável atenção por parte dos micologistas, por desempenharem importante papel no ciclo vital de muitas espécies fúngicas. Patógenos de plantas de ciclo curto e de plantas herbáceas sobrevivem passivamente no solo através dessas estruturas, que são formadas por agregados compactos, multicelulares de hifas fúngicas, que na maturidade são rígidas e ricas em nutrientes armazenados. Uma vez formados, os escleródios podem sobreviver por dias ou por muitos anos no solo, dependendo dos fatores físicos e biológicos e das condições ambientais. Fungos formadores de escleródios, como *Sclerotinia* spp., *Verticillium dahliae* e outros, apresentam uma distribuição mundial e causam doenças em plantas economicamente importantes. Os danos causados por essas espécies são devastadores, difíceis de controlar tanto por métodos culturais como químicos, e hospedeiros geneticamente resistentes ainda não se encontram disponíveis para muitos desses patógenos.

SOBREVIVÊNCIA ATRAVÉS DE ESCLERÓDIOS

A sobrevivência por dormência ocorre geralmente na forma de esporos, escleródios ou hifas dormentes. A resistência de escleródios e esporos é fisiológica e estes são morfologicamente diferentes das hifas que, em geral, têm maior potencial de inóculo e maior longevidade do que hifas dormentes (Tabela 1).

A formação e germinação dos escleródios das várias espécies de fungos apresentam certas similaridades. Usualmente percorrem três estádios de desenvolvimento. No inicial, ocorre a formação dos primórdios dos escleródios; no de desenvolvimento, os escleródios crescem até seu tamanho total; e na maturação há a formação da camada compacta mais externa e pigmentada (geralmente de cor escura).

Usualmente, os escleródios são formados por camadas pseudoparenquimatosas contínuas, com células melanizadas conhecidas como anéis, que se formam externamente ao envelado de hifas, a medula. Entre os tipos de escleródios, as estruturas variam muito, desde os bem desenvolvidos, com anéis diferenciados, tais como *Typhula* spp. e *Sclerotinia rolfii*, até aqueles sem anéis diferenciados, como *Rhizoctonia solani*. A época em que os anéis são formados também varia. Em escleródios de *Typhula* spp., por exemplo, os anéis podem desenvolver-se antes

TABELA 1. Período de sobrevivência de escleródios de alguns fungos fitopatogênicos.

FUNGO	PERÍODO DE SOBREVIVÊNCIA	REFERÊNCIAS
<i>Botrytis tulipae</i>	15 meses ou mais	Coley-Smith & Javed, 1972
<i>Colletotrichum graminicola</i>	18 meses	Casela & Frederiksen, 1993
<i>Sclerotinia minor</i>	4 a 5 anos	Adams & Ayers, 1979
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	4 a 5 anos	Adams & Ayers, 1979
<i>Sclerotinia trifoliorum</i>	6 a 8 anos	Dillon-Weston <i>et al.</i> , 1946
<i>Sclerotium cepivorum</i>	+ de 10 anos	Coley-Smith, 1960
<i>Sclerotium rolfii</i>	5 anos	Baker & Cook, 1974
<i>Rhizoctonia solani</i>	+ de 2 anos	Manian & Manibhushanrao, 1990
<i>Verticillium dahliae</i>	14 anos	Whilhelm, 1955

da maturidade porque são maleáveis, permitindo que ocorra seu crescimento até a fase final do desenvolvimento. Já em *Botrytis* sp., os anéis são espessos, não permitindo a expansão e, portanto, são formados nos estádios finais de desenvolvimento dos escleródios (Bruehl, 1987; Willetts & Bullock, 1992). Internamente, os escleródios podem ser diferenciados em córtex composto de uma fina parede de células rodeada de hifas compactadas, que formam a medula (Townsend & Willetts, 1954). Nos escleródios, diferenciados e bem desenvolvidos, as células dos anéis não germinam.

Com a continuidade do desenvolvimento, as células internas (medulares) tornam-se compactas e as células do anel começam a se formar logo abaixo da rede de micélio superficial. Durante esse período, os espaços intercelulares são preenchidos com um líquido, que está relacionado com os exsudatos celulares. Com a maturação dos escleródios, as paredes quitinosas das hifas internas tornam-se cobertas com uma espessa camada fibrosa, constituída por β -(1,3) glucana e proteínas. Essas mesmas hifas mantêm em suas células reservas como polissacarídeos e lipídios (Willetts & Wong, 1971).

MODO DE GERMINAÇÃO DOS ESCLERÓDIOS

O modo de germinação permite dividir os fungos formadores de escleródios em grupos, conforme esta seja miceliogênica, esporogênica, carpogênica ou uma mistura dessas formas (Coley-Smith, 1979). A germinação miceliogênica resulta na produção de hifas ou de tufo eruptivos de hifas, que normalmente é característica de escleródios pequenos (1-2 mm de diâmetro), com forma e tamanho mais ou menos homogêneos, tais como *Phymatotrichum omnivorum*, *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotium gladioli*, *S. cepivorum*, *V. dahliae*, *R. solani*, *S. rolfsii* etc.

A germinação do tipo carpogênica é geralmente característica de escleródios maiores. Os escleródios desse grupo possuem forma e tamanho variáveis, podendo atingir um máximo de 2 cm de diâmetro. Normalmente, os corpos de frutificação são produzidos na forma de apotécios, como os observados em *S. sclerotiorum* e *S. trifoliorum*, ou peritécios, presentes nas espécies de *Claviceps* (Garrett, 1970).

A germinação do tipo esporogênica e a produção de esporos assexuais têm sido correlacionadas principalmente com *Botrytis* spp. e *V. dahliae*. Alguns fungos, entretanto, apresentam um ou mais modos de germina-

ção, como no caso de *S. sclerotiorum*, que pode germinar tanto carpo-gênica como miceliogênicamente, ou espécies de *Botrytis*, que podem germinar pelas três formas.

Outras características da germinação dessas estruturas são as germinações sucessivas (observadas em *R. solani*, *Botrytis* spp., *C. purpurea* e *S. sclerotiorum*) e a formação de escleródios secundários, a partir de escleródios primários germinados (verificada em *V. dahliae*).

O período de dormência e, eventualmente, a germinação dos escleródios, são sustentados pelas reservas endógenas acumuladas durante o desenvolvimento esclerotial. Quanto ao tipo de reserva acumulada, os escleródios são divididos em dois grupos, ou seja, os ricos em lipídios e os ricos em carboidratos (Coley-Smith & Cooke, 1971). Microescleródios de *V. dahliae* e escleródios de *Claviceps* spp., por exemplo, contêm altas concentrações de lipídios. Em escleródios de *S. sclerotiorum*, o trealose e o manitol perfazem 4.5-4.7% do peso de massa seca, cada um, correspondendo 1-2% ao arabitól. Além destes componentes, existem pequenas quantidades de glucose, manose e frutose (Cooke, 1969; LeTourneau, 1966; Kitahara, 1950a,b, citados por Willetts & Bullock, 1992).

Os escleródios de espécies de *Botrytis* aparecem na categoria dos ricos em carboidratos. Escleródios de *B. cinerea* contêm menos de 1% de lipídios totais e substâncias álcool-solúveis, 75% de carboidratos, 10% de proteínas e 5% de glucosamina. Possivelmente, uma grande parte deste carboidrato é β -glucana (Coley-Smith, 1980).

Os fungos formadores de escleródios estão distribuídos entre as divisões Ascomicotina, Basidiomicotina e Deuteromicotina. O maior volume de informações disponíveis concentra-se em representantes da Família Sclerotiniaceae, Ascomicotina, que inclui os gêneros *Sclerotinia*, *Botrytis* e *Monilia* (Whetzel, 1945). Dentre os Basidiomicetos, os gêneros *Typhula* spp. e *S. rolfsii* e, dentre os Deuteromicetos, os gêneros *Verticillium*, *Aspergillus* e *Penicillium*, são os mais estudados (Willetts & Bullock, 1992).

DORMÊNCIA DE ESCLERÓDIOS

Para iniciar o processo de patogênese, os propágulos de fungos dormentes no solo precisam germinar. Os escleródios representam uma fase transitória ou um estágio de resistência de longa duração no ciclo vital dos fungos e, cedo ou tarde, germinarão. O processo de germina-

ção pode ser considerado como uma parte estratégica no ciclo vital do fungo, e isso acontece sob três pontos: modo de germinação, mudanças fisiológicas durante a germinação e o fenômeno da dormência.

A dormência é definida como qualquer período de repouso ou interrupção reversível do desenvolvimento fenotípico de um organismo. Dormência constitutiva é uma condição na qual o desenvolvimento do fungo é retardado, devido a uma característica própria da dormência, tal como uma barreira à penetração de nutrientes, um bloqueio metabólico ou a produção de um autoinibidor. Esse estágio é imposto logo após a formação do esporo. A quebra da dormência constitutiva requer a ação conjunta de vários fatores. O estímulo do ambiente para a quebra desse tipo de dormência reúne fatores normalmente não necessários para a fase vegetativa do fungo (Krugner & Bacch, 1995).

Quando os escleródios possuem dormência constitutiva, é possível correlacionar um tratamento ativador necessário para o modo de vida do organismo e definir a vantagem seletiva conferida por um tratamento em particular. Por isso, ressalta-se que, mesmo quando a dormência constitutiva é quebrada, os escleródios podem continuar seu ciclo vital através da dormência exógena (Sussman, 1968).

Usualmente, a dormência constitutiva não é conferida pela estrutura do escleródio. Em poucos casos, como para *S. rolfsii* e *S. cepivorum*, a dormência é imposta pela inibição de alguns processos bioquímicos que normalmente levam à germinação. A remoção de inibidores ativa a germinação dos escleródios.

As células do anel rígido e fortemente pigmentado de escleródios maduros de *S. rolfsii* parecem ter um importante papel tanto na resistência de escleródios à degradação biológica como causando inibição temporária da germinação. Essa inibição parece resultar da presença, nos escleródios maduros, de substâncias que podem ser removidas ou inativadas por abrasão mecânica. Ou seja, o anel esclerotial provou ser uma barreira mecânica controlando a entrada de água e nutrientes no escleródio (Chet, 1969).

Escleródios têm sido freqüentemente relacionados com a necessidade de algum tipo de ativador de germinação. Normalmente, escleródios desenvolvidos em regiões geográficas de clima frio ou temperado necessitam de um período em temperaturas baixas para a ativação da germinação. Exsudatos de sementes propiciam um estímulo aos microrganismos. As sementes de menor qualidade são mais estimulatórias aos microrganismos.

mos que as sementes de boa qualidade, possivelmente por exsudarem quantidade maior de nutrientes (Cook & Baker, 1983; Cook & Snyder, 1965; Dobbs & Hinson, 1953). Os exsudatos solúveis (aminoácidos e açúcares) e voláteis (acetaldéidos e etanol), provenientes da germinação das sementes e raízes em desenvolvimento, constituem estímulos primários para a germinação de propágulos de fitopatógenos, e ainda podem servir como nutrientes, estimulando a germinação de propágulos de outros microrganismos do solo (Cook & Baker, 1983). Surpreendentemente, pouco se conhece sobre as moléculas que governam tais mecanismos. Sabe-se que propágulos de *M. phaseolina* respondem a aminoácidos (Smith, 1969; Cloud & Rupe, 1988; Short & Wyllie, 1978), e que microescleródios de *V. dahliae* não respondem a açúcares (Farley *et al.*, 1971; Olsson & Nnordbring-Hertz, 1985; Schreiber & Green, 1963).

A dormência exógena é uma condição na qual o desenvolvimento é retardado, devido às condições físicas ou químicas desfavoráveis do ambiente. Esta, por sua vez, apenas impede a germinação de esporos quando as condições de ambiente não são favoráveis. Para a quebra de dormência exógena basta, em princípio, um retorno à condição que permita o desenvolvimento vegetativo do fungo (Krugner & Bacch, 1995).

Embora as dormências constitutiva e exógena representem fenômenos de origem distinta, podem aparecer associadas em um mesmo organismo, como em escleródios de *S. cepivorum*. Um dos mais extensivamente estudados sistemas de interações planta-patógeno é *S. cepivorum* e *Allium* spp., no qual somente compostos voláteis e exsudatos liberados por plântulas de *Allium* spp. estimulam a germinação de escleródios. Após um período de dormência constitutiva, as estruturas de resistência são mantidas em estado de latência pela influência fungistática do solo e os escleródios germinam apenas em presença da planta hospedeira (Coley-Smith, 1960; Coley-Smith *et al.*, 1967).

S. cepivorum persiste no solo por longos períodos, devido à formação de numerosos escleródios, que constituem o inóculo. A germinação dos escleródios independe do contato direto destes com as raízes da planta hospedeira, é induzida por substâncias presentes nos exsudatos de *Allium* spp. e pouca ou nenhuma germinação ocorre na ausência dessas espécies. Durante o crescimento de espécies de *Allium*, propil e alil cisteínas, solúveis em água, e seus respectivos sulfóxidos, são liberados das pontas das raízes. Esses compostos são degradados por bactérias do solo, originando sulfetos voláteis, que estimulam a germina-

ção dos escleródios (Coley-Smith & King 1968; Esler & Coley-Smith, 1983; King & Coley-Smith, 1969). Tais compostos e seus precursores são limitados às espécies de *Allium*, o que ajuda a entender por que escleródios de *S. cepivorum* não germinam em resposta a exsudatos de outros gêneros de plantas (Coley-Smith & Holt, 1966).

Os componentes dos exsudatos, que estimulam a germinação destes propágulos, variam entre os gêneros de fungos. Propágulos de *M. phaseolina* e *V. dahliae* respondem a aminoácidos, mas não a açúcares (Schreiber & Green, 1962; Smith, 1969).

A SOBREVIVÊNCIA DE ESCLERÓDIOS

A germinação é altamente correlacionada com a sobrevivência dos escleródios. Fatores estruturais, ambientais e biológicos têm mostrado interferir na germinação. A longevidade dos escleródios no solo varia em função do patógeno e do ambiente ao qual estão expostos.

Fatores Estruturais

A integridade do anel de certas espécies pode influenciar a germinação de escleródios. Se o anel está quebrado ou danificado, a germinação pode ocorrer mais rapidamente do que a de escleródios de anéis intactos. Esta situação foi reportada para *S. sclerotiorum*, *S. trifoliorum* e *S. cepivorum* (Coley & Smith, 1960; Makkonen & Pohakallio, 1960). A falta de integridade dos anéis pode acarretar a redução da longevidade por permitir a germinação ou o aumento da suscetibilidade aos microrganismos colonizadores. No entanto, danos físicos nos anéis não inativizam os escleródios naqueles organismos em que acontece a regeneração dos anéis, como em *S. sclerotiorum* (Jones, 1970).

Escleródios anormais são reconhecidos por sua superfície enrugada e pelo tecido medular descolorido. As malformações estruturais de escleródios levam a maiores perdas de nutrientes por exsudação que escleródios normais, redundando na redução de sua viabilidade. Quanto maior a anomalia dos escleródios, maiores são as perdas de nutrientes e menor a viabilidade. A diferença na viabilidade entre escleródios normais e anormais aumenta ainda mais em função da temperatura ambiente. Parece que as exposições prolongadas sob temperaturas próximas a 0°C podem causar danos ao anel esclerotial, resultando em porcentagens mais eleva-

das de germinação miceliogênica e maior perda de nutrientes (Huang, 1985; Huang, 1982, 1983; Huang & Kozub, 1994).

As diferenças nos métodos de germinação, a presença ou ausência de anéis bem definidos, a amplitude da gama de hospedeiros com a longevidade dos escleródios parecem causar grandes variações. Os escleródios de *Botrytis* spp. possuem germinação esporogênica e apodrecem rapidamente, após a produção de esporos. Escleródios que germinam carpogenicamente em geral desintegram-se com rapidez, dentro de dois ou três meses após a germinação. Os microescleródios de *V. dahliae*, que podem germinar repetidamente e produzir conídios no solo, têm vida mais longa, apesar das germinações sucessivas reduzirem sua vitalidade (pois esta é mantida principalmente pelas reservas do próprio escleródio).

O papel dos anéis bem desenvolvidos é desconhecido. *S. cepivorum* e *Stromatinia gladioli* têm longa vida e apresentam anéis bem desenvolvidos, enquanto escleródios com anéis bem formados também podem ter vida curta, como no caso de *S. delphinii*, *S. rolfsii* e *P. omnivorum* (Coley-Smith, 1979).

A germinação de escleródios se dá às expensas de suas reservas de nutrientes. Assim, germinações sucessivas têm grandes implicações na sobrevivência de escleródios, exaurindo suas reservas e reduzindo sua viabilidade. Nas germinações carpogênicas, como em *S. sclerotiorum*, a redução de reservas de nutrientes provoca diminuição do número de apotécios formados ou estipes mais curtas. Outra conseqüência da germinação carpogênica sobre a viabilidade dos escleródios está no fato de, ao emergirem, as estipes romperem as camadas internas e externas deles, aumentando as possibilidades de invasões por microrganismos do solo (Merriman, 1976).

A germinação esporogênica é o método mais freqüente para a germinação dos escleródios de espécies de *Botrytis*. Nesse tipo de germinação, baixas temperaturas podem ativar germinações sucessivas dos escleródios, mesmo para uma grande amplitude de umidade do solo. A capacidade de reesporulação parece não ser afetada pela dissecação ou pela presença de conidióforos velhos, porém, quando conídios e conidióforos velhos estão presentes ao mesmo tempo, a reesporulação é suprimida. Apesar da possibilidade das reesporulações ocorrerem, estas não aparecem como uma característica importante da germinação

de escleródios de *Botrytis* sob condições de campo, visto que morrem rapidamente após germinarem (Coley-Smith & Javed, 1972).

A rápida formação dos chamados escleródios secundários é outro importante detalhe na sobrevivência, pois a germinação dessas estruturas estende a longevidade do fungo na ausência de um bom substrato para colonização. A densidade de inóculo no solo pode aumentar com a formação de escleródios secundários no solo, como para *S. sclerotiorum* (Adams & Ayers, 1975). Em escleródios de *S. rolfsii*, a germinação eruptiva é o processo que mais os exaure. Esse processo geralmente ocorre pela ausência de fontes de nutrientes disponíveis, acarretando a formação de escleródios secundários (Punja & Grogan, 1981).

Escleródios de *S. trifoliorum* e *S. sclerotiorum* podem regenerar-se sem a intervenção do estágio micelial de vida livre (Williams & Western, 1965). Situação similar foi observada em *P. omnivorum*, através das "gemulações".

V. dahliae apresenta germinação esporogênica e a transformação de conídios em microescleródios. Quando ocorre o ressecamento gradual dos conídios, eles parecem inchar e germinar através de finos tubos germinativos com conseqüente anastomose entre eles. Esses conídios podem, então, transformar-se em pequenos escleródios de coloração escura. Os microescleródios podem germinar, dando origem a novos conídios (Wilhelm, 1954). As germinações sucessivas reduzem a viabilidade dos microescleródios, assim como ciclos alternados de umidade e seca amenas podem induzir repetidos ciclos de esporulações, que declinam quando os microescleródios tornam-se exauridos. A esporulação dos microescleródios é alcançada através de suas próprias reservas e a suplementação de nutrientes ao solo pouco interfere no número total de propágulos. Essa produção decai quando os microescleródios tornam-se exauridos. O fato mostra por que muitos dos microescleródios que germinam durante o períodos úmidos perdem a capacidade de suportar os períodos de seca (Bruehl, 1987; Farley *et al.*, 1971; Wilhelm, 1954).

Fatores Ambientais

Nem todos os fungos formadores de escleródios são fungos de solo, porém cedo ou tarde os escleródios da maioria deles irão alcançá-lo e sua persistência sobre ou dentro do solo acaba por ser um fator importante.

Do ambiente externo, muitos fatores afetam a sobrevivência de escleródios e sua longevidade pode ser consideravelmente reduzida. Os fatores ambientais raramente interferem uns nos outros, mas têm ações complementares. Mudanças em um fator podem acarretar mudanças em outro, e o sinergismo entre certos fatores é bem conhecido. Numerosos também são os casos nos quais os efeitos deletérios de um fator são acentuados pelos efeitos benéficos de outros (Coley-Smith & Cooke, 1971).

Existem muitas informações sobre os efeitos da umidade do solo quanto à sobrevivência de escleródios, porém poucos estudos foram efetuados de maneira a permitir comparações mais precisas sobre as interações entre fatores como temperatura, aeração, umidade, textura, composição e profundidade no solo.

Na ausência do hospedeiro, a umidade do solo exerce ação direta sobre a sobrevivência do patógeno. Em geral, as condições de alta umidade, que levam ao desenvolvimento de ambientes anaeróbicos, reduzem a longevidade dos escleródios.

Sabe-se que escleródios de muitos fungos são extremamente resistentes à dessecação e, com algumas exceções, os escleródios têm mostrado serem capazes de sobreviver por vários meses nessas condições. No entanto, longos períodos de exposição à baixa umidade do solo podem causar o dessecamento deles, diminuindo a população do fungo ou provocando seu desaparecimento.

A germinação carpopôgica requer água livre para a produção de apotécios e estipes não são produzidas se o solo estiver com baixa umidade. Os escleródios expostos à dessecação no campo podem falhar em produzir apotécios, quando colocados em água livre ou em condições ambientais ideais. Isso indica que a exposição ao extremo de condição seca tem efeito negativo sobre a produção de apotécios, embora os escleródios permaneçam viáveis e em condições de germinação miceliogênica (Abawi & Grogan, 1975).

Na forma miceliogênica, a sobrevivência é alta sob condições de baixa umidade e decresce com a elevação da umidade, como observado para *V. dahliae* e *S. cepivorum*. (Crowe *et al.*, 1980). O aumento da umidade do solo, pelo alagamento com água parada ou circulante, acelera a degeneração de escleródios de *S. sclerotiorum* e *S. trifoliorum* no campo. Os elevados níveis de umidade induzem a formação de escleródios secundários (Williams & Western, 1965).

Poucas informações estão disponíveis sobre a influência da umidade na germinação esporogênica. Escleródios de *B. convoluta* costumam resistir a longos períodos de armazenamento sob condições de seca, porém sua viabilidade fica reduzida em solo úmido, sob temperaturas amenas.

O potencial matricial do solo mostra efeitos variáveis sobre diferentes escleródios. Em solos úmidos, os escleródios de *S. rolfsii* perdem rapidamente a viabilidade, porém, em condições saturadas, sobrevivem por vários meses, tanto em condições de laboratório como em campo. Esses escleródios podem sobreviver em solo de campo natural a -15 bars e por vários meses a 15 a 35°C sem perda de viabilidade. Sob umidade de -1/3 bar, a viabilidade dos escleródios pode ser mantida ao nível de 100 a 97% por até 6 meses a 15°C, decaindo gradativamente sob temperaturas mais elevadas, até cerca de 35°C. A viabilidade é reduzida, a consistente nível, sob 5-6 cm ou mais de profundidade, quando comparada com escleródios da superfície do solo (Beute & Rodriguez-Kabana, 1981).

A sobrevivência de escleródios em diferentes profundidades no solo é também dependente da umidade e da temperatura. O calor seco pode levar a falhas na germinação de escleródios (mas não pela dessecação), porém é o calor úmido que geralmente mata os escleródios mais rapidamente (Coley-Smith, 1980).

A temperatura tem mostrado exercer alguma influência na sobrevivência de escleródios, em virtude de seus efeitos diretos sobre a produção e a germinação dessas estruturas.

Vários fungos formadores de escleródios mostram algumas restrições a certas áreas geográficas. A distribuição geográfica está relacionada com a capacidade de adaptação dos mesmos às condições de ambiente. Assim, fungos capazes de se desenvolver sob uma larga gama de variação ambiental têm distribuição ampla, enquanto aqueles menos tolerantes às variações do meio apresentam distribuição geográfica mais restrita.

Estas limitações parecem dever-se à pequena amplitude de temperaturas nas quais se desenvolvem bem os fungos de clima temperado. Em regiões tropicais e subtropicais, os fungos parecem ser capazes de crescer numa faixa de temperatura mais ampla. Algumas práticas agrícolas para controle de fungos formadores de escleródios, como a do revolvimento do solo, fundamentam-se nessa característica. O revolvimento, promovendo a exposição dessas estruturas de resistência a altas tempe-

raturas, na superfície do solo, tem como objetivo baixar o potencial de inóculo. Em áreas de clima temperado, as baixas temperaturas, durante o período do inverno, levam à paralisação das atividades do fungo ou causam sua morte (Coley-Smith & Cooke, 1971; Krugner & Bacch, 1995).

Há evidências de que o ótimo de temperatura para a produção de escleródios ocorra numa faixa de temperatura um pouco abaixo da ideal para o crescimento micelial, a qual varia com a espécie fúngica. A reprodução dos fungos pode sofrer influência tanto da umidade atmosférica como da umidade do solo. Variações do teor de água do ar, associadas às oscilações de temperatura, podem determinar a duração do período de esporulação de um patógeno. Dentre os fungos que apresentam escleródios com germinação esporogênica, a produção de escleródios das espécies de *Botrytis* parece ocorrer sob qualquer temperatura que suporte um vigoroso crescimento micelial. Há evidências, no entanto, de que a produção de escleródios por *B. cinerea*, *B. alii*, *B. squamosa*, *B. convoluta* e *B. tulipae* ocorra sob temperatura ligeiramente abaixo da exigida para a produção micelial.

O efeito da temperatura sobre as atividades dos fungos é, de modo geral, menos marcante que o efeito exercido pela umidade. Mais do que as altas temperaturas do solo de incubação, observou-se que a dessecação, seguida de reumedecimento dos escleródios, quando próximos da superfície do solo, tem sido mais importante que a temperatura para a redução do inóculo e sobrevivência dos escleródios. Escleródios de *S. sclerotiorum*, enterrados entre 1 e 25 cm de profundidade, sofrem reduções menos significativas na sobrevivência, quando comparados com os resultados a 0 cm de profundidade (Adams, 1975; Cook *et al.*, 1975).

Dependendo da espécie e das condições ambientais, *Sclerotinia* spp. produzem escleródios na faixa de temperatura de 0 a 30°C. Porém, os grandes escleródios são produzidos sob temperaturas mais baixas. A combinação de altas temperaturas e umidade do solo reduzem significativamente o período de sobrevivência desses escleródios. Temperaturas baixas ou oscilantes ativam a germinação carpogênica, levando à formação de corpos de frutificação, que consomem quantidades consideráveis da reserva esclerotial e abreviam sua longevidade. A faixa de temperatura ideal para a formação de apotécios de escleródios de *S. sclerotiorum* varia entre 10 a 25°C; acima dessa faixa poderia ser inibida. Esse ótimo, entretanto, é muito variável. Sob potencial matricial de solo em -0.25 bar, o ótimo de temperatura do solo para a formação de

apotécios foi alterado para a faixa de 15-18°C por 10 a 15 dias (Abawi & Grogan 1975; Steadman, 1982).

Em *S. sclerotiorum*, a germinação carpopogênica também é influenciada pela temperatura na qual os escleródios e/ou micélio são produzidos. A germinação carpopogênica de escleródios produzidos a 10°C é mais rápida que a de escleródios produzidos entre 25 e 30°C, sob condições ideais de umidade. Os escleródios produzidos sob temperaturas mais elevadas tendem para a geração miceliogênica, exceto quando sofrem um prévio tratamento térmico (3-10°C) para aumentar a germinação (Huang & Kozub, 1991; Saito, 1973).

Essa situação não parece ser a mesma para escleródios com germinação miceliogênica. Escleródios de *R. solani* mostraram-se capazes de, em solo úmido, permanecer por no mínimo 21 meses a 20-30°C. A sobrevivência foi afetada quando a umidade do solo se mostrou muito baixa (Manian & Manibhushanrao, 1990).

Entre os fatores que afetam a sobrevivência dos escleródios, o pH do solo parece ter importância mínima. Os níveis de acidez ou de alcalinidade do solo parecem afetar diretamente os fungos, provocando alterações na sua sobrevivência. O decréscimo da longevidade de escleródios de certas espécies fúngicas parece estar associado à alta incidência de germinação espontânea, em solos ácidos (Mitchell & Weeler, 1990).

Poucos estudos diretos foram realizados para observar os efeitos da aeração sobre a sobrevivência dos escleródios. Diferenças na sobrevivência de escleródios, em vários níveis de profundidade do solo e em solos de diferentes texturas, são freqüentemente atribuídas à aeração, porém faltam evidências mais diretas (Coley-Smith, 1971).

A atmosfera do solo tem mostrado influenciar sensivelmente a germinação. *S. rolfsii* é um fungo aeróbio e a germinação de seus escleródios pode ser consideravelmente reduzida quando estão localizados abaixo da superfície do solo. Porém, aumentos na germinação foram obtidos com aeração forçada do solo.

Certos efeitos na atmosfera do solo sobre os escleródios resultantes da presença de compostos inibitórios voláteis e não-voláteis, excretados por microrganismos do solo, podem causar reduções na germinação (Hora & Baker, 1970). Por outro lado, compostos voláteis estimuladores da germinação de escleródios podem estar presentes na atmosfera do solo. Para microescleródios de *V. dahliae*, alguns desses compostos estimulam esporulações subseqüentes, o que pode abreviar sua dor-

mência. Por exemplo, a exposição de escleródios de *S. rolfsii* a esses compostos leva à germinação e morte dos escleródios, sem tempo para a subsequente formação de escleródios secundários (Gilbert & Griebel, 1969; Farley *et al.*, 1971).

Fatores Biológicos

Interações entre microrganismos são, dos fatores de origem biológica, os mais importantes componentes do solo que afetam a sobrevivência dos escleródios. A literatura tem revelado mais de 30 espécies diferentes de fungos parasitas de escleródios no solo. Dentre esses encontram-se: *Coniothyrium minitans*, *Sporidesmium sclerotivorum*, *Verticillium biguttatum*, *Laetisaria arvalis*, *Talaromyces flavus*, *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp., *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium nigricans*, *Chaetomium globosum*, *Teratosperma oligocladum* e *Rhizoctonia solani* binucleada (Tabela 2).

Os agentes de biocontrole são bastante influenciados pelos fatores ambientais, que afetam sobretudo o seu desempenho. Alguns micro-parasitas possuem requerimentos ambientais mais específicos para suas atividades de controle. Dentre esses fatores, a nutrição aparece como o mais importante, pois a qualidade e a quantidade dos nutrientes podem influenciar os sistemas fisiológicos e bioquímicos tanto do hospedeiro como dos antagonistas.

Nesse contexto, já foi constatado que certos níveis nutricionais estimulam o parasitismo por aumentar a suscetibilidade do hospedeiro. Diferentes fontes de carbono e nitrogênio afetam o crescimento de fungos e a relação C:N tanto afeta os padrões de ramificações e as taxas de alongação de hifas como a suscetibilidade do organismo (Boosalis, 1963; Stack *et al.*, 1987).

As condições nutricionais do solo e, em particular, o conteúdo de matéria orgânica podem afetar a sobrevivência de vários fungos. Os efeitos podem ocorrer diretamente sobre o fungo, ou indiretamente sobre a microflora. Essas estruturas de resistência têm mostrado possuir menor resistência à ação dos antagonistas durante a fase de germinação do que durante a dormência. Assim, após a germinação, os escleródios tornam-se mais suscetíveis à lise resultante da atividade dos outros microrganismos do solo, sugerindo que as muitas diferenças obtidas na germinação e sobrevivência dos escleródios são causadas pela germinação dos escleródios sob condições que favoreçam a atividade microbiana.

Uma situação como essa, envolvendo a lise e redução, ocorre com *V. dahliae*. A suplementação do solo com certos compostos acarreta aumentos tanto de *V. dahliae* quanto das populações microbianas em geral do solo. Para *V. dahliae*, a adição de matéria orgânica geralmente leva ao crescimento micelial e esporulação, para posteriormente a quantidade de microescleródios ser detectada em níveis ainda inferiores aos iniciais (Green & Papavizas, 1968).

Suplementos inorgânicos, particularmente compostos nitrogenados, como a uréia, têm-se mostrado efetivos na redução do número de apótecios formados por *S. sclerotiorum*. A liberação de amônia, decorrente da decomposição da uréia, parece ser o agente tóxico responsável pela inibição da germinação carpogênica (Huang & Janzen, 1991; Mitchell & Wheeler, 1990).

A atividade de agentes de biocontrole é usualmente afetada pelo pH do solo (Baker, 1986). A supressividade a *R. solani* por *T. harzianum* em monoculturas de rabanete pôde ser alcançada mais rapidamente em solos alcalinos do que em solos ácidos (Liu & Baker, 1980).

Já é conhecido que *Trichoderma* spp. desenvolve-se melhor em condições ambientais ácidas, devido à melhor germinação de seus propágulos. O ótimo de pH para o crescimento de *T. koningii* e *T. harzianum* parece estar ao redor de 4,5 (Marshall, 1982; Nelson *et al.*, 1988). A temperatura tem mostrado afetar o grau de parasitismo em alguns casos. A temperatura ótima para fungos hiperparasitas necrotróficos está entre 25 e 30°C (Boosalis, 1963).

A incorporação de resíduos de plantas no solo é uma prática que possibilita o aumento da atividade de agentes de controle. Os antagonistas, que são bons competidores e sapróbios, podem ser capazes de aumentar sua atividade saprofítica seletivamente, através da produção de enzimas (Papavizas, 1985). Por exemplo, a incorporação de celulose no solo permitiu observar um aumento seletivo da densidade populacional de *T. harzianum* no solo, o que favorece a supressividade de *R. solani*.

A proliferação e o subsequente estabelecimento de agentes de biocontrole no solo dependem muito da idade e da forma com que são adicionados em relação à base alimentar (Lewis & Papavizas, 1984, 1985). A densidade populacional do antagonista deve ser suficiente para levar à supressividade do solo (Chet & Baker, 1981; Liu & Baker, 1980). Os fungos antagonistas têm mostrado competir por nutrientes e excretar

TABELA 2. Microrganismos antagonísticos a fungos fitopatogênicos formadores de escleródios.

ANTAGONISTAS	PATÓGENOS	TIPO DE PARASITISMO	REFERÊNCIAS
<i>Coniothyrium minitans</i>	<i>Sclerotinia</i> sp.	Biotrófico	Budge & Whipps, 1991; Huang, 1977, 1978, 1980; Huang & Hoes, 1976; Jones & Watson, 1969; Jones <i>et al.</i> , 1974
	<i>S. cepivorum</i>	Biotrófico	Ahmed & Tribe, 1977; Harrison & Stewart, 1988; Stewart & Harrison, 1988
	<i>C. purpurea</i>	Biotrófico	Ayers & Adams, 1981b
	<i>B. fabae</i>	Biotrófico	Turner & Tribe, 1976
<i>Sporidesmium sclerotivorum</i>	<i>Sclerotinia</i> sp.	Biotrófico	Adams & Ayers, 1983; Ayers & Adams, 1979, 1983; Bullock <i>et al.</i> , 1986; Uecker <i>et al.</i> , 1980
	<i>S. cepivorum</i>	Biotrófico	Ayers & Adams, 1979, 1981
<i>Verticillium biguttatum</i>	<i>Sclerotinia</i> spp.	Biotrófico	Adams, 1989; Adams & Ayers, 1979, 1983
	<i>R. solani</i>	Biotrófico	Jager <i>et al.</i> , 1991; Van der Bogert, 1995; Van der Bogert & Deacon, 1995; Van der Bogert & Jader, 1984
<i>Teratosperma oligocladium</i>	<i>S. cepivorum</i>	Necrotrófico	Ayers & Adams, 1979, 1981b; Uecker <i>et al.</i> , 1980
<i>Gliocladium</i> sp.	<i>S. sclerotiorum</i>	Necrotrófico	Phillips, 1986; Tu, 1980
	<i>S. rolfsii</i>	Necrotrófico	Lewis <i>et al.</i> , 1993; Papavizas & Lewis, 1989
	<i>R. solani</i>	Necrotrófico	Jager <i>et al.</i> , 1979; Tu & Vaartaja 1981
	<i>Botrytis</i> sp.	Necrotrófico	Coley-Smith, 1980
	<i>S. cepivorum</i>	Necrotrófico	Stewart & Harrison, 1988
<i>Chaetomium globosum</i>	<i>S. cepivorum</i>	Necrotrófico	Stewart & Harrison, 1988
<i>Penicillium</i> spp.	<i>S. cepivorum</i>	Necrotrófico	Ghaffar, 1969
	<i>Verticillium</i> spp.	Necrotrófico	Dutta, 1981

ANTAGONISTAS	PATÓGENOS	TIPO DE PARASITISMO	REFERÊNCIAS
<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Sclerotinia</i> sp.	Necrotrófico	Budget & Whipps, 1991; Cassiolato <i>et al.</i> , 1996a,b; Nelson <i>et al.</i> , 1983; Phillips, 1989; Santos & Dhingra, 1982; Trutmann & Keane, 1990
	<i>Botrytis</i> spp.	Necrotrófico	Elad <i>et al.</i> , 1981; Tronsmo, 1983; Tronsmo & Raa, 1977
	<i>S. rolfsii</i>	Necrotrófico	Chet <i>et al.</i> , 1967; Elad <i>et al.</i> , 1983, 1984; Henis <i>et al.</i> , 1984
	<i>S. cepivorum</i>	Necrotrófico	Abd-El-Moity <i>et al.</i> , 1982; Oliveira <i>et al.</i> , 1984
	<i>R. solani</i>	Necrotrófico	Elad <i>et al.</i> , 1983, 1987; Marshall <i>et al.</i> , 1982
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	<i>V. dahliae</i>	Necrotrófico	Marois <i>et al.</i> , 1982
<i>Talaromyces flavus</i>	<i>V. dahliae</i>	Necrotrófico	Fahima & Henis, 1995; Fravel <i>et al.</i> , 1987; Kim <i>et al.</i> , 1988; Marois <i>et al.</i> , 1982; Melo, 1984
	<i>Sclerotinia</i> spp.	Necrotrófico	McLaren & Rimmer, 1983; McLaren <i>et al.</i> , 1986
	<i>R. solani</i>	Necrotrófico	Boosalis, 1956
	<i>V. dahliae</i>	Necrotrófico	Marois <i>et al.</i> , 1982; Melo, 1984
<i>Laetisaria arvalis</i>	<i>R. solani</i>	Necrotrófico	Burdsall <i>et al.</i> , 1980; Larsen <i>et al.</i> , 1985
<i>Rhizoctonia solani</i> (binucleada)	<i>R. solani</i>	Necrotrófico	Sneh, 1995; Sneh & Ichielevich-Auster, 1995

substâncias antibióticas e líticas, que inibem o crescimento normal de propágulos no solo. O crescimento saprofítico dos antagonistas geralmente reduz o potencial dos fitopatógenos. Os três principais mecanismos diretamente envolvidos incluem parasitismo ou predação de um organismo por outro; antibiose, quando antagonistas secretam metabólitos danosos a outros organismos; e competição, quando a demanda é maior que a disponibilidade imediata de fontes de nutrientes ou espaço (Tabela 3). Esses modos de ação podem ocorrer dentro das plantas ou

no meio ambiente, e geralmente não são mutuamente excludentes. Por exemplo, enzimas líticas podem ser secretadas localmente, durante o parasitismo, assim como podem ser rotineiramente liberadas durante a fase de crescimento normal do antagonista. Ou ainda, antagonistas estabelecidos em determinados sítios podem competir por nutrientes e espaço, além de poderem causar antibiose.

A existência de interações entre escleródios e microrganismos do solo é bem conhecida. Escleródios de diversos fungos exsudam solutos, especialmente quando colocados sob condições de umidade com posterior exposição ao ar seco. Eles podem exsudar repetidamente, sempre que expostos a essas condições, porém a quantidade de material perdido é invariavelmente maior após o primeiro período de seca. Os materiais exsudados pelos escleródios aparentemente originam-se do interior das hifas e não dos espaços livres do escleródio. Uma ampla gama de substâncias pode ser exsudada pelos escleródios, participando os carboidratos solúveis com cerca de 50%, e os aminoácidos, com 30% do peso seco total do material liberado.

Além destes materiais que podem ser facilmente usados pelos microrganismos do solo, as células das camadas mais externas dos escleródios podem colapsar, permitindo a perda de seus conteúdos. Essas células são mais rapidamente invadidas por microrganismos do solo do que as células intactas.

Os fatores que aceleram as perdas de nutrientes ou a atividade de microrganismos do solo próximos dos escleródios podem tanto predispor ao antagonismo como podem apressar a morte dos escleródios. Entre esses fatores incluem-se a secagem, o calor, a profundidade do solo e mudanças na integridade dos anéis esclerotiais. A presença de melanina é um dos fatores relacionados com a resistência dos escleródios à degradação microbiana, e sua presença parece conferir resistência à lise enzimática. O controle biológico de fungos formadores de escleródios tem apresentado sucesso com o emprego de algumas espécies antagonistas, embora as camadas externas dos escleródios sejam substancialmente protegidas da degeneração biológica e química pela presença de anéis melanizados.

O parasitismo é uma forma comum de simbiose entre muitos grupos de organismos e estabelece relações nutricionais que favorecem a existência do parasita.

TABELA 3. Modos de ação exibidos por alguns agentes de controle de fungos formadores de escleródios.

ANTAGONISTAS	REFERÊNCIAS
Parasitismo ou predação de hifas	
<i>Gliocladium catenulatum</i>	Huang, 1978; Lee & Wu, 1984; Papavizas, 1985
<i>Talaromyces flavus</i>	McLaren <i>et al.</i> , 1986
<i>Coniothyrium minitans</i>	Huang & Kokko, 1988
<i>Verticillium biguttatum</i>	Van der Boogert & Deacon, 1994
<i>Trichoderma</i> spp.	Chet <i>et al.</i> , 1981; Dutta, 1981; Elad <i>et al.</i> , 1981; Nelson <i>et al.</i> , 1988; Papavizas, 1985; Trutmann & Keane, 1990
Parasitismo ou predação de propágulos	
<i>Coniothyrium minitans</i>	Huang & Kokko, 1987; Turner & Tribe, 1976
<i>Gliocladium</i> spp.	Lee & Wu, 1984; Jager <i>et al.</i> , 1979; Tu, 1980; Whipps, 1991
<i>Sporidesmium sclerotivorum</i>	Ayers & Adams, 1979, 1981a, 1983; Bullock <i>et al.</i> , 1986
<i>Talaromyces flavus</i>	Boosalis, 1956; Fahima <i>et al.</i> , 1992; Marois <i>et al.</i> , 1982
<i>Teratosperma oligocladium</i>	Adams & Ayers, 1983; Ayers & Adams, 1981b; Whipps, 1991
<i>Trichoderma</i> spp.	Lee & Wu, 1984; Whipps, 1991
<i>Verticillium biguttatum</i>	Van der Boogert, 1995; Van der Boogert & Deacon, 1995; Van der Boogert & Jader, 1984
Antibiose	
<i>Gliocladium virens</i>	Lee & Wu, 1984; Lumsden <i>et al.</i> , 1992; Roberts & Lumsden, 1990
<i>Talaromyces flavus</i>	Fravel <i>et al.</i> , 1987; Kim <i>et al.</i> , 1988
<i>Trichoderma</i> spp.	Dennis & Webster, 1971; Lee & Wu, 1984; Papavizas, 1985
Competição	
<i>Rhizoctonia solani</i> binucleada	Sneh, 1995

Estudos das interrelações nutricionais dividiram os parasitas em necrotróficos e biotróficos. Os parasitas necrotróficos (destrutivos) matam as células hospedeiras principalmente por excretarem substâncias tóxicas, utilizando a seguir os nutrientes que são liberados. A maioria dos fungos parasitas é sapróbia e caracteriza-se pelo rápido crescimento sobre diversos substratos (Barnett, 1963; Barnett & Binder, 1973). Dentre os gêneros de fungos necrotróficos mais conhecidos por atuarem como parasitas de escleródios estão *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Talaromyces* e *Penicillium*.

Alguns isolados de *Trichoderma* têm exibido capacidade para, através da produção de quitinase e $\beta(1,3)$ -glucanase, hiperparasitar escleródios ou hifas, acarretando redução do número de escleródios formados por *S. rolfsii*, *R. solani*, *S. sclerotiorum*, *S. minor* etc. (Chet *et al.*, 1967; Santos & Dhingra, 1982; Henis *et al.*, 1984; Whipps, 1987). Certas espécies de *Trichoderma* podem utilizar o conteúdo celular de escleródios para seu crescimento e esporulação, após a degradação da parede celular.

Os parasitas biotróficos obtêm nutrientes de células hospedeiras vivas e quase não causam danos imediatos ao hospedeiro. Hifas dos antagonistas em geral penetram diretamente as hifas dos fitopatógenos, às vezes sem a presença de estruturas especializadas de penetração. O parasita cresce dentro da hifa do hospedeiro em qualquer direção, e freqüentemente deixa esse hospedeiro para continuar seu crescimento em ambiente aberto (Huang & Hoes, 1976).

Além da ação mecânica, antagonistas como o *C. minitans* produzem exoenzimas, particularmente β -glucanase e quitinase, que, justamente como as enzimas melanolíticas, demonstram destruir o tecido parenquimatoso dos escleródios, utilizando-o como fonte de carbono (Jones & Watson, 1969; Ghaffar, 1972; Jones *et al.*, 1974). Como resultado da invasão, as paredes celulares colapsam e o citoplasma do hospedeiro desintegra-se. Quando alcançam os escleródios, as hifas penetram as células dos anéis mais externos, desintegrando seu conteúdo. O escleródio pode permanecer ativo e ser extensivamente parasitado antes de ser morto. As hifas espalham-se na superfície dos escleródios, sob o anel ou raramente na medula, formando as picnídias. No solo, as hifas crescem de um escleródio infectado para outro mais próximo.

Sua sobrevivência está relacionada com o parasitismo dos escleródios e o hiperparasita pode viver no tecido intracelular do escleródio por um período indefinido (Adams, 1989). A habilidade desse antagonista

em parasitar escleródios de *S. sclerotiorum* inclui não somente escleródios do solo mas também aqueles produzidos dentro das raízes e caules ou os presentes na superfície das raízes das plantas infectadas, reduzindo o número de escleródios em diferentes hospedeiros, tanto em casa-de-vegetação como em campo (Turner & Turner, 1976; Ahmed & Tribe, 1977; Huang, 1977, 1978, 1980).

Outra estratégia de biocontrole é o uso de substâncias que estimulam a germinação de escleródios. Baseia-se no fato de que os escleródios de *S. cepivorum* germinam em resposta a compostos liberados pelas raízes de plantas do gênero *Allium*. Merriman *et al.* (1980) demonstraram que a aplicação de óleo de cebola no solo promove a germinação de escleródios e conseqüentemente aumenta a suscetibilidade dessas estruturas ao ataque de microrganismos. Outra substância testada é o dissulfato dialítico, que mostrou ser um estimulante ativo da germinação de escleródios, com capacidade para reduzir marcadamente suas populações no solo antes do plantio da cebola e, assim, reduzir a incidência da doença, aumentando a produção (Coley-Smith, 1990).

Isolados avirulentos também têm sido empregados como uma estratégia de biocontrole. Isolados de *R. solani* não-patogênicos (isolados binucleados) têm demonstrado sua eficiência como competidores e no controle *R. solani*. Estes têm mostrado proteger as plântulas contra os tombamentos causados por isolados dos diferentes grupos de aglutinação de *R. solani*. Poucos trabalhos até agora esclarecem os mecanismos de ação de *R. solani* binucleadas na proteção, quais sejam, hiperparasitismo (dsRNA), competição por sítios de infecção, competição por nutrientes e produção de fitoalexinas (Sneh, 1995; Sneh & Ichievich-Auster, 1995).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAWI, G.S.; GROGAN, R.G. Source of primary inoculum and effects of temperature and moisture in infection of beans by *Whetzelinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, v.65, p.300-309, 1975.
- ABD-EL MOITY, T.Y.; PAPAIVIZAS, G.C.; SHAYLA, M.N. Induction of new isolates of *Trichoderma barzianum* tolerant to fungicides and their experimental use for control of wilt-rot of onion. **Phytopathology**, v.72, p.396-400, 1982.
- ADAMS, P.B. Factors affecting survival of *Sclerotinia sclerotiorum* in soil. **Plant Disease Reporter**, v.59, p.599-603, 1975.
- ADAMS, P.B. Comparisons of antagonists of *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, v.79, p.1345-1347, 1989.
- ADAMS, P.B.; AYERS, W.A. Factor affecting survival of *Sclerotinia sclerotiorum* in soil. **Plant Disease Reporter**, v.59, p.599-603, 1975.
- ADAMS, P.B.; AYERS, W.A. Ecology of *Sclerotina* species. **Phytopathology**, v.69, p.896-899, 1979.

- ADAMS, P.B.; AYERS, W.A. Histological and physiological aspects of infection of sclerotia of two *Sclerotinia* species by two mycoparasites. **Phytopathology**, v.73, p.1072-1076, 1983.
- AHMED, A.H.M.; TRIBE, H.T. Biological control of white rot of onion (*Sclerotinia cepivorum*) by *Coniothyrium minitans*. **Plant Pathology**, v.26, p.75-78, 1977.
- AYERS, W.A.; ADAMS, P.B. Mycoparasitism of sclerotia of *Sclerotinia* and *Sclerotium* species by *Sporidesmium sclerotivorum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.25, p.17-20, 1979.
- AYERS, W.A.; ADAMS, P.B. Mycoparasitism and its application to biological control of plant diseases. In: PAPAIVIZAS, G.C. ed. **Biological Control in Crop Protection**. Totowa: Allanheld & Osmum, 1981a, p.91-103.
- AYERS, W.A.; ADAMS, P.B. Mycoparasitism of sclerotial fungi by *Teratosperma oligocladum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.27, p.886-92, 1981b.
- AYERS, W.A.; ADAMS, P.B. Improved media for growth and sporulation of *Sporidesmium sclerotivorum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.29, p.325-330, 1983.
- BAKER, R. Biological control: an overview. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.8, p.218-221, 1986.
- BAKER, K.F.; COOK, R.J. **Biological Control of Plant Pathogens**. San Francisco:Freeman, 1974, 433p.
- BARNETT, H.L. The nature of mycoparasitism by fungi. **Annual Review of Microbiology**, 17, p.1-14, 1963.
- BARNETT, H.L.; BINDER, F.L. The fungal host-parasite relationship. **Annual Review of Phytopathology**, v.16, p.273-292, 1973.
- BAUTE, M.K.; RODRIGUES-KABANA, R. Effect of soil moisture, temperature and field environment on survival of *Sclerotium rolfsii* in Alabama and North Carolina. **Phytopathology**, v.71, p.1293-1296, 1981.
- BOOSALIS, M.G. Effects of soil temperature and green-manure amendment of unsterilized soil on parasitism of *Rhizoctonia solani* by *Penicillium vermiculatum* and *Trichoderma* sp. **Phytopathology**, 46: 473-78, 1956.
- BOOSALIS, M.C. Hyperparasitism. **Annual Review of Phytopathology**, v.2, p.363-375, 1963.
- BRUEHL, G.W. **Soilborne Plant Pathogens**. New York: MacMillan, 1987, 368p.
- BUDGE, S.P.; WHIPPS, J.M. Glasshouse trials of *Coniothyrium minitans* and *Trichoderma* species for the biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* in celery and lettuce. **Plant Pathology**, v.40, p.59-66, 1991.
- BULLOCKS.; ADAMS, P.B.; WILLETTS, H.J.; AYERS, W.A. Production of haustoria by *Sporidesmium sclerotivorum* in sclerotia of *Sclerotinia minor*. **Phytopathology**, v.76, p.101-103, 1986.
- BURDSALL, H.H.; HOCH, H.C.; BOOSALIS, M.G.; SETLIFF, E.G. *Laetisaria arvalis* (Aphyllphorales, Corticiaceae): a possible biocontrol agent for *Rhizoctonia solani* and *Phybitium* species. **Mycologia**, v.72, p.728-736, 1980.
- CASELA, C.R.; FREDERIKSEN, R.A. Survival of *Colletotrichum graminicola* sclerotia in sorghum stalk residues. **Plant Disease**, v.77, p.825-827, 1993.
- CASSIOLATO, A.M.R.; BAKER, R.; MELO, I.S. Parasitismo de *Sclerotinia sclerotiorum* e *S. minor* por mutantes de *Trichoderma barzianum*. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, p.12-22, 1996.
- CHET, I. The role of sclerotial ring in the germinability of sclerotia of *Sclerotium rolfsii*. **Canadian Journal of Botany**, v.47, p.593-595, 1969.
- CHET, I.; BAKER, R. Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma hamatum* from soil naturally suppressive to *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, v.71, p.286-290, 1981.
- CHET, I.; HENIS, Y.; MITCHELL, R. Chemical composition of mycelial and sclerotial walls of *Sclerotium rolfsii*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.13, p.137-141, 1967.
- CHET, I.; HARMAN, G.E.; BAKER, R. *Trichoderma hamatum*: its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Phybitium* spp. **Microbial Ecology**, v.7, p.29-38, 1981.
- CLOUD, G.L.; RUPE, J.C. Differences in the germination of *Macrophomina phaseolina* sclerotia in the presence of soybean and sorghum seed. **Phytopathology**, v.78, p.163, 1988.
- COLEY-SMITH, J.R. Studies of biology of *Sclerotium cepivorum* Berk. IV. Germination of sclerotia. **Annals of Applied Biology**, v.48, p.8-18, 1960.
- COLEY-SMITH, J.R. Survival of plant pathogenic fungi in soil in the absence of host plants. In: SCHIPPERS, B.; GAMS, W., ed. **Soilborne plant pathogens**. London: Academic Press, 1979, p.39-57.
- COLEY-SMITH, J.R. Sclerotia and other structures in survival. In: COLEY-SMITH, J.R.; VERHOEFF, K.; JARVIS, W.R. (ed.) **The biology of Botrytis**. London: Academic Press, 1980, p. 85-114.

- COLEY-SMITH, J.R. White rot disease of *Allium*: problems of soil-borne diseases in microcosm. **Plant Pathology**, v.39, p.214-222, 1990.
- COLEY-SMITH, J.R.; COOKE, R.C. Survival and germination of fungal sclerotia. **Annual Review Phytopathology**, v.9, p.65-92, 1971.
- COLEY-SMITH, J.R.; HOLT, R.W. The effect of species of *Allium* on germination in soil of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* Berk. **Annals of Applied Biology**, v.58, p.273-278, 1966.
- COLEY-SMITH, J.R.; KING, J.E. The production by species of *Allium* of alkyl sulphides and their effect on germination of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* Berk. **Annals of Applied Biology**, v.64, p.289-301, 1969.
- COLEY-SMITH, J.R.; JAVED, Z.V.R. Germination of sclerotia of *Botrytis tulipae*, the cause of tulip fire. **Annals of Applied Biology**, v.71, p.99-109, 1972.
- COLEY-SMITH, J.R.; KING, J.E.; DICKINSON, D.J.; HOLT, R.W. Germination of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* Berk. under aseptic conditions. **Annals of Applied Biology**, v.60, p.109-115, 1967.
- COOK, R.J.; BAKER, K.F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St. Paul: American Phytopathological Society, 1983. 539p.
- COOK, R.J.; SNYDER, W.C. Influence of host exudates on growth and survival of germlings of *Fusarium solani* f. *phaseoli* in soil. **Phytopathology**, v.55, p.1021-1025, 1965.
- COOK, G.E.; STEADMAN, J.R.; BOOSALIS, M.G. Survival of *Whetzelinia sclerotiorum* and initial infection of dry edible beans in Western Nebraska. **Phytopathology**, v.65, p.250-255, 1975.
- COOKE, R.C. Changes in soluble carbohydrates during sclerotium formation by *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. trifoliorum*. **Transactions of the British Mycological Society**, v.53, p.77-86, 1969.
- CROWE, F.J.; HALL, D.H.; GREATHEAD, A.S.; BAGHOTT, K.W. Inoculum density of *Sclerotium cepivorum* and the incidence of white rot of onion and garlic. **Phytopathology**, v.70, p.64-69, 1980.
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. **Transactions of the British Mycological Society**, v.57, p.41-48, 1971.
- DILLON-WESTON, W.A.R.; LOVELESS, R.A.; TAYLOR, E.R. Clover rot. **Journal of Agriculture Sciences**, v.36, p.18-28, 1946.
- DOBBS, C.G.; HINSON, W.H. A widespread fungistasis in soils. **Nature**, v.172, p.197-199, 1953.
- DUTTA, K. Studies on some fungi isolated from the rhizosphere of tomato plants and the consequent prospect for the control *Verticillium* Wilt. **Plant and Soil**, v.63, p.209-216, 1981.
- ELAD, Y.; CHET, Y.; BOYLE, P.; HENIS, Y. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfii* scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. **Phytopathology**, v.73, p.85-88, 1983.
- ELAD, Y.; HADAR, Y.; HADAR, E.; CHET, I.; HENIS, Y. Biological control of *Rhizoctonia solani* by *Trichoderma barzianum* in carnation. **Plant Disease**, v.65, p.675-677, 1981.
- ELAD, Y.; SADOWSKY, Z.; CHET, I. Scanning electron microscopical observations of early stages of interactions of *Trichoderma barzianum* and *Rhizoctonia solani*. **Transactions of the British Mycological Society**, v.88, p.259-263, 1987.
- ESLER, G.; COLEY-SMITH, J.R. Flavour and odour characteristics of species of *Allium* in relation to their capacity to stimulate germination of sclerotia of *Sclerotium cepivorum*. **Plant Pathology**, v.32, p.13-22, 1983.
- FAHIMA, T.; HENIS, Y. Quantitative assessment of the interaction between the antagonistic fungus *Talaromyces flavus* and the wilt pathogen *Verticillium dahliae* on eggplant roots. **Plant and Soil**, v.176, p.129-137, 1995.
- FAHIMA, T.; MADI, L.; HENIS, Y. Ultrastructure and germanability of *Verticillium dahliae* microsclerotia parasited by *Talaromyces flavus* on agar medium and in treated soil. **Biocontrol Science and Technology**, v.2, p.69-78, 1992.
- FARLEY, I.D.; WILHELM, S.; SNYDER, W.C. Repeated germination and sporulation of microsclerotia of *Verticillium albo-atrum* in soil. **Phytopathology**, v.61, p.260-264, 1971.
- FRAVEL, D.R.; KIM, K.K.; PAPAIVIZAS, G.C. Viability of microsclerotial of *Verticillium dahliae* reduced by a metabolite produced by *Talaromyces flavus*. **Phytopathology**, v.77, p.616-619, 1987.
- GARRETT, S.D. **Pathogenic root-infecting fungi** Cambridge: Cambridge University Press, 1970.
- GHAFFAR, A. Biological control of white rot of onion. II. Effectiveness of *Penicillium nigricans* (Bain.) Thom. **Mycopathology et Mycologia Applicata**, v.38, p.113-127, 1969.

- GHAFFAR, A. Some observations on the parasitism of *Coniothyrium minitans* on the sclerotina of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pakistan Journal of Botany**, v.4, p.85-87, 1972.
- GILBERT, R.G.; GRIEBEL, G.E. The influence of volatile substances from alfalfa on *Verticillium dahliae* in soil. **Phytopathology**, v.59, p.1400-1403, 1969.
- GREEN, R.J.; PAPAIVIZAS, G.C. Effect of carbon source, carbon to nitrogen ratios, on organic amendments on survival of *Verticillium albo-atrum* in soil. **Phytopathology**, v.58, p.567-571, 1968.
- GROGAN, R.G.; ABAWI, G.S. Influence of water potential on growth and survival of *Whetzelinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, v.65, p.122-128, 1975.
- HARRISON, Y.A.; STEWART, A. Selection of fungal antagonists for biological control of onion white rot in New Zealand. **New Zealand Journal of Experimental Agriculture**, v.16, p.249-256, 1988.
- HENIS, Y.; LEWIS, J.A.; PAPAIVIZAS, G.C. Interactions between *Sclerotium rolfsii* and *Trichoderma* spp. relationship between antagonism and disease control. **Soil Biology and Biochemistry**, v.16, p.371-375, 1984.
- HORA, T.S.; BAKER, R. Volatile factor in soil fungistasis. **Nature**, v.225, p.1071-1072, 1970.
- HUANG, H.C. Importance of *Coniothyrium minitans* in survival of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in wilted sunflower. **Canadian Journal of Botany**, v.55, p.289-295, 1977.
- HUANG, H.C. *Gliocladium catenulatum*: hyperparasite of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium* species. **Canadian Journal of Botany**, v.56, p.2224-2226, 1978.
- HUANG, H.C. Control of sclerotinia wilt of sunflowers by hyperparasites. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.2, p.26-32, 1980.
- HUANG, H.C. Morphologically abnormal sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.28, p.87-91, 1982.
- HUANG, H.C. Pathogenicity and survival of the tan-sclerotial strain of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.5, p.245-247, 1983.
- HUANG, H.C. Factor affecting mycelogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, v.75, p.433-437, 1985.
- HUANG, H.C.; HOES, J.A. Penetration and infection of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Coniothyrium minitans*. **Canadian Journal of Botany**, v.54, p.406-410, 1976.
- HUANG, H.C.; JANZEN, H.H. Control of carpogenic germination of *Sclerotinia sclerotiorum* by volatile substances from urea. **Plant Protection Bulletin**, v.33, p.283-289, 1991.
- HUANG, H.C.; KOKKO, E.G. Ultrastructure of hyperparasitism of *Coniothyrium minitans* on sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Botany**, v.65, p.2483-2489, 1987.
- HUANG, H.C.; KOKKO, E.G. Penetration of hyphae of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Coniothyrium minitans* without formation of apressoria. **Journal of Phytopathology**, v.123, p.133-139, 1988.
- HUANG, H.C.; KOZUB, G.C. Temperature requirements for carpogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates of different geographic origin. **Botanical Bulletin Academia Sinica**, v.32, p.279-286, 1991.
- HUANG, H.C.; KOZUB, G.C. Longevity of normal and abnormal sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v.78, p.1164-1166, 1994.
- JAGER, G.; HOOPEN, A.; VELVIS, H. Hyperparasitism of *Rhizoctonia solani* in Dutch potato fields. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v.85, p.253-268, 1979.
- JAGER, G.; VELVIS, H.; LAMERS, J.G.; MULDER, A.; ROOSJEN, J. Control of *Rhizoctonia solani* in potato by biological, chemical and integrated measures. **Potato Research**, v.34, p.269-284, 1991.
- JONES, D. Ultrastructure and composition of the cell walls of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Transactions of the British Mycological Society**, v.54, p.351-360, 1970.
- JONES, D.; WATSON, D. Parasitism and lysis by soil fungi of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, a phytopathogenic fungus. **Nature**, v.224, p.287-288, 1969.
- JONES, D.; GORDON, A.H.; BACON, J.S.D. Co-operative action by endo- and exo- β -(1-3)-glucanases from parasitic fungi in the degradation of cell-wall glucans of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. **Biochemical Journal**, v.140, p.47-55, 1974.

- KIM, K.K.; FRAVEL, D.R.; PAPAIVIZAS, G.C. Identification of metabolite produced by *Talaromyces flavus* as glucose oxidase and its role in the biocontrol of *Verticillium dahliae*. **Phytopathology**. v.78, p.488-492, 1988.
- KING, J.E.; COLEY-SMITH, J.R. Production of volatile alkyl sulphide by microbial degradation of synthetic alliin and alliin-like compounds, in relation to germination of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* Berk. **Annals of Applied Biology**. v.64, p.303-314, 1969.
- KRUGNER, T.L.; BACCH, L.M.A. Fungos. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L., ed. **Manual de Fitopatologia**. 3.ed. São Paulo:Agronômica Ceres, 1995, v.1, p.46-96.
- LARSEN, H.J.; BOOSALIS, M.G.; KERR, E.D. Temporary depression of *Rhizoctonia solani* field population by amendment with *Laetisaria arvalis*. **Plant Disease**. v.69, p.347-350, 1985.
- LEE, Y.A.; WU, W.S. The antagonisms of *Trichoderma* spp. and *Gliocladium virens* against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Protection Bulletin**. v.26, p.293-304, 1984.
- LE TOURNEAU, D. Trehalose and acyclic polyols in sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Mycologica**. v.58, p.934-942, 1966.
- LEWIS, J.A.; PAPAIVIZAS, G.C. A new approach to stimulate population proliferation of *Trichoderma* spp. and other potential biocontrol fungi introduced into natural soils. **Phytopathology**. v.74, p.1240-1244, 1984.
- LEWIS, J.A.; PAPAIVIZAS, G.C. Effect of mycelial preparations of *Trichoderma* and *Gliocladium* on populations of *Rhizoctonia solani* and the incidence of damping-off. **Phytopathology**. v.75, p.812-817, 1985.
- LEWIS, J.A.; PAPAIVIZAS, G.C.; HOLLENBECK, M.D. Biological control of damping-off of snapbeans caused by *Sclerotium rolfsii* in the greenhouse and field with formulation of *Gliocladium virens*. **Biocontrol**. v.3, p.109-115, 1993.
- LIU, S.; BAKER, R. Mechanism of biological control in soil suppressive to *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**. v.70, p.404-412, 1980.
- LUMSDEN, R.D.; RIDOUT, C.J.; VENDEMIA, M.E. Characterization of major secondary metabolites produced in soilless mix by a formulated strain of the biocontrol fungus *Gliocladium virens*. **Canadian Journal of Microbiology**. v.38, p.1274-1280, 1992.
- MAKKONEN, R.; POHAKALLIO, O. On the parasitism of the lysis of fungi by melanins. **Journal of Bacteriology**, v.94, p.624-629, 1960.
- MANIAN, S.; MANIBHUSHANRAO, K. Influence of some factors on the survival of *Rhizoctonia solani* in soil. **Tropical Agriculture**. v.67, p.207-208, 1990.
- MARROIS, J.J.; JOHNSTON, S.A.; DUNN, M.T.; PAPAIVIZAS, G.C. Biological control of *Verticillium* wilt of eggplant in the field. **Plant Disease**. v.66, p.1166-1168, 1982.
- MARSHALL, D.S. Effect of *Trichoderma barzianum* seed treatment and *Rhizoctonia solani* inoculum concentration on damping-off snap beans in acidic soils. **Plant Disease**. v.66, p.788-789, 1982.
- McLAREN, D.L.; RIMMER, S.R. Biological control of *Sclerotinia* wilt of sunflower by *Talaromyces flavus*. **Phytopathology**. v.73, p.822, 1983.
- McLAREN, D.L.; HUANG, H.C.; RIMMER, S.R. Hyperparasitism of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Talaromyces flavus*. **Canadian Journal of Plant Pathology**. v.8, p.43-48, 1986.
- MELO, I.S. Reação de berinjela (*Solanum melongena* L.) a *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berth. sob os aspectos de herança, patogenicidade, controle fitohormonal e biológico. Piracicaba: ESALQ-USP, 1984. 142p. Tese, Doutorado.
- MERRIMAN, P.R. Survival of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.8, p.385-389, 1976.
- MERRIMAN, P.R.; ISAACS, S.; MACGREGOR, R.R.; TOWERS, G.B. Control of white rot dry bulb onion with onion oil. **Annals of Applied Biology**. v.96, p.163-168, 1980.
- MITCHELL, S.J.; WHEELER, B.E.J. Factors affecting the production of apothecia and longevity of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Pathology**. v.39, p.70-76, 1990.
- NELSON, E.B.; HARMAN, G.E.; NASH, G.T. Enhancement of *Trichoderma*-induced biological control of seed rot and preemergence damping-off of peas. **Soil Biology and Biochemistry**. v.20, p.145-150, 1988.
- NELSON, E.B.; KUTER, G.A.; HOITINK, H.A.J. Effects of fungal antagonists and compost age on suppression of *Rhizoctonia* damping-off in container media amended with composted hardwood bark. **Phytopathology**. v.73, p.1457-1462, 1983.

- OLIVEIRA, V.L.; BELLEI, M.M.; BORGES, A.C. Control of white rot of garlic by antagonist fungi under controlled environmental conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, v.30, p.884-889, 1984.
- OLSSON, S.; NORDBRING-HERTZ, B. Microsclerotial germination of *Verticillium dahliae* as affected by rape rhizosphere. **FEMS Microbiology and Ecology**, v.31, p.293-299, 1985.
- PAPAVIZAS, G.C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, v.23, p.23-26, 1985.
- PAPAVIZAS, G.C.; LEWIS, J.A. Effect of *Gliocladium* and *Trichoderma* on damping-off and blight of snapbean caused by *Sclerotium rolfsii*. **Plant Pathology**, v.38, p.277-286, 1989.
- PATAKY, J.K.; BEUTE, M.K. Effects of inoculum burial, temperature, and soil moisture on survival of *Cylindrocladium crotalariae* microsclerotia in North Carolina. **Plant Disease**, v.67, p.1379-1382, 1983.
- PHILLIPS, A.J.L. *Gliocladium virens*: a hyperparasite of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytophylactica**, v.18, p.35-36, 1986.
- PHILLIPS, A.J.L. Fungi associated with sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in South Africa and their effects on the pathogen. **Phytophylactica**, v.21, p.135-139, 1989.
- PUNJA, Z.K.; GROGAN, R.G. Eruptive germination of sclerotia of *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathology**, v.71, p.1092-1099, 1981.
- ROBERTS, D.P.; LUMSDEN, R.D. Effect of extracellular metabolites from *Gliocladium virens* on germination of sporangia and mycelial growth of *Pythium ultimum*. **Phytopathology**, v.80, p.461-465, 1990.
- SAITO, I. Initiation and development of apothecial stipe primordia in sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Transactions of the Mycological Society of Japan**, v.14, p.343-351, 1973.
- SANTOS, A.F.; DHINGRA, D.D. Pathogenicity of *Trichoderma* spp on the sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Botany**, v.60, p.472-475, 1982.
- SCHREIBER, L.R.; GREEN, R.J. Comparative survival of mycelium, conidia, and microsclerotia of *Verticillium albo-atrum* in mineral soil. **Phytopathology**, v.52, p.288-289, 1962.
- SCHREIBER, L.R.; GREEN, R.J. Jr. Effect of root exudates on germination of conidia and microsclerotia of *Verticillium albo-atrum* inhibited by soil fungistatic principle. **Phytopathology**, v.53, p.260-264, 1963.
- SHORT, G.E.; WYLLIE, T.D. Inoculum potential of *Macrophomina phaseolina*. **Phytopathology**, v.68, p.742-746, 1978.
- SMITH, W.H. Germination of *Macrophomina phaseolina* sclerotia as affected by *Pinus lambertiana* root exudate. **Canadian Journal of Microbiology**, v.15, p.1387-1391, 1969.
- SNEH, B. Competition by non pathogenic *Rhizoctonia* isolates. In: International Symposium on *Rhizoctonia*, 1., Noordwijkerhout, 1995. **Anais**. Doetinchem: Royal Netherlands Society of Plant Pathology, 1995, p.115.
- SNEH, B.; ICHIELEVICH-AUSTER, M. Induced resistance of cucumber seedlings caused by some non pathogenic *Rhizoctonia* (np-R) isolates. In: International Symposium on *Rhizoctonia*, 1., Noordwijkerhout, 1995. **Anais**. Doetinchem: Royal Netherlands Society of Plant Pathology, 1995, p.121.
- STACK, J.P.; KENERLEY, C.M.; PEHNT, R. Influence of carbon and nitrogen sources, relative carbon and nitrogen concentration, and soil moisture on the growth in non-sterile soil of soilborne fungal antagonists. **Canadian Journal of Microbiology**, v.33, p.626-631, 1987.
- STEADMAN, J.R. Research on the epidemiology and control of *Sclerotinia* diseases in the United States with emphasis on white mold of bean. In: Australian Workshop on *Sclerotinia* Diseases and their control. Department of Agriculture, Newton, 1982, p.17-19.
- STEWART, A.; HARRISON, Y.A. Mycoparasitism of sclerotia of *Sclerotium cepivorum*. **Australasian Plant Pathology**, v.18, p.10-14, 1988.
- SUSSMAN, A.S. Longevity and survival of fungi. In: AINSWORTH, G.C.; SUSSMAN, A.S., ed. The fungi: an advanced treatise. New York: Academic Press, 1968, v.3, p.447-486.
- TOWNSEND, B.B.; WILLETTS, H.J. The development of sclerotia of certain fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, v.37, p.213-221, 1954.
- TRONSMO, A. *Trichoderma harzianum* used as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea* on apple. In: **Les antagonismes microbiens**. Bordeaux:INRA, 1983, p.109-113 (Les Colloques de L'INRA n.18).

- TRONSMO, A.; RAA, J. Life cycle of the dry eye rot pathogen *Botrytis cinerea* pers. on apple. **Phytopathologische Zeitschrift**. v.89, p.203-207, 1977.
- TU, J.C. *Gliocladium virens*, a destructive mycoparasite of *Sclerotinia sclerotiorum* **Phytopathology**. v.70, p.670-674, 1980.
- TU, J.C.; VAARTJA, O. The effect of the hyperparasite (*Gliocladium virens*) on *Rhizoctonia solani* and on *Rhizoctonia* roo rot of white bean. **Canadian Journal of Botany**, v.59, p.22-27, 1981.
- TRUTMANN, P.; KEANE, P.J. *Trichoderma koningii* as a biological control agent for *Sclerotinia sclerotiorum* in Southern Australia. **Soil Biology and Biochemistry**, v.22, p.43-50, 1990.
- TURNER, G.J.; TRIBE, H.T. On *Coniothyrium minitans* and its parasitism of *Sclerotinia* species. **Transactions of the British Mycological Society**, v.66, p.97-104, 1976.
- UECKER, F.A.; AYERS, W.A.; ADAMS, P.B. *Teratosperma oligocladium*, a new hyphomycete on sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum* and *S. minor*. **Mycotaxon**. v.10, p.421-427, 1980.
- VAN DER BOOGERT, P.H.J.F.; DEACON, J.W. Biotrophic mycoparasitism by *Verticillium biguttatum* on *Rhizoctonia solani*. **European Journal of Plant Pathology**, v.100, p.137-156, 1994.
- VAN DER BOOGERT, P.H.J.F. Mycoparasitism on *Rhizoctonia solani*. In: International Symposium on *Rhizoctonia*, 1., Noordwijkerhout, 1995. **Anais**. Doetinchem: Royal Netherlands Society of Plant Pathology, 1995, p 116.
- VAN DER BOOGERT, P.H.J.F.; DEACON, J.W. Biotrophic mycoparasitism by *Verticillium biguttatum* on *Rhizoctonia solani*. 1995. In: International Symposium on *Rhizoctonia*, 1., Noordwijkerhout, 1995. **Anais**. Doetinchem: Royal Netherlands Society of Plant Pathology, 1995, p.132.
- VAN DER BOOGERT, P.H.J.F.; JADER, G. Biological control of *Rhizoctonia solani* on potato by antagonists. 3. Inoculation of seed potatoes with different fungi. **Netherlands Journal of Plant Pathology**. v.90, p.117-126, 1984.
- WHETZEL, H.H. A synopsis of the genera and species of the Sclerotiniaceae. A family of stromatic inoperculate discomycetes. **Mycologia**. v.37, p.648-714, 1945.
- WHIPPS, J.M. Behavior of fungi antagonistic to *Sclerotinia sclerotiorum* on plant tissue segments. **Journal of General Microbiology**. v.133, p.1495-1450, 1987.
- WHIPPS, J.M. Effects of mycoparasites on sclerotia-forming fungi. In: BEEMSTER, A.B.R.; BOLLEN, G.L.; GERLAGH, M.; RUISSSEN, M.A.; SCHPPERS, B.; TEMPEL, A., ed. **Biotic interactions and soil-borne diseases**. Amsterdam: Elsevier, 1991, p.129-140.
- WILHELM, S. Aerial microsclerotia of *Verticillium* resulting from conidial anastomosis. **Phytopathology**, v.44, p.609-610, 1954.
- WILHELM, S. Longevity of the *Verticillium* wilt fungus in the laboratory and field. **Phytopathology**. v.45, p.180-181, 1955.
- WILLETTS, H.J.; BULLOCK, S. Developmental biology of sclerotia. **Mycological Research**. v.96, p.801-816, 1992.
- WILLETTS, H.J.; WONG, A.L. Ontogenetic diversity of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* and related species. **Transactions of the British Mycological Society**. v.57, p.515-524, 1971.
- WILLIAMS, G.H.; WESTERN, J.H. The biology of *Sclerotinia trifoliorum* Erikss. and others species of sclerotium-forming fungi. II. The survival of sclerotia in soil. **Annals Applied Biology**. v.56, p.261-268, 1965.
- ZAZZARINI, A.; TOSI, L. Antagonistic activity of fungi isolated from sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* **Plant Pathology**, v.34, p.415-421, 1985.

[The page contains extremely faint and illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the document. The text is arranged in approximately 25 horizontal lines across the page.]

6

ECOLOGIA DA ESPERMOSFERA

Wilmar Cório da Luz

EMBRAPA Trigo

Caixa Postal 569, CEP 99001-970, Passo Fundo, RS

INTRODUÇÃO

Espermosfera é a porção do solo que circunda uma semente em germinação e é influenciada por esta. Esse microbioma do solo tem recebido menos atenção do que a rizosfera (região do solo que circunda uma raiz e é influenciada por esta). Existem várias referências importantes à ecologia da rizosfera publicadas nas duas últimas décadas (Walker, 1975; Alexander, 1977; Barber & Lynch, 1977; Cooke, 1979; Lynch & Poole, 1979; Burns & Slater, 1982; Campbell, 1983; Fitter, 1985; Jensen *et al.* (1986); Richards, 1987; Paul & Clark, 1989; Lynch, 1990; Yanagita, 1990; Atlas & Bartha, 1993; Cooke & Whipps, 1993; O'Gara *et al.*, 1994; Dix & Webster, 1995; Tate, 1995). Entretanto, informações sobre a ecologia da espermosfera ainda não foram sintetizadas num compêndio. A semente, ao sair da fase de repouso ou dormência e iniciar o processo de germinação, exsuda compostos metabólicos. Mais tarde, sua decomposição resultará numa atividade microbiana intensa, ocasionando interações planta-microrganismo e microrganismo-microrganismo, que podem ser benéficas, neutras ou deletérias para cada um dos participantes. O objetivo deste capítulo é descrever a espermosfera, as interações entre a comunidade biológica e os fatores que interferem nesse habitat e que fazem dele um microbioma importantíssimo no ecossistema do solo.

CONCEITOS E DESCRIÇÃO DA ESPERMOSFERA

A palavra espermosfera é originária do idioma grego (*sperma* = semente, *sphera* = campo de influência) e foi introduzida por Verona (1958). Esse cientista definiu a espermosfera como “a zona do solo que envolve a semente em germinação”. Daí em diante, a espermosfera foi definida de diferentes maneiras. Lynch (1990) a definiu similarmente a Verona (1958), como “a região em volta da semente em germinação” e Roberts *et al.* (1994) a conceituaram como “o solo em volta da semente, que é influenciado pela semente”. Uma definição mais adequada e completa, entretanto, é apresentada na introdução, qual seja, “espermosfera é aquela porção do solo que circunda uma semente em germinação e é influenciada por esta”. Esse microbioma, portanto, compreende o microhabitat que circunda uma semente durante as diferentes fases da germinação e que está sob o domínio dela. Dois diagramas do sistema são mostrados nas Figs. 1 e 2. O espermoplano refere-se à superfície de uma semente e o termo, portanto, não deve ser usado como sinônimo de espermosfera, pois a definição de um ambiente deve envolver três dimensões, enquanto um plano envolve somente duas. Além disso, por menor que seja o tamanho de um microrganismo, a sua magnitude é invariavelmente tridimensional. A espermosfera e a rizosfera são delimitadas pelo final da germinação da semente (Fig. 2). Isto é, a rizosfera exclui o período de germinação da semente. Entretanto, é extremamente difícil estabelecer o estágio exato do término do período de germinação e do início do período de crescimento, pela própria definição de germinação. Segundo Mayer & Poljakoff-Mayber (1989), a germinação da semente é o processo pelo qual consecutivos eventos fazem com que uma semente seca, em repouso ou dormente, em resposta à absorção de água, mostre um aumento de atividade metabólica e inicie a formação de uma plântula. De uma maneira prática, geralmente, a germinação se inicia com a embebição da semente e termina com a saída da radícula. Esse processo faz com que os microrganismos próximos das sementes em germinação sejam estimulados pela existência de compostos provenientes de seus metabólitos, contidos nos exsudatos da semente, e mais tarde, pela sua decomposição ou pelas sementes mortas. Não são só esses produtos que fazem parte dos exsudatos das sementes, mas também alguns produtos químicos dos tecidos constituintes do perisperma passam em solução. Por exemplo, as sementes de

crucíferas contêm um invólucro denso de substâncias mucilaginosas, constituídas de polissacarídeos, que podem passar para uma solução no solo que circunda a semente, tornando-se parte do meio químico e influenciando a comunidade microbiológica na espermosfera. Alguns microrganismos podem sofrer inibição da germinação dos esporos pela presença dos exsudatos da semente. Sementes de trigo, de cevada e de leguminosas, por exemplo, apresentam propriedades antibióticas a certos fungos. Por outro lado, vários são os efeitos dos microrganismos sobre a semente e sobre a planta. Esses efeitos podem ser benéficos, neutros ou deletérios e serão discutidos mais adiante.

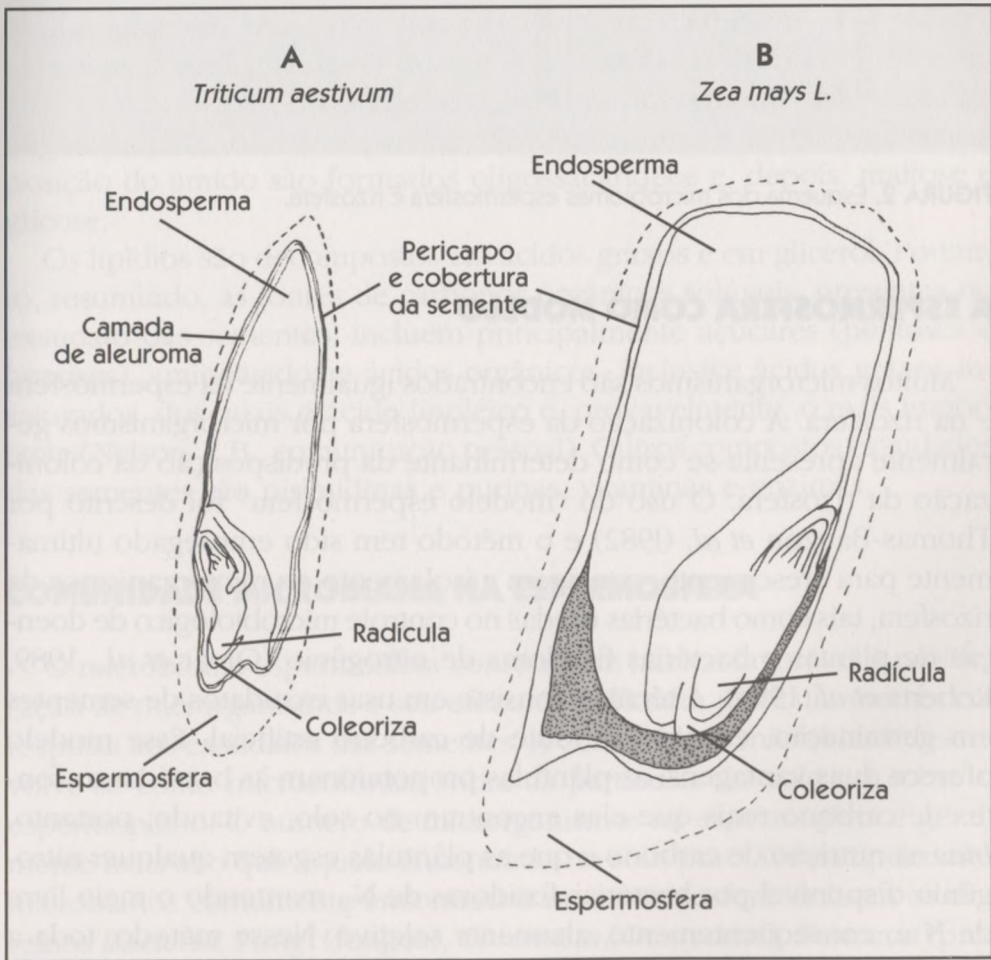


FIGURA 1. Espermosfera do trigo (A) e do milho (B).

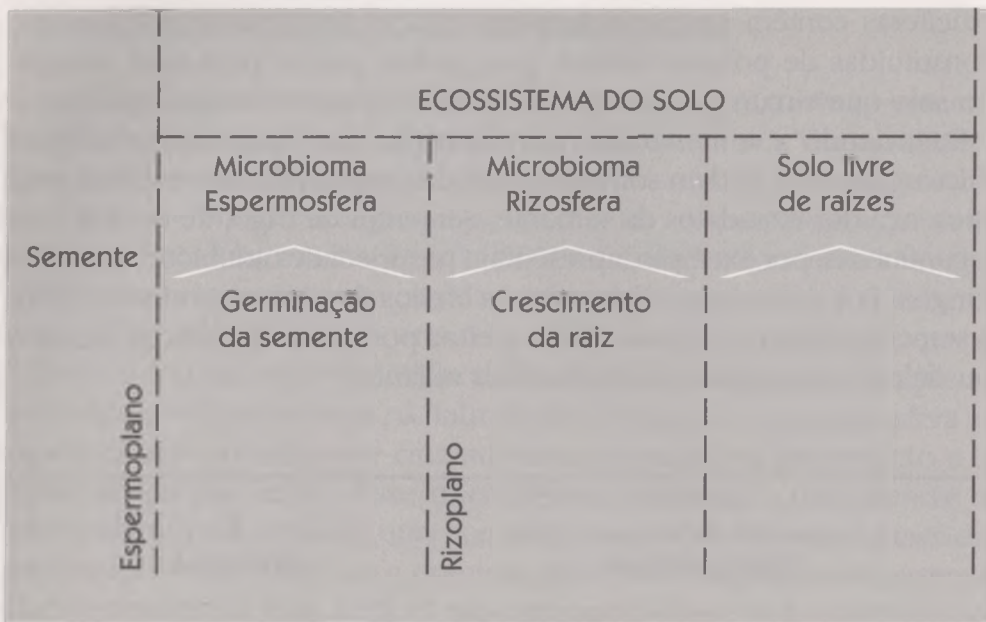


FIGURA 2. Esquema dos microbiomas espermosfera e rizosfera.

A ESPERMOSFERA COMO MODELO

Muitos microrganismos são encontrados igualmente na espermosfera e na rizosfera. A colonização da espermosfera por microrganismos geralmente apresenta-se como determinante da predisposição da colonização da rizosfera. O uso do "modelo espermosfera" foi descrito por Thomas-Bauzon *et al.* (1982) e o método tem sido empregado ultimamente para crescimento, contagem e isolamento de microrganismos da rizosfera, tais como bactérias usadas no controle microbiológico de doenças de plantas e bactérias fixadoras de nitrogênio (Omar *et al.*, 1989, Roberts *et al.*, 1994). A técnica consiste em usar exsudatos de sementes em germinação, em vez de fonte de carbono artificial. Esse modelo oferece duas vantagens: as plântulas proporcionam às bactérias as fontes de carbono reais que elas encontram no solo, evitando, portanto, *bias* na nutrição de carbono e que as plântulas esgotem qualquer nitrogênio disponível por bactérias fixadoras de N_2 , mantendo o meio livre de N e, conseqüentemente, altamente seletivo. Nesse método, toda a atividade da planta e das bactérias é derivada da semente. Por isso é chamado de "modelo espermosfera".

COMPOSIÇÃO DOS EXUDATOS

Como foi mencionado anteriormente, os nutrientes para os microrganismos provenientes do exsudato das sementes são considerados importantes para a atividade microbiana na espermosfera, e a composição do exsudato é o principal parâmetro para a seleção de espécies presentes na diversidade daquela comunidade. O exsudato da semente varia em composição, de acordo com a espécie de planta, condições de crescimento (principalmente temperatura e conteúdo de água) e fase de germinação.

Uma variedade de compostos pode estar contida no exsudato da semente, proveniente principalmente do metabolismo de componentes das sementes, tais como materiais de reserva (carboidratos e lipídios), proteínas e ácido nucléico (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1989; Nelson, 1990). Os principais carboidratos de reserva das sementes são o amido, oligo e polissacarídeos da parede celular e açúcares solúveis. Da decomposição do amido são formados oligossacarídeos e, depois, maltose e glicose.

Os lipídios são decompostos em ácidos graxos e em glicerol. Portanto, resumindo, as fontes de carbonos orgânicos solúveis, presentes no exsudato das sementes, incluem principalmente açúcares (pentoses e hexoses), aminoácidos e ácidos orgânicos, inclusive ácidos graxos insaturados, dos quais o ácido linoléico é, provavelmente, o mais importante (Nelson, E.B., comunicação pessoal). Outros compostos exsudados das sementes são pirimidinas e purinas, vitaminas e enzimas.

COMUNIDADE MICROBIANA NA ESPERMOSFERA

O microbioma espermosfera constitui um habitat favorável à proliferação de microrganismos e seu efeito é verificado, particularmente, em resposta aos exsudatos das sementes. A comunidade microbiana desenvolve-se como microcolônias sobre as partículas do solo ou sobre o espermoplano. O número de microrganismos na espermosfera é geralmente mais alto que aquele encontrado no solo puro. Os componentes microbianos comumente encontrados na espermosfera incluem os dos reinos *Bacteria*, *Fungi* (fungos), *Chromista* (*Oomycetes*), *Protozoa* (protozoários e microalgas) e os do reino *Animalia* (principalmente nematódeos). Esses microrganismos serão discutidos a seguir.

População do Reino *Bacteria* na Esfermosfera

Dentro do reino *Bacteria*, as bactérias e os actinomicetos são os microrganismos encontrados em maior número nesse microbioma. As populações de bactérias são estimuladas por moléculas exsudadas das sementes em germinação. Os principais gêneros de bactérias encontradas em solo esfermosférico são mostrados na Tabela 1. A maioria dessas bactérias é gram-negativa, principalmente *Pseudomonas* e *Flavobacterium*. Bactérias gram-positivas também são encontradas, como as do gênero *Bacillus*, e são mais adaptadas às condições áridas por poderem sobreviver como endósporos. Espécies de bactérias patogênicas às plantas podem entrar na esfermosfera através de sementes infectadas ou de materiais de plantas infectados. Tais gêneros são o gram-positivo *Corynebacterium* e os gram-negativos *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*. Longas listas de bactérias fitopatogênicas transmitidas por semente foram inseridas em compêndios extensos (Neegaard, 1977; Agarwal & Sinclair, 1987a,b; Swings & Civerolo, 1993). Os actinomicetos podem também ser encontrados na esfermosfera (Tabela 1). O gênero *Streptomyces* é o mais importante, concorrendo em número com os principais gêneros de bactérias e de fungos. Esses microrganismos também são bastante resistentes a solos secos.

TABELA 1. Principais gêneros do reino *Bacteria* presentes na esfermosfera.

BACTÉRIA	ACTINOMICETO
<i>Acinetobacter</i>	<i>Actinomyces</i>
<i>Agrobacterium</i>	<i>Micromonospora</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Nocardia</i>
<i>Arthrobacter</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>Bacillus</i>	
<i>Enterobacter</i>	
<i>Erwinia</i>	
<i>Flavobacterium</i>	
<i>Micrococcus</i>	
<i>Paenibacillus</i>	
<i>Pantoea</i>	
<i>Pseudomonas</i>	
<i>Xanthomonas</i>	

População dos Reinos *Fungi* e *Chromista* na Espermofera

Os microrganismos do reino *Fungi* (fungos) constituem a maior parte da biomassa do microbioma espermofera, embora sejam encontrados em número menor do que as bactérias. Isso se deve ao fato da magnitude desses microrganismos eucariotas ser maior do que a dos procariotas, como as bactérias.

Os principais gêneros dos reinos *Fungi* e *Chromista* encontrados na espermofera estão relacionados na Tabela 2. Os fungos mais frequentemente encontrados nesse microbioma são membros dos fungos mitospóricos pertencentes à classe de *Hyphomycetes*, havendo também um grande número de representantes da divisão *Zygomycota*. Membros da divisão *Ascomycota* ocorrem em menor quantidade.

Os membros dos *Coelomycetes* (fungos mitospóricos) são geralmente oriundos das sementes e têm sobrevivência mínima na espermofera.

As leveduras, também consideradas *Hyphomycetes*, são comuns na espermofera, e *Sporobolomyces*, *Rhodotorula* e *Cryptococcus* são as mais comumente encontradas (Tabela 2).

TABELA 2. Principais gêneros dos reinos *Fungi* e *Chromista* encontrados na espermofera.

REINO	DIVISÃO	CLASSE	GÊNERO	
Fungi	Fungos mitospóricos	Hyphomycetes	<i>Alternaria, Aspergillus, Bipolaris, Botrytis, Cephalosporium, Cladosporium, Cryptococcus, Curvularia, Gerlachia, Gliocladium, Fusarium, Penicillium, Rhodotorula, Sporobolomyces, Trichoderma, Verticillium</i>	
			Agonomycetes	<i>Rhizoctomia, Sclerotium</i>
			Coelomycetes	<i>Phoma, Pseudoseptoria</i>
			Zygomycota	<i>Rhizopus, Mucor</i>
			Ascomycota	<i>Chaetomium, Pleospora</i>
Chromista	Oomycota	Oomycetes	<i>Pythium, Saprolegnia</i>	

Representantes do reino *Chromista* da divisão *Oomycota* fitopatogênicos, como espécies de *Pythium* — geralmente seus esporângios e oósporos germinam somente após serem estimulados por compostos exsudados das sementes (Nelson, 1990). Embora não sejam transmitidos por semente, eles invadem a espermosfera e o espermoplano, destruindo as sementes.

População de Outros Reinos Presentes na Espermosfera

Habitantes da espermosfera pertencentes a outros reinos são membros do reino *Protozoa*, tais como protozoários e microalgas, e do reino *Animalia*, do qual os nematódeos são os membros mais representados.

INTERAÇÕES BIOLÓGICAS NA ESPERMOSFERA

Existem dois tipos principais de interações biológicas que podem ser observados na espermosfera, de acordo com a natureza dos organismos que interagem, isto é, planta-microrganismo e microrganismo-microrganismo. Em qualquer dessas interações, os efeitos podem ser benéficos, deletérios ou patogênicos e neutros.

Efeitos Benéficos

Os efeitos positivos exercidos por microrganismos podem ocorrer diretamente através do estímulo ao crescimento da planta na ausência de microrganismos patogênicos, ou indiretamente quando o crescimento é estimulado por um ou mais mecanismos, através da proteção microbiológica. Os mecanismos envolvidos nesses efeitos diretos ou indiretos estão relacionados na Tabela 3.

O controle microbiológico dá-se através da supressão de microrganismos deletérios, considerados como patógenos secundários, e/ou dos patógenos principais (através da interação microrganismo-microrganismo) ou planta-microrganismo (através da indução de resistência). Os mecanismos não serão discutidos em maiores detalhes neste capítulo por terem sido bastante discutidos recentemente (Luz, 1990; Klopper, 1993; Luz, 1993; Harman & Nelson, 1994; Luz, 1996). Entretanto, pode-se resumir esse tipo de interação, indicando que a maioria dos microrganismos que induzem bioproteção de plantas, se não todos, apresenta

vários mecanismos de ação, incluindo efeitos diretos e indiretos. Tais mecanismos têm sido estudados mais intensamente com os seguintes bioprotetores: *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *Bacillus subtilis* e *Trichoderma harzianum* (Luz, 1996). Esses exemplos são de bioprotetores aplicados artificialmente às sementes. Entretanto, a demonstração científica mais evidente de que o controle microbiológico é exercido na natureza, na espermosfera, é ilustrada pelo efeito mais destrutivo de um patógeno em solo autoclavado ou estéril do que em solo natural, onde há uma população ativa de microrganismos.

TABELA 3. Mecanismos de ação de microrganismos benéficos da espermosfera sobre as plantas (Luz, 1996, modificada).

EFEITO E MECANISMOS DE AÇÃO	LITERATURA
EFEITO DIRETO	
Aumento de nodulação de leguminosas por rizóbios	Halverson & Handelsman, 1991
Fitormônios	Boronin <i>et al.</i> , 1993
Fixação de nitrogênio	Lifshitz <i>et al.</i> , 1986b
Indução de resistência	Liu <i>et al.</i> , 1995a,b; Podile, 1993
Mineralização de nutrientes	Lifshitz <i>et al.</i> , 1986b; Kucey, 1987
EFEITO INDIRETO	
Ácido hidrocianico (HCN)	Ahl <i>et al.</i> , 1986; Stutz <i>et al.</i> , 1986
Aderência ao patógeno	Nelson <i>et al.</i> , 1986
Antibióticos	Lifshitz <i>et al.</i> , 1986a; Loeffler <i>et al.</i> , 1986; Howell, 1987; Thomashow & Weller, 1991
Bacteriocinas	Hara & Ono, 1993; Kerr, 1980; MacClure <i>et al.</i> , 1993
Competição por substrato	Elad & Chet, 1987; Nelson, 1992; Nelson <i>et al.</i> , 1986
Detoxificação do solo circundante	Walton & Anderson, 1990
Exclusão de nicho	Burr <i>et al.</i> , 1978
Inativação de estimulantes de propágulos de fungos presentes no exsudato de sementes	Van Dijk, 1995; Lifshitz <i>et al.</i> , 1986a
Parasitismo	Ordentlich <i>et al.</i> , 1988
Sideróforos	Tomashow & Weller, 1991

Efeitos Deletérios ou Patogênicos

Os efeitos negativos dos microrganismos espermosféricos são verificados pela ação deletéria, de patógenos secundários ou através da indução de doenças nas plantas por patógenos principais. Essas doenças podem ser transmitidas pelas sementes ou exclusivamente pelo solo. Neste último caso, os patógenos invadem a espermosfera e o espermoplano, através de estímulos oriundos do exsudato da semente. Inúmeros tipos de microrganismos associados às sementes têm sido assinalados em várias culturas (Malone & Muskett, 1964; Luz, 1977; Neegaard, 1977; Luz, 1982; Agarwall & Sinclair, 1987a,b; Ahmed & Reddy, 1993; Luz, 1995a). Para os microrganismos dos reinos *Fungi* e *Chromista*, particularmente, existem algumas chaves sistemáticas ilustradas para identificá-los com relativa facilidade (Luz, 1977; Watanabe, 1994; Ahmed & Reddy, 1993; Luz, 1995a,b). Alguns exemplos de microrganismos espermosféricos, que induzem doenças de plantas, estão relacionados na Tabela 4. A maioria desses microrganismos é transmitida pela semente, outros pelo solo, e há alguns transmitidos por ambos os meios. Alguns deles têm existência limitada à espermosfera.

Neutralismo

Esse fenômeno é observado nos dois tipos de interação: planta-microrganismo e microrganismo-microrganismo. O neutralismo é a ausência de efeitos benéficos, deletérios ou patogênicos. Até o momento, não foram encontradas funções para esses microrganismos além da habilidade saprofítica, havendo uma coexistência passiva com os demais.

FATORES QUE INFLUENCIAM OS MICRORGANISMOS NA ESPERMOSFERA

Vários fatores abióticos e bióticos influenciam o crescimento e a atividade microbiana na espermosfera. Uma quantidade significativa de informações origina-se de estudos realizados com a microbiolização de sementes de plantas (Harman *et al.*, 1988; Taylor & Harman, 1990; Luz, 1993). Os principais fatores que interferem na espermosfera são espécie de planta, água, temperatura, tipo de solo, exsudato da semente, fertilizantes, tratamento de sementes, presença de outros microrganismos e a interação de fatores ambientais.

TABELA 4. Exemplos representativos de microrganismos espermosféricos que induzem doenças de plantas.

PATÓGENO	HOSPEDEIRO	DOENÇA
<i>Alternaria brassicicola</i>	Repolho	Mancha preta
<i>Aspergillus niger</i>	Amendoim	Podridão do colo
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	Trigo	Ponta preta, morte de plântula, mancha marrom, podridão comum
<i>Cephalosporium maydis</i>	Milho	Podridão de semente, morte de plântula
<i>Corynebacterium flaccunfaciens</i> pv. <i>betae</i>	Beterraba	Prateado de beterraba
<i>Fusarium moniliforme</i>	Sorgo	Podridão de semente, podridão do colmo
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>pisi</i>	Ervilha	Queima bacteriana
<i>Pythium</i> spp.	Soja	Tombamento, podridão de semente
<i>Rhizoctonia solani</i>	Feijoeiro	Tombamento, mancha em reboleira
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Tomateiro	Mancha preta

Espécies de Plantas

O estabelecimento de um microrganismo na espermosfera depende fundamentalmente do tipo ou da espécie de planta. Esse fator interfere na seletividade e no tamanho da biomassa microbiana.

Água

A água e a temperatura são as duas condições mais importantes do ambiente que influenciam os microrganismos da espermosfera. A água, em sua forma líquida, é essencial para todos os processos bioquímicos.

Além da influência sobre a planta, a água do solo afeta não somente a umidade disponível para os microrganismos, mas também a aeração do solo, pH, pressão osmótica e quantidade de material solúvel. As bactérias têm sua atividade facilitada por alta umidade. A água também influencia a germinação dos esporos e a viabilidade de diversos fungos, incluindo vários fitopatógenos que sobrevivem na espermosfera. Por exemplo, *Fusarium culmorum* e *Gerlachia nivalis* desenvolvem-se mais facilmente em solos secos do que em solo úmido. Outros microrganismos do reino *Chromista*, como as espécies de *Pythium*, preferem condições úmidas.

Temperatura

Todos os microrganismos da espermosfera possuem um ótimo de temperatura, no qual exibem sua maior taxa de crescimento e reprodução. A temperatura do solo é um dos principais fatores que afetam a atividade microbiana. As atividades das células microbianas, como de qualquer outro organismo vivo, são governadas por leis da termodinâmica e, por isso, mudanças de temperatura do solo têm efeito marcante sobre a atividade biológica. Assim, os fungos e as bactérias, patogênicos ou não, têm suas atividades afetadas pela temperatura. Por exemplo, a atividade de biocontrole pelos bioagentes *Enterobacter cloacae* e *Erwinia herbicola* na espermosfera é mais fácil a 25°C do que a 15°C (Nelson, 1988). *Bacillus subtilis* é mais resistente à temperatura do que outras bactérias da espermosfera. Os endósporos de *B. subtilis* podem resistir a uma temperatura de 100°C por 20 a 50 minutos (Frazier & Westhoff, 1978). As espécies de *Trichoderma* são mais eficientes, como agentes de controle de doenças de plantas, a temperaturas entre 17-19°C do que entre 26-34°C (Harman *et al.*, 1981; Lifshitz *et al.*, 1986a).

Tipo de Solo

O tipo de solo afeta a taxa de germinação das sementes e, dessa maneira, influencia os microrganismos da espermosfera. As variáveis matéria orgânica e minerais, bem como as características físicas do solo, desempenham um papel importante na atividade microbiana na espermosfera. A reação oxidação-redução do solo também influencia esses microrganismos. Solos com mais oxigênio favorecem os microrganismos aeróbicos e a ausência de oxigênio inibe a presença deles. O pH

também é um fator importante, tanto para patógenos de plantas quanto para bioprotetores. Por exemplo, pH alto facilita a patogenicidade de *Gerlachia nivalis* em plantas de trigo. A bactéria *E. cloacae* é mais eficiente como bioprotetora em pH 6,6 do que em pH 4,1. O inverso é verificado com *Trichoderma* spp. (Harman & Taylor, 1988).

Exsudatos das Sementes

Existe geralmente um efeito positivo dos exsudatos das sementes sobre a população de microrganismos na espermosfera. Embora o assunto já tenha sido discutido anteriormente neste capítulo, é importante enfatizar esse fator. Os compostos produzidos nas sementes em germinação estimulam a germinação de propágulos de microrganismos (Nelson, 1990; Roberts *et al.*, 1994). Esporângios de espécies de *Pythium*, por exemplo, podem germinar dentro de uma a uma hora e meia, em resposta a componentes voláteis e não-voláteis dos exsudatos das sementes (Nelson, 1990). Igualmente, zoósporos de outros Oomycetes são quimiotacticamente atraídos pelas sementes em germinação.

Fertilizantes

A localização da aplicação e a quantidade de fertilizantes podem promover modificações na espermosfera, as quais têm efeito sobre a atividade microbiana. Por exemplo, aumentando o nível de nitrogênio, pode haver aumento ou diminuição de certos microrganismos na espermosfera.

Tratamento de Sementes

A proteção de sementes por produtos antimicrobianos (fungicidas, antibióticos) pode afetar o tipo e a quantidade de microrganismos na espermosfera.

Presença de Outros Microrganismos

Há vários tipos de interação entre microrganismos que interferem no desenvolvimento destes na espermosfera. O assunto já foi abordado anteriormente neste capítulo, onde se mostrou que a produção de antibióticos, a competição, o parasitismo e outras interações desempenham uma função importante na atividade microbiana.

Interação de Fatores Ambientais

Na natureza, os fatores ambientais nunca ou muito raramente agem independentemente. Umidade, temperatura, aeração do solo, pH, reação oxidação-redução e tipo de solo interagem e determinam efeitos sobre o crescimento e o tipo dos microrganismos que fazem parte do microbioma espermosfera.

CONCLUSÃO

A espermosfera é fundamentalmente um microcosmo da atividade microbiológica dentro do ecossistema solo. Esse microbioma é representado por uma diversidade de grupos de microrganismos dos reinos *Bacteria*, *Fungi*, *Chromista*, *Protozoa* e *Animalia*, que interagem com a planta e com outros participantes da comunidade microbiana, produzindo efeitos benéficos, deletérios ou patogênicos e neutros. Uma série de fatores bióticos e abióticos podem influenciar as interações. Dentro desse microbioma, os microrganismos recebem estímulos das sementes em germinação, oriundos do exsudato produzido por elas, que aumentam, em muitos casos, a atividade microbiológica. Isto é, a planta e os microrganismos, de certo modo, dependem um do outro e não podem viver otimamente sozinhos. Nesse habitat, a atividade positiva ou benéfica dos microrganismos pode ser exercida por meio do efeito direto na planta, que é responsável pelo aumento do crescimento e pela produção desta, ou também indiretamente, através do controle microbiológico das doenças de plantas. A atividade negativa é exercida por vários microrganismos que são patógenos secundários (deletérios) ou principais, isto é, causam doenças nas plantas, e numerosas delas são economicamente importantes. Todas essas interações fazem da espermosfera um microbioma ecologicamente importantíssimo no ecossistema do solo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, V.K.; SINCLAIR, J.B. **Principles of seed pathology**. Boca Raton: CRC Press, 1987a, v.1, 176p.
- AGARWAL, V.K.; SINCLAIR, J.B. **Principles of seed pathology**. Boca Raton: CRC Press, 1987b, v.2, 168p.
- AHL, P.; VOISARD, C.; DÉFAGO, G. Iron bound-siderophores, cyanic acid, and antibiotics involved in suppression of *Thielaviopsis basicola* by a *Pseudomonas fluorescens* strain. **Journal of Phytopathology**. Berlin, v.116, p.121-134. 1986.

- AHMED, K.M.; REDOY, C.R. **A pictorial guide to the identification of seedborne fungi of sorghum, pear millet, chickpea, pigeon pea, and groundnut**. Patnacheru: International Crop Research Institute for Semiarid Tropics (ICRISAT), 1993, 192p.
- ALEXANDER, M. **Introduction to soil microbiology**. New York: John Wiley, 1977, 467p.
- ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial ecology: fundamentals and applications**. 3. ed. Redwood City: The Benjamin/Cummings Publishing Company, 1993, 563p.
- BARBER, D.A.; LYNCH, J.M. Microbial growth in the rhizosphere. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.9, p.305-308, 1977.
- BORONIN, A.M.; KOCHETKOV, V.V.; DUBEIKOVSKY, A.N.; MORDUKHOVA, E.A. Biological control of soilborne plant pathogens by PGPR *Pseudomonas* isolated in Russia. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 6., Montreal, 1993. **Abstracts**. Montreal: International Society of Plant Pathology, 1993, p.276.
- BURNS, R.G.; SLATER, J.H. **Experimental microbial ecology**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1982, 683p.
- BURR, T.J.; SCHROTH, M.N.; SUSLOW, T.V. Increased potato yields by treatment of seedpieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*. **Phytopathology**. Saint Paul, v.68, p.1377-1383, 1978.
- CAMPBELL, R. **Microbial ecology**. New York: John Wiley, 1983, 191p.
- CHANWAY, C.P.; NELSON, L.M.; OLLI, F.B. Cultivar-specific growth promotion of spring wheat by coexistent *Bacillus* spp. **Canadian Journal of Microbiology**. Ottawa, v.34, p.925-929, 1988.
- COOKE, W.B. **The ecology of fungi**. Boca Raton: CRC Press, 1979, 274p.
- COOKE, R.C.; HIPPS, J.M. **Ecophysiology of fungi**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1993, 337p.
- ELAD, T.; CHET, I. Possible role of competition for nutrients in biocontrol of *Pythium* damping-off by bacteria. **Phytopathology**. Saint Paul, v.77, p.190-195, 1987.
- FITTER, A.F. **Ecological interactions in soil: plants, microbes, and animals**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1985, 399p.
- FRAZIE, W.C.; WESTHOFF, D.C. **Food microbiology**. New York: McGraw-Hill, 1978, 177p.
- HALVERSON, L.J.; HANDELSMAN, J. Enhancement of soybean nodulation by *Bacillus cereus* UW85 in the field and in a growth chamber. **Applied and Environmental Microbiology**. v.57, p.2767-2770, 1991.
- HARA, H.; ONO, K. Suppression of bacterial wilt of tobacco by weakly virulent bacteriocin-producing strain of *Pseudomonas solanacearum*. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 6. Montreal, 1993. **Abstracts**. Montreal: International Society of Plant Pathology, 1993, p.65.
- HARMAN, G.E.; CHET, I.; BAKER, R. Factors affecting *Trichoderma hamatum* applied to seeds as a biocontrol agent. **Phytopathology**, Saint Paul, v.71, p.569-72, 1981.
- HARMAN, G.E.; TAYLOR, A.G. Improved seedling performance by integration of biological control agents at favorable pH levels with solid matrix priming. **Phytopathology**. Saint Paul, v.78, p.520-525, 1988.
- HARMAN, G.E.; NELSON, E.B. Mechanisms of protection of seeds and seedling by biological seed treatments: implications for practical disease control. In: MARTINS, T., ed. **Seed treatment, progress and prospects**. Surrey: British Crop Protection Council, 1994, p.383-392.
- HOWELL, C.R. Relevance of mycoparasitism in the biological control of *Rhizoctonia solani* by *Gliocladium virens*. **Phytopathology**. Saint Paul, v.77, p.992-994, 1987.
- JENSEN, V.; KJOLLER, A.; SORENSEN, L.H. **Microbial communities in soil**. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1986, 447p.
- KERR, A. Biological control of crown gall through production of agrocin 84. **Plant Disease**. Saint Paul, v.64, p.25-30, 1980.
- KLOPPER, J.W. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. In: METTING, B. ed. **Soil microbial technologies**. New York: Marcel Dekker, 1986, p.255-274.
- KUCEY, R.M.N. Effect of *Penicillium bilaji* on the solubility and uptake of P and micronutrients from soil by wheat. **Canadian Journal of Soil Science**. Ottawa, v.68, p.261-270, 1987.
- LIFSHTIZ, R.; WINDHAM, M.T.; BAKER, R. Mechanisms of biological control of preemergence damping-off of pea by seed treatment with *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, Saint Paul, v.76, p.720-725, 1986a.

- LIFSHITZ, R.; SIMONSON, C.; SCHER, F.M.; KLOEPPER, J.W.; RODRICK-SEMPLE, C.; ZALESKA, I. Effect of rhizobacteria on the severity of *Phytophthora* root rot of soybean. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.8, p.102-106, 1986b.
- LIU, L.; KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, Saint Paul, v.85, p.843-847, 1995a.
- LIU, L.; KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against *Fusarium* wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, Saint Paul, v.85, p.695-698, 1995b.
- LUZ, W.C. da **Fungos associados as sementes de trigo** (chave ilustrada incluída) Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1977. 24p. (EMBRAPA-CNPT. Circular Técnica, 2).
- LUZ, W.C. da **Doenças da cultura da cevada**. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1982, 24p. (EMBRAPA-CNPT. Circular Técnica, 2).
- LUZ, W.C. da. Controle biológico das doenças na espermosfera. In: BETTIOL, W., org. **Controle biológico das doenças de plantas** Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991, p.25-31.
- LUZ, W.C. da. Microbiolização de sementes para o controle de doenças das plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, p.35-77, 1993.
- LUZ, W.C. da. **Chave sistemática ilustrada dos fungos das sementes de milho**. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1995a. Cartaz.
- LUZ, W.C. da. **Taxonomia dos fungos de sementes de trigo**. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1995b. Cartaz.
- LUZ, W.C. da. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, p.1-47, 1996.
- LYNCH, J.M. **The rhizosphere**. Chichester: John Wiley, 1990, 458p.
- LYNCH, J.M.; PEOLE, N.J. **Microbial ecology**: a conceptual approach. New York: John Wiley, 1979. 226p.
- McCLURE, N.C.; DONNER, S.C.; JONES, D.A.; ROSEWARNE, G.M.; TATE, M.E.; KERR, A.; FAJARDO, N.N.; CLARE, B.G. Agrocin 434, a new agrocin from the biocontrol strains *Agrobacterium* K84 and K1026, inhibits biovar 2 *Agrobacterium* and its synthesis is plasmid encoded. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 6., Montreal, 1993. **Abstracts**. Montreal: International Society Of Plant Pathology, 1993.
- MALONE, J.P.; MUSKETT, A.E. **Seed-borne fungi**: proceedings of the International Seed Test Association, 1964. 179p.
- MAYER, A.M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. **The germination of seeds**. 4.ed. Oxford: Pergamon Press, 1989. 179p.
- NEERGAARD, P. **Seed pathology**. London: Macmillan, 1977, 2v., 1187p.
- NELSON, E.B. Biological control of *Pythium* seed rot and preemergence damping-off of cotton with *Enterobacter cloacae* and *Erwinia herbicola* applied as seed treatments. **Plant Disease**, Saint Paul, v.72, p.140-142, 1988.
- NELSON, E.B. Bacterial metabolism of propagule germination stimulants as an important trait in the biocontrol of *Pythium* seed infections. In: TJAMOS, E.C. *et al.* eds. **Biological control of plant diseases**: progress and challenges for the future. New York: Plenum Publishing Company, 1992. p.353-357.
- NELSON, E.B.; CHAO, W.L.; NORTON, J.M.; TASH, G.T.; HARMAN, G.E. Attachment of *Enterobacter cloacae* to hyphae of *Pythium ultimum*: possible role in the biological control of *Pythium* preemergence damping-off. **Phytopathology**, Saint Paul, v.76, p.327-335, 1986.
- NELSON, E.B. Exsudate molecules initiating fungal responses to seeds and roots. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.129, p.61-73, 1990.
- O'GARA, F.; DOWLING, D.N.; BOESTEN, B. **Molecular ecology of rhizosphere microorganisms** Biotechnology and the release of GMOs. New York: VCH Publishers, 1994. 177p.
- OMAR, A.M.N.; RICHARD, P.; WEINHARD, P.; BALANDREAU. Using the spermosphere model technique to describe the dominant nitrogen-fixing microflora associated with wetland rice in two Egyptian soils. **Biology and Fertility of Soils**, Ottawa, v.7, p.158-163, 1989.
- ORDENTLICH, A.; ELAD, Y.; CHET, I. The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.78, p.84-88, 1988.
- PAUL, E.A.; CLARK, F.E. **Soil microbiology and biochemistry** San Diego: Academic Press, 1989. 273p.
- RICHARDS, B.N. **The microbiology of terrestrial ecosystems**. New York: Longman: John Wiley, 1987, 399p.

- ROBERTS, D.P.; SHORT JR., M.N.; MALONEY, A.P.; NELSON, E.B.; SCHAFF, D.A. Role of colonization in biocontrol: studies with *Enterobacter cloacae*. **Plant Science**, Clare, Ireland, v.101, p.83-89, 1994.
- SWINGS, J.G.; CIVEROLO, E.L. *Xanthomonas*. London: Chapman & Hall, 1993, 339p.
- TATE, R.L. **Soil microbiology**. New York: John Wiley, 1995, 398p.
- TAYLOR, A.G.; HARMAN, G.E. Concepts and technologies of selected seed treatments. **Annual Review of Phytopathology**. Palo Alto, v.28, p.321-339, 1990.
- THOMAS-BAUZON, D.; WEINHARD, P.; VILLECOURT, P.; BALANDREAU, Y. The spermosphere model. I. Its use in growing, counting, and isolating N-fixing bacteria from the rhizosphere of rice. **Canadian Journal of Microbiology**. Ottawa, v.28, p.922-928, 1982.
- THOMASHOW, L.S.; WELLER, D.M. Role of antibiotics and siderophores in biocontrol of take-all disease of wheat. In: KEISTER, D.L.; CREGAN, P.B., ed. **The rhizosphere and plant growth**. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 1992. p.245-252.
- TUZUN, S.; KLOEPPER, J.W. Potential application of plant growth-promoting rhizobacteria to induce systemic disease resistance. In: REUNVENI, ed. **Novel approaches to integrated pest management**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1995, p.115-127.
- VAN DIJK, K. Seed exsudate stimulant inactivation by *Enterobacter cloacae* and its involvement in the biological control of *Pythium ultimum*. Ithaca: Cornell University, 1995, 96p. M.Sc. Dissertation.
- VERONA, O. La spermosphere. **Annales Institut Pasteur**, Paris, v.95, p.795-798, 1958.
- WALKER, N. **Soil microbiology**. New York: John Wiley, 1975, 262p.
- WALTON, B.T.; ANDERSON, T.A. Microbial degradation of trichloroethylene in the rhizosphere: potential application to biological remediation of waste sites. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, DC, v.56, p.1012-1016, 1990.
- WATANABE, T. **Pictorial atlas of soil and seed fungi**. Boca Raton: Lewis Publishers: CRC Press, 1994. 411p.
- YANAGITA, T. **Natural microbial communities: ecological and physiological features**. Tokyo: Japan Scientific Societies Press, Berlin: Springer-Verlag, 1990. 485p.

CONFIDENTIAL - SECURITY INFORMATION

CONFIDENTIAL - SECURITY INFORMATION

CONFIDENTIAL - SECURITY INFORMATION

CONFIDENTIAL - SECURITY INFORMATION

CONFIDENTIAL - SECURITY INFORMATION

CONFIDENTIAL - SECURITY INFORMATION

CONFIDENTIAL - SECURITY INFORMATION

CONFIDENTIAL - SECURITY INFORMATION

CONFIDENTIAL - SECURITY INFORMATION

CONFIDENTIAL - SECURITY INFORMATION

CONFIDENTIAL - SECURITY INFORMATION

CONFIDENTIAL - SECURITY INFORMATION

CONFIDENTIAL - SECURITY INFORMATION

CONFIDENTIAL - SECURITY INFORMATION

CONFIDENTIAL - SECURITY INFORMATION

CONFIDENTIAL - SECURITY INFORMATION

CONFIDENTIAL - SECURITY INFORMATION

CONFIDENTIAL - SECURITY INFORMATION

CONFIDENTIAL - SECURITY INFORMATION

CONFIDENTIAL - SECURITY INFORMATION

CONFIDENTIAL - SECURITY INFORMATION

CONFIDENTIAL - SECURITY INFORMATION

MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA
E SUA APLICAÇÃO EM ESTUDOS
GENÉTICOS E ECOLÓGICOS

PARTE II

MÉTODOS AVANÇADOS DE ESTUDOS APLICADOS À ECOLOGIA MICROBIANA

PARTE II

MÉTODOS AVANZADOS
DE ESTUDOS APLICADOS
A ECOLOGÍA MICROBIANA

7

MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA E SUA APLICAÇÃO EM ESTUDOS GENÉTICOS E ECOLÓGICOS

Maria Cléria Valadares-Inglis

EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia
Caixa Postal 2372, CEP 70770-900, Brasília, DF

Itamar Soares de Melo

EMBRAPA Meio Ambiente
Caixa Postal 69, CEP 13820-000, Jaguariúna, SP

INTRODUÇÃO

Com o advento da engenharia genética, tornou-se fundamental o investimento em métodos de extração de DNA em diferentes tipos de organismos, para viabilizar técnicas de caracterização, identificação e análise de variações gênicas, bem como em estudos populacionais e ecológicos. A obtenção de DNA permite análises de organismos selvagens e transgênicos, estudos de integração de genes transformantes, isolamento de genes homólogos e heterólogos, estudos de variabilidade genética de populações, bem como taxonomia de organismos. Aplicações da PCR (Reações da Polimerase em Cadeia) no melhoramento vegetal e de microrganismos, mapeamento de genes e avaliação da diversidade genética requerem métodos cada vez mais simples e confiáveis para isolamento de DNA, devido ao grande número de amostras que são analisadas nesses estudos.

Inúmeros métodos de extração têm sido desenvolvidos, sendo que, de modo geral, todos os procedimentos envolvem a quebra ou digestão de paredes e membranas para possibilitar a liberação do conteúdo celular. Essa quebra usualmente é feita pela maceração de tecidos e/ou

unidades celulares, em presença de gelo seco ou nitrogênio líquido, com o auxílio de pistilo e mortar ou com processador de alimentos.

Após essa quebra, o DNA é liberado em um tampão de extração que normalmente contém detergentes, usualmente SDS (dodecil sulfato de sódio) ou CTAB (brometo de cetilmetilamonio). A partir dessa etapa, o DNA deve ser protegido das nucleases endógenas, sendo para isso adicionado ao tampão outro detergente, EDTA (etilenodiaminotetraacético). O EDTA tem propriedades quelantes, ligando-se aos íons magnésio da suspensão, que são geralmente considerados co-fatores necessários à maioria das nucleases.

À mistura tampão/macerado celular é adicionado clorofórmio e/ou fenol, para desnaturação e separação de proteínas ligadas ao DNA. Nessas etapas, deve-se evitar agitações vigorosas, que podem causar quebras e/ou dobramentos do material genético. A extração deve ser feita com fenol neutralizado. Geralmente, as amostras são extraídas por adição de 1,0 volume de fenol neutralizado (com tampão TE, pH 7.5).

Ao término do isolamento, o DNA é normalmente coletado por processos de centrifugação e/ou aderência em superfícies como vidro, sendo então concentrado, lavado e suspenso em água ou tampões que permitam seu armazenamento.

Baseados nesses princípios, vários métodos vêm sendo desenvolvidos e otimizados, com o objetivo de minimizar o tempo de extração e a obtenção de materiais de alta pureza. Diversos são os métodos em uso, e a escolha do protocolo depende do material a ser usado, isto é, plantas, fungos, bactérias, insetos e amostras de solo, bem como a aplicação do DNA, que vai requerer diferentes graus de pureza.

EXTRAÇÃO DE DNA EM DIFERENTES TIPOS DE ORGANISMOS

Plantas

Métodos gerais podem ser usados para extrair o DNA de diferentes espécies de plantas, bem como de diferentes partes dessas. Assim, pode-se obter DNA de folhas, embriões, sementes etc. De acordo com Ferreira & Grattapaglia (1995), embora o DNA de amostras herbarizadas ou mesmo fósseis tenha sido isolado com sucesso, o uso de tecido novo, colhido na fase ativa de crescimento das plantas, geralmente apresenta melhores resultados. O objetivo principal é recuperar a quantidade

máxima de DNA de alto peso molecular, evitando contaminação com proteínas e outros inibidores de enzimas de restrição.

O processo de extração nesse tipo de organismo envolve basicamente a quebra da parede celular, até a obtenção de pó, em presença de gelo seco. Em alguns casos, areia esterilizada é adicionada à amostra para auxiliar a quebra. Adiciona-se ao pó coletado tampão CTAB* (cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide) 2x (2% w/x CTAB, 100 mM Tris pH 8.0, 20 mM EDTA pH 8.0, 1.4 M NaCl e 1% PVP, polyvinylpyrrolidone, Mr 40000). Adiciona-se um volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), mistura-se vigorosamente e centrifuga-se a 1100 g por 30 min. Coleta-se o sobrenadante em novo tubo e adiciona-se 1/10 volumes de 10% de CTAB (10% CTAB, 0,7 M NaCl) e mistura-se. Proceda-se nova extração com clorofórmio/álcool isoamílico. Ao sobrenadante adiciona-se igual volume do tampão de precipitação CTAB (1% CTAB, 50 mM Tris pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0) e mistura-se vagarosamente. Após centrifugação, descarta-se o sobrenadante e ressuspende-se o precipitado em tampão TE (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0, 1 M NaCl). Adiciona-se dois volumes de etanol 100% e mistura-se vagarosamente. Centrifuga-se por 5 a 15 minutos e descarta-se o sobrenadante. Lava-se o precipitado com etanol 80% e centrifuga-se por 5 minutos. O precipitado é então seco por 20 a 30 minutos ou até o líquido evaporar. Reidrata-se o precipitado com 0.1 x TE (1 mM Tris pH 8.0, 0.1 mM EDTA pH 8.0). Trata-se com RNase quando necessário (Rogers & Brandich, 1988).

A eficiência desse e de outros métodos de extração está relacionada ao uso de partes específicas de plantas, contendo diferentes concentrações de nucleases. De acordo com Rogers & Brandich (1988), DNA isolado da base de folhas de trigo apresenta dois tipos de nucleases, um tipo estimulado por magnésio e outro por EDTA.

Outra observação importante refere-se à presença de fortes colorações em DNAs extraídos de alguns tecidos, o que muitas vezes os torna resistentes a enzimas de restrição. Nesse caso, a adição de PVP no tampão de extração é recomendada, uma vez que PVP inibe a atividade de fenoloxidase. O uso de metanol contendo 0,1% de mercaptoetanol também é recomendado, no caso de tecidos de plantas contendo grandes quantidades de resinas ou compostos fenólicos, os quais interferem na solubilização do DNA (Möller *et al.*, 1992).

*CTAB é um potente inibidor da enzima Taq DNA polimerase. No caso de DNA para PCR, recomenda-se diluir CTAB ou omitir do tampão de extração.

O uso de técnicas de PCR e RAPD para análise de populações tem levado à busca de métodos simplificados de extração de DNA, uma vez que tais técnicas não requerem grandes fragmentos de DNA (ver capítulo sobre PCR neste volume). Assim, Guidet (1994) publicou um método simples baseado na quebra de tecidos de plantas em presença de proteinase K, EDTA e sarcosil, com posterior fervura da amostra por 5 minutos, para inativação da proteinase K, que pode afetar a *Taq* polimerase. O método consiste na quebra de tecidos, seguidos da adição de 100 μl de tampão de extração (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0, EDTA 0.45 M, proteinase K 1 mg/ml, SDS 1%). A mistura é incubada a 50°C por 1 hora e então diluída com 150 μl de água. A 20 μl desse extrato é adicionado 80 μl de água, seguido de 10 μg de RNase, sendo a mistura fervida por 5 minutos. Após poucos minutos à temperatura ambiente, 10 μl dessa solução é diluída com 240 μl de água. A solução final está pronta para uso em PCR, sendo usados 5 μl em mistura com 15 μl da reação de PCR. Mais recentemente, Steiner *et al.* (1995) publicaram um método ainda mais simples, sendo que a extração de amostras para uso em PCR é conduzida em um só tubo. Às amostras de tecidos macerados são adicionados 200 μl de tampão de extração ROSE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 312.5 mM EDTA, pH 8.0, 1% SDS e 1% polyvinylporrolidone, PVP). Os tubos são vigorosamente agitados em vortex e incubados em fornos de hibridização a 90°C por 20 minutos, com agitação constante. A seguir, as amostras são incubadas em gelo por 5 minutos, para permitir a deposição de tecidos e PVP. Alíquotas são coletadas para diluição e amplificação. As diluições podem ser estocadas por vários meses a 4°C. Para PCR, 10 μl do extrato original é diluído 170 vezes em água, sendo usados 2.5 μl da diluição e reações cujo volume final seja de 12.5 μl .

Procedimentos ainda mais simples de isolamento de DNA vegetal têm sido desenvolvidos para uso em PCR. Muitos desses funcionam somente para um número limitado de espécies ou tecidos. Sabe-se que tecidos vegetais variam em relação à facilidade com que o DNA pode ser isolado. A natureza da parede da célula quanto à composição e espessura, e a presença de polissacarídeos e metabólitos secundários podem influenciar o sucesso do processo de extração. O método de Berthomien & Myer (1991) emprega o tecido vegetal diretamente na mistura de PCR. No entanto, esse procedimento apresenta vantagem somente nos casos onde o PCR pode tolerar a presença de quaisquer outros componentes vegetais. Para vencer esses problemas, Thonson &

Henry (1995) desenvolveram um método extremamente simples para preparação de DNA de muitas espécies vegetais, em que usam uma pequena quantidade de tecido vegetal aquecido em uma solução simples. O DNA presente no sobrenadante foi ideal para a maioria das aplicações da técnica de PCR, incluindo RAPD e PCR com "primers" específicos. O seguinte protocolo foi usado: a um tubo de microcentrifuga esterilizado contendo 20 μl de TPS (100 mM Tris HCl, pH 9.5, 1 M KCl, 10 mM EDTA), um pedaço de folha de 2 mm^2 ou 0.5 mg de pedaço de embrião foi adicionado e incubado a 95°C por 10 minutos. Uma alíquota de 1 μl do sobrenadante é usada diretamente na mistura de PCR ou proceder-se-á uma diluição, se inibidores estiverem presentes.

Bactérias

Vários são os métodos descritos para extração de DNA genômico de bactérias. Existem variações no que se refere às bactérias gram-positivas e gram-negativas. Recentemente, Lema *et al.* (1994) descreveram um método bastante simples que, com algumas etapas a mais, apresenta-se altamente eficiente para ambos os tipos de bactérias. Bactérias gram-positivas ou gram-negativas são coletadas (1 colônia ou 10 μl , o que corresponde a uma alçada) e ressuspensas em 100 μl de tampão TE (10 mM Tris-OH, 1 mM EDTA, pH 7.4), em tubos de eppendorf 1.5 ml. As gram-negativas não requerem nenhum outro tratamento, antes da adição do tampão de lise TESN (10 mM Tris-OH, 1 mM EDTA, 1% Sarkosil, 6 M NaI pH 7.4). No entanto, as bactérias gram-positivas devem ser centrifugadas por 5 minutos e ressuspensas em 200 μl de acetona. Após incubação em gelo por 5 minutos e à temperatura ambiente por mais 5 minutos, segue-se a centrifugação por 5 minutos. O precipitado é, então, secado a vácuo e ressuspendido em 100 μl de tampão TE contendo 2 mg/ml de lisozima e incubado por 1 hora a 37°C. O restante do processo é comum a todos os tipos de bactérias. Adiciona-se 300 μl do tampão de lise TESN à suspensão bacteriana e mistura-se por inversão. Incuba-se a 65°C por 5 minutos. Adiciona-se igual volume de isopropanol, agita-se vigorosamente e incuba-se por 5 minutos à temperatura ambiente, centrifugando-se em seguida por 2 minutos. O precipitado é ressuspendido em 500 μl de isopropanol 40%. Após centrifugação, o precipitado é então lavado com 1 ml de ethanol 70%, recentrifugado, e o DNA secado a vácuo. Finalmente, o DNA pode ser ressuspendido em água (100-200 μl) e armazenado a 4°C.

Um rápido método de extração de DNA genômico bacteriano usando guanidina tiocianato foi descrito recentemente por Inglis (1995). Células crescidas por uma noite são coletadas em tubos eppendorf, 2.0 ml, centrifugadas e lavadas em tampão previamente gelado (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA, 1 M NaCl, pH 7.5). Ressuspender as células em 100 μ l de tampão TE. Lisar as células com 0.5 ml GES, agitar e incubar à temperatura ambiente por 5 a 10 minutos Resfriar em gelo e adicionar 0.25 ml de 7.5 M acetato de amônia, misturar e manter em gelo por 10 minutos. Adicionar 0.5 ml de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e misturar vigorosamente. Centrifugar por 10 minutos a 1300 rpm. Transferir o sobrenadante para um tubo novo e adicionar 0.54 volumes de isopropanol frio. Inverter o tubo e centrifugar a 6500 g por 20 segundos. Lavar o DNA 5x com ethanol 70% e finalmente lavar com 200 μ l de éter, tendo o cuidado de não perder o DNA precipitado. Secar e ressuspender em água ou tampão TE.

Fungos Filamentosos

Diferentes laboratórios usam diferentes métodos para extração de DNA genômico de fungos adaptados ao número de amostras a serem analisadas, bem como sua aplicação, ou seja, dependendo do grau de pureza requerido, para uso em técnicas de Southern blot ou PCR. Basicamente, todos os protocolos utilizam micélio fúngico, podendo ser este liofilizado ou simplesmente congelado. A liofilização facilita o processo de quebra do micélio e permite que este seja mantido a temperaturas em torno de -80°C para uso posterior. O protocolo descrito por Raeder & Broda (1985) baseia-se no uso de micélio liofilizado. Cerca de 50 mg de micélio quebrado é transferido para tubo eppendorf, adiciona-se 500 μ l de tampão de extração (200 mM Tris-HCl pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS) e mistura-se de forma a permitir a completa penetração do tampão no micélio. Adiciona-se 350 μ l de fenol e 150 μ l de clorofórmio, mistura-se por inversão e centrifuga-se por 1 hora a 13000 x g. O sobrenadante é então coletado e transferido para novo tubo eppendorf e tratado com 25 μ l de solução de RNase A (20 mg ml^{-1} em 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 15 mM NaCl, fervido por 10 minutos e estocado a -20°C) e incubado a 37°C por 5 a 10 minutos. A solução é extraída com igual volume de clorofórmio e centrifugada a 13000 x g por 10 minutos. O sobrenadante é novamente transferido para novo tubo eppendorf, adiciona-se 0.54 volumes

de isopropanol e mistura-se por inversão. O DNA precipitado pode ser visto e coletado com o auxílio de uma pipeta pasteur ou centrifugado. O precipitado é então lavado em álcool 70%, secado e ressuspenso em tampão TE ou água. A etapa de extração com clorofórmio/fenol deve ser repetida inúmeras vezes para a obtenção de DNA com maior grau de pureza. Outra variação do protocolo refere-se ao tempo de incubação com a RNase A, que pode ser prolongada por um período de 1 hora ou mais, para a completa remoção do RNA contaminante. A etapa de precipitação pode ser modificada, usando-se 10% do volume final de 3M acetato de sódio mais duas vezes e meia o volume de álcool. A vantagem desse método, apesar de trabalhoso, é a qualidade do DNA obtido, que pode ser facilmente digerido com enzimas de restrição.

Um método simplificado, menos trabalhoso que o anterior, foi desenvolvido por Lee & Taylor (1990) para o isolamento de DNA total, obtendo DNA de boa qualidade (Fig. 1) que pode ser amplificado a partir de pequenas quantidades de micélio fresco ou congelado a partir de amostras de herbário, particularmente basidiocarpos armazenados por 30 anos. A amplificação de tais amostras permite comparar a variabilidade genética presente em amostras coletadas muitos anos atrás com amostras de materiais recentes. Esse método tem funcionado para todos os membros de fungos examinados, incluindo os Oomicetos, Zigomicetos, Deuteromicetos, Ascomicetos e Basidiomicetos.

Outros protocolos para extração de DNA genômico de fungos filamentosos são descritos, sendo que muitos deles apresentam eficiência em termos de qualidade do DNA obtido e são mais simples. No caso de utilização para amplificação, o DNA não precisa apresentar alto grau de pureza, uma vez que seqüências genômicas de cópias únicas podem ser rotineiramente amplificadas a partir de 1 μ g de DNA total (Saiki *et al.*, 1988). Se a seqüência-alvo está presente em cópias múltiplas, uma quantidade inicial bem menor, como 0,1 a 10,0 ng de DNA total é requerida. Ademais, a separação de genomas nucleares e de organelas não é necessária, pois a amplificação é dirigida pelo "primer" específico, e os "primers" podem ser sintetizados para amplificar frações de DNA de organelas ou seqüências genômicas. A amplificação via PCR de seqüências de rDNA de um único ascosporo de *Neurospora tetrasperma* foi alcançada por Lee & Taylor (1990). A amplificação de fragmentos de DNA específicos a partir de um único esporo, segundo os autores, seria útil para estudos de freqüências de recombinação e liga-

ção genética com espécies cujos esporos não podem ser germinados. Alguns protocolos reportam o uso de colunas de purificação como, por exemplo, o método descrito por Cambareri & Kinsey (1993). O protocolo baseia-se na quebra de micélio liofilizado, adição de 1 ml de tampão de extração (2 M NaCl, 0.4% deoxycolic acid-Sigma D6750, 1% Brij 59-polyoxyrethylene 20 cetyl ether, Sigma P-5884) e incubação à temperatura ambiente por 20 minutos. Centrifugar por 5 minutos a 13000 x g, coletar o sobrenadante e transferir para tubo eppendorf contendo 1 ml de terra de diatomáceas (DE-Sigma D-5384) em 6M Guanidine Thiocyanate (8.5 g de DE em 100 ml de Guanidine Thiocyanate); que

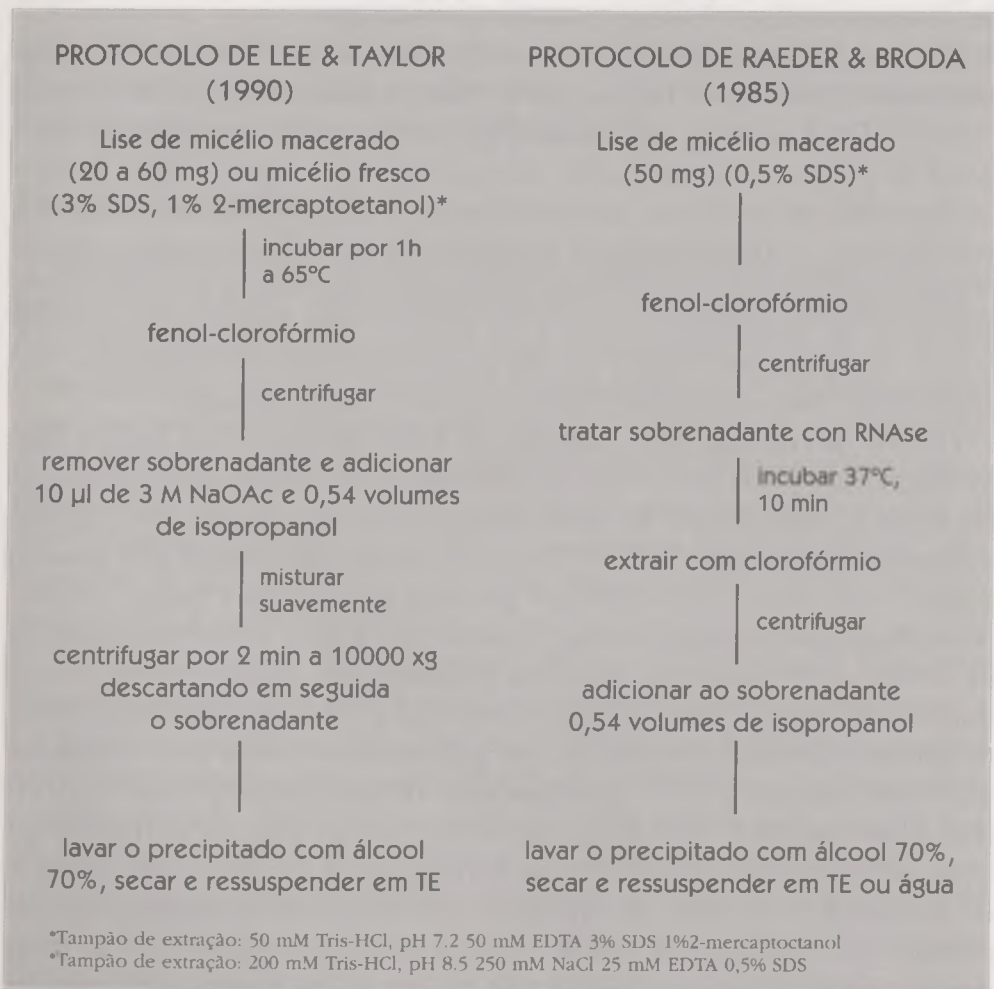


FIGURA 1. Comparação de métodos de extração de DNA a partir de micélio de fungos.

pode ser mantida em temperatura ambiente por até 6 meses. Incubar à temperatura ambiente por 3 minutos. Transferir para colunas (preparadas em seringas de 3 ml, com lâ de vidro siliconizada ou pré-fabricadas) e filtrar por aspiração. Lavar 3 vezes com 2 ml de isopropanol 80%. Aspirar por mais 20 minutos para secar o DE. Colocar as seringas em tubos de 15 ml contendo um tubo eppendorf na ponta para coleta do DNA. Adicionar 150 μ l de água destilada esterilizada e aquecida a 65°C. Centrifugar por 1 minuto a 13000 x g. Repetir o procedimento mais uma vez para coletar o DNA restante. De acordo com os autores, tal protocolo produz de 5 a 30 μ g de DNA de alta qualidade.

Variações envolvem principalmente alterações nos tampões de extração. De-Graaf *et al.* (1988) reportam um método utilizando tampão de extração TNS preparado pela adição de 1 ml de tri-isopropyl-naphthalene (TNS) (20 mg/ml), 1 ml de *p*-amonosalicylic acid (PAS) (120 mg/ml) e 0.5 ml 5x RNB (5x RNB contendo 121.1 g Tris, 73.04 g NaCl e 95.10 g EGTA por litro, pH 8.5).

Alguns autores reportam o isolamento de DNA a partir de protoplastos (Pfeifer & Khachatourians, 1989), o que facilita a liberação do material genético pela digestão da parede celular com enzimas hidrolíticas isoladas de *Trichoderma viride* e *Penicillium funiculosum*. No entanto, o referido protocolo requer a extração com fenol/clorofórmio, não apresentando, assim, nenhuma vantagem no que se refere à eficiência em termos de custos e tempo consumido no processo.

Protocolos desenvolvidos para células eucarióticas, de modo geral, podem ser aplicados na extração de DNA em fungos filamentosos. Métodos usados para plantas, como o descrito por Möller *et al.* (1992), que se baseia no uso de SDS/proteinase K para inativação de proteínas e CTAB aquecido, em presença de SDA e altas concentrações de sais, para precipitação de polissacarídeos, vêm sendo usados com sucesso em fungos.

Solos e Sedimentos

O solo possui uma população de microrganismos que pode ser analisada através de métodos moleculares, pela extração de DNA diretamente de amostras de solos e de sedimentos. A extração de DNA e posterior observação de amplificação por PCR oferece várias possibilidades de estudos ecológicos do ambiente terrestre, como, por exemplo, estudos sobre diversidade microbiana através de fragmentos amplificados de seqüências ribossomais 16S presentes no DNA extraído

do solo (Giovannoni *et al.*, 1990; Schmidt *et al.*, 1991). O isolamento de ácidos nucléicos a partir de amostras de ambiente naturais tem se mostrado uma ferramenta preciosa para detectar bactérias que não podem ser cultivadas (Ward *et al.*, 1990), para determinar o destino de bactérias selecionadas ou genes recombinantes sob condições naturais (Steffan & Atlas, 1988), e revelar a diversidade genética e suas mudanças em ecossistemas microbianos (Torsvik *et al.*, 1990). Devido à presença de misturas de compostos químicos complexos, a purificação de ácidos nucléicos de solos e de sedimentos apresenta-se mais difícil do que a purificação de DNA de culturas puras. Entretanto, tal procedimento permite uma análise da flora microbiana, seja via hibridização DNA-DNA, uso de técnicas como PCR, por seqüenciamento ou até mesmo outros métodos como RFLP, sendo que este último apresenta baixa especificidade principalmente por causa da quantidade de fragmentos de DNA produzidos pela digestão com enzimas de restrição, os quais são difíceis de serem distinguidos (Saano *et al.*, 1995).

Em geral, os métodos disponíveis para extração de DNA do solo são demorados e requerem grande tamanho das amostras, grandes quantidades de reagentes e uso de compostos orgânicos tóxicos. No caso de DNA para PCR, a amplificação pode ser inibida por contaminantes difíceis de serem removidos do DNA extraído mesmo após vários passos de purificação (Steffan & Atlas, 1988). As células microbianas podem se ligar fortemente a colóides do solo, principalmente àqueles ricos em matéria orgânica e argilosos, dificultando a obtenção de produções superiores de DNA de alto peso molecular. Extrações de DNA de solos e sedimentos sempre resultam em co-extração de substâncias húmicas que interferem na detecção de DNA. Esse tipo de contaminação pode inibir a Taq DNA polimerase em reações de PCR (Tsai & Olson, 1992), interferir na digestão de enzimas de restrição (Posteus & Armstrong, 1993), reduzir a eficiência de transformação e especificidade na hibridização do DNA (Steffan & Atlas, 1988). Assim, desde que substâncias húmicas são difíceis de serem removidas, a purificação do DNA é uma etapa crítica para se obter um DNA com alto grau de pureza. A purificação de DNA de sedimentos marinhos tem sido difícil, dados os seguintes problemas: resistência de bactérias à lise, encapsulamento em matrizes poliméricas complexas (DeFlaun & Mayer, 1983) e fraca recuperação de DNA da fase sólida do sedimento, que é rica em silicatos, argilas e materiais orgânicos (Ogram *et al.*, 1987).

O uso de métodos moleculares na identificação de populações microbianas no solo baseia-se na lise das células e purificação do DNA microbiano por centrifugação diferencial. Esses métodos variam tanto em especificidade quanto em sensibilidade. Vários métodos são descritos, utilizando-se repetidas centrifugações, lise das células com detergentes catiônicos ou lisozima, separação e purificação de DNA com cloreto de césum e brometo de etídio, uso de resina para troca iônica, cromatografia de troca iônica e outros (ver revisão de Saano *et al.*, 1995).

Sayler *et al.* (1992) citam dois métodos gerais para extrair ácidos nucléicos de amostras ambientais, elaborados por Holben *et al.* (1988) e por Ogram *et al.* (1987), que incluem, respectivamente, a separação indireta de células e a própria extração com lise direta. A Fig. 2 sumariza as etapas destes processos.

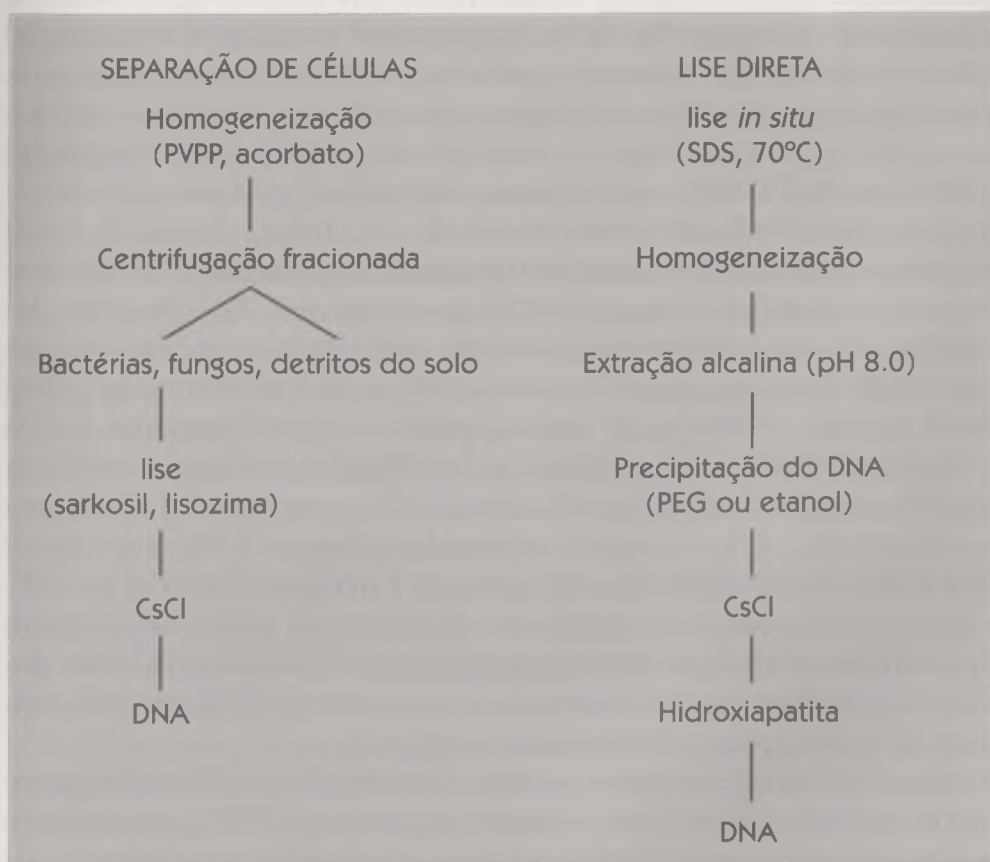


FIGURA 2. Comparação dos métodos de extração de DNA de solos e sedimentos através de separação de células (Holben *et al.*, 1988) e extração direta (Ogram *et al.*, 1987).

Tsushima *et al.* (1995) descreveram o isolamento de DNA em amostras de solo, visando a identificação de microrganismos geneticamente modificados. Amostras de 1 g são misturadas com 0.5g de PVPP (polyvinylpolypyrrolidone) em tubos de centrífuga (30 ml). Adiciona-se 9 ml de CaCl_2 (1%) e mistura-se vigorosamente por 1 minuto antes da incubação a 4°C por 1 hora. O sobrenadante das amostras deixadas para sedimentação é então coletado em outro tubo e centrifugado a 6000 x g por 10 minutos. O precipitado é, então, ressuspenso em 1% de CaCl_2 e colocado em tubo de centrífuga (39 ml) contendo 5 ml de sucrose (76% w/v). Após vigorosa agitação, adiciona-se 7.5 ml de sucrose (76%) e centrifuga-se por 10 minutos a 7500 x g. A fração superior é, então, coletada e transferida para novo tubo, ao qual se adiciona 18 ml de água destilada esterilizada. Centrifuga-se a 6000 x g por 30 minutos e o precipitado obtido é, então, ressuspenso em 1 ml de água destilada esterilizada. A seguir, 500 μl da suspensão é usada para extração de DNA. O método de extração reportado pode também ser usado para extração direta, sem isolamento dos organismos, o que apresenta economia em termos de tempo. O método mais simplificado foi publicado por Saano *et al.* (1995), assim descrito: adicionar 1 g de solo em tubo de polipropileno (15 ml) contendo 2.5 ml do tampão fosfato (12 mM Na_2HPO_4 (pH 8.0), 1% de SDS, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteinase K). Misturar bem e incubar por 1 hora a 37°C para promover a lise completa das células. Adicionar 450 μl de cloreto de sódio (5M) preparado em tampão CTAB. Homogeneizar e adicionar 375 μl de CTAB (10%) em 0.7 M NaCl. Incubar a 65°C por 20 minutos para a completa desnaturação das proteínas e liberação dos polissacarídeos ligados ao DNA. Centrifugar por 15 minutos a 9000 x g a 4°C. Coletar a fase superior e transferir para um novo tubo. Adicionar igual volume de isopropanol. Misturar e incubar por 1 hora a -20°C. Centrifugar por 15 minutos a 10000 x g a 4°C. Secar o precipitado e ressuspenso em 200 μl de água esterilizada. A quantidade de DNA obtido acompanha as variações do protocolo, porém a qualidade permite o isolamento de material suficiente para análises de populações e/ou indivíduos específicos.

Um método mais simples e rápido de extração de DNA diretamente do solo foi sugerido por Porteus & Armstrong (1993). Esse método produz DNAs tanto de fungos como de bactérias, separados de contaminantes do solo por eletroforese em gel de aganose. Cinquenta amostras de 20 mg de solo podem ser processadas em um dia. Frag-

mentos de rRNAs de 16S e 18S são amplificados via PCR com DNA extraído do solo. O método consiste em se coletar amostras de 20 mg de solo e agitar por 1 minuto em 400 μ l de tampão de extração (200 mM Tris-HCl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS). Incubar à temperatura ambiente por 10-60 minutos, agitar em vortex por 1 minuto e centrifugar por 5 minutos a 12000 x g. Coletar 200 μ l do líquido sobrenadante e misturar com 200 μ l de isopropanol, incubando a mistura à temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugando a 12000 x g por 5 minutos. O "pellet" é seco ao ar e suspenso em água. Aproximadamente 15 μ l desses extratos são submetidos a eletroforese para separar os DNAs de RNA, ácidos húmicos, taninos etc. Blocos de agarose contendo DNA são retirados do gel sob luz ultravioleta. Adiciona-se aos blocos de agarose igual volume de água, aquecendo-se a 65°C por 10 minutos. As misturas são novamente aquecidas a 65°C por 10 minutos, agitadas em vortex por 5 segundos e usadas para PCR. A vantagem desse método é que o DNA extraído na presença do gel de agarose pode ser amplificado sem qualquer adicional purificação.

Novos procedimentos foram incorporados por Lovell & Piceno (1994) para estabelecer métodos de lise direta, a fim de melhorar a qualidade do DNA recuperado de sedimentos. Preparação de DNA, recuperados de sedimentos de estuário foram incubados com acetato de amônia e brometo de etídio, extraído com fenol e as soluções aquosas de DNA precipitadas com isopropanol. Esses tratamentos reduziram significativamente a quantidade de contaminantes, mas não produziram DNA puro para digestão com enzima de restrição. Esse DNA parcialmente purificado foi de novo purificado usando cromatografia de troca iônica, produzindo DNA suscetível à digestão.

Extração rápida de DNA e rRNA de sedimentos foi proposta por Purde *et al.* (1996) utilizando-se coluna de hidroxiapatita (HTP), que tem sido usada como matriz de coluna de cromatografia de alta eficiência para separar ácidos nucléicos de proteínas. Nesse método, a coluna com HTP extrai, junto ou separadamente, DNA purificado ou rRNA a partir de amostras de sedimentos naturais, sem a necessidade de passos adicionais para rRNA, como a purificação enzimática. A grande vantagem de se isolar separadamente rRNA e DNA da mesma amostra é a possibilidade de avaliar a atividade metabólica relativa de uma comunidade através de sonda de rRNA (Stahl *et al.*, 1988).

Vários trabalhos têm sido relatados, com o objetivo de aumentar as produções de DNA proveniente do solo e sedimentos, usando tratamentos físicos como sonicação para lisar células de microrganismos indígenas. Nesse tipo de extração, o DNA pode não ser adequado para análise de comunidades baseado em PCR-*Taq* DNA, devido à formação de produtos químicos com pouca quantidade de DNA "template" (Liesack *et al.*, 1991).

Insetos

Métodos moleculares vêm sendo recentemente aplicados em estudos de populações de insetos, visando a identificação de polimorfismo em populações, incluindo mosquitos, gafanhotos, mosca branca e mosca da fruta, dentre outros (Haymer, 1994). O monitoramento da presença de alelos específicos, relacionados à resistência a inseticidas pelo uso da técnica de PCR vem sendo usado com sucesso, como no exemplo de estudos relacionados com *Drosophila* sp. (Aronstein *et al.*, 1995). Hunt & Page Jr. (1992) estudaram os padrões de herança genética de marcas moleculares em abelhas haplodiplóides, através de técnicas de RAPD. Para extração de DNA, foram usados insetos congelados em gelo seco e mantidos a -70°C . Os insetos foram então macerados em tubos de microcentrífuga, em presença do tampão CTAB. Amostras foram incubadas a 60°C por 2 horas e extraídas com clorofórmio/fenol. O DNA foi então precipitado com álcool absoluto e ressuspenso em tampão TE para uso em amplificação.

Estudos dessa natureza envolvem basicamente análise de DNA genômico, e para tanto são desenvolvidos e/ou adaptados métodos de isolamento de DNA. Métodos usados para plantas, microrganismos e mesmo sedimentos de solo apresentam grande eficiência quando aplicados a insetos. Estudos envolvendo populações de insetos utilizam um grande número de exemplares, sendo, portanto, aplicáveis os métodos convencionais. Entretanto, estudos que requerem o uso de indivíduos isolados exigem adaptações, uma vez que alguns insetos são de tamanho muito reduzido. Gawel & Bartlett (1993) estudaram diferenças entre moscas brancas, usando métodos de extração de DNA de insetos individualizados. Indivíduos foram macerados com micropistilo em tubos de microcentrífuga de 1.5 ml, contendo $60\ \mu\text{l}$ de tampão de lise (5 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5 M EDTA, 0,5% Nonidet P-40 e 1 mg/ml de proteinase

K). A solução de Tris-EDTA foi autoclavada antes da adição de Nonidet P-40 e proteinase K. Após a quebra do tecido, a mistura foi transferida para tubos eppendorf 0.5 ml e aquecida em termociclador por 15 minutos a 65°C, em seguida por 10 minutos a 95°C. A solução de DNA foi então dividida em alíquotas de 0.5 a 2.0 µl que foram congeladas a -80°C para uso posterior. Método similar foi usado por Edwards & Hoy (1993) para estudos de parasitóides dos gêneros *Trioxys pallidus* e *Diglyphus begini*. Insetos adultos foram congelados a -80°C, em tubos eppendorf. Os tubos foram, então, imersos em nitrogênio líquido e macerados por 5 a 10 vezes com pistilo, também previamente congelados com nitrogênio líquido. Para cada espécie foram adicionados 200 µl de 5% (p/v) de solução de Chelex (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). Cada tubo foi descongelado por agitação vigorosa. Após essa etapa, os tubos foram colocados em termociclador e aquecidos a 56°C por 15 minutos, e então a 100°C por 4 minutos. Finalmente, as amostras foram centrifugadas (>100 g por 15 segundos), sendo o sobrenadante coletado cuidadosamente, para posterior uso em RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA, ver capítulo sobre PCR nesse volume).

CONCLUSÕES

Inúmeros são os métodos a serem usados para extração de DNA genômico e pequenas alterações devem ser feitas em protocolos, visando a obtenção de DNA com as qualidades requeridas. Assim, métodos simples de extração podem ser adaptados, evitando-se o uso de técnicas de purificação, extremamente trabalhosas e que usam reagentes altamente tóxicos. Em alguns casos, como por exemplo a extração de DNA de bactérias, kits comerciais estão disponíveis e produzem grandes quantidades de material com metodologias bastante simples. Uma das grandes vantagens de se isolar DNA de amostras ambientais reside na detecção e recuperação de organismos não-cultiváveis ou de genes pobremente selecionáveis.

Nesse contexto, relatos disponíveis indicam que todas as formas de DNA podem ser recuperadas de amostras ambientais. É possível, portanto, desenvolver uma base molecular para determinar a complexidade genética para comunidades microbianas, a abundância quantitativa de organismos e genes específicos e a atividade instantânea para genes específicos em um dado ambiente (Sayler *et al.*, 1992).

NOTA

Preparação do Fenol

É recomendado usar fenol líquido, grau técnico, rejeitando-se fenol de coloração rosada ou amarelada e fenol cristalino. Esse deve ser redistilado para remover produtos de oxidação, que causam ligações cruzadas RNA-DNA e a quebra de bandas de fosfodiéster. Na extração de DNA com a utilização de fenol, esse deve ser equilibrado a um pH superior a 7.5. A neutralização pode ser feita com tampão TE, adicionando igual volume de 10 mM Tris.HCl, pH 7.5-8.0, 1 mM EDTA, fase aquosa (fase superior). Repetir a operação até que o pH da fase aquosa esteja entre 7.5 e 8.0. Armazenar a 4°C.

Fenol/Clorofórmio/Álcool Isoamílico (25:24:1)

Mistura usada para separação de proteínas de DNA. Adiciona-se 100 ml de fenol saturado em TE, 100 ml de clorofórmio, 4 ml de álcool isoamílico. Essa mistura deve ser armazenada em frascos escuros a 4°C por até quatro semanas.

Quantificação do DNA Extraído

As técnicas mais empregadas e acuradas para medir a concentração de DNA são aquelas determinadas através de espectrofotômetro e através de fluorescência depois de corado o gel com brometo de etídio. O DNA na solução deve estar totalmente solubilizado e não pode estar contaminado com proteínas, fenol ou RNA. Uma alíquota de 25 μ l das amostras de DNA é diluída em 475 μ l de tampão TE. A mistura pode ser aquecida a 37°C por um período de 10 a 15 minutos. Uma densidade ótica (DO) de absorbância de 1.0 corresponde a 50 μ l/ml de DNA de fita dupla e 40 μ g para DNA de fita simples ou RNA. Assim, a concentração de DNA na amostra em μ g/ml = $DO_{260} \times$ fator de diluição \times 50. Uma estimativa da pureza é feita calculando-se a razão da DO a 260 e 280 nm. Um valor da ordem de 1.8 (DO_{260}/DO_{280}) pode ser considerado um DNA puro. Equipamentos modernos são hoje usados para quantificação a exemplo de fluorômetros e analisadores de imagem, permitindo maior precisão dos resultados.

RNAse

Mistura-se 100 μ l de RNAse, 25 μ l de 1 M Tris-HCl, pH 7.6 e 375 μ l de água bidestilada. No processo de extração de DNA, uma grande quantidade de RNA é também precipitada, o que causa leituras espectrofométricas falsas no momento da quantificação do DNA isolado. Quando o DNA contaminado com RNA é digerido com endonucleases e submetido a eletroforese, o DNA é carregado adiante pelo RNA. A grande distância migrada resulta em uma subestimação dos tamanhos dos fragmentos de DNA. Assim, as amostras devem ser tratadas com RNAse a 37°C, aproximadamente, por tempo variável de 10 minutos a 1 hora. A RNAse deve ser aquecida antes do uso para eliminar qualquer contaminante de DNase. A RNAse é removida através da extração com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARONSTEIN, K.; ODE, P.; FRENCH-CONSTANT, R.H. PCR based monitoring of specific *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) cyclodiene resistance alleles in the presence and absence of selection. **Bulletin of Entomological Research**, v.85, p.5-9, 1995.
- BERTHOLOMIEN, P.; MEYER, C. Direct amplification of plant genomic DNA from leaf and root pieces using PCR. **Plant Molecular Biology**, v.17, p.555-557, 1991.
- CAMBARERI, E.B.; KINSEY, J.A. An ultra-fast method of DNA extraction from *Neurospora*. **Fungal Genetics Newsletter**, v.40, p.22-23, 1993.
- DE FLAUN, M.F.; MAYER, L.M. Relationships between bacteria and grain surface in intertidal sediments. **Limnology and Oceanography**, v.28, p.873-881, 1983.
- DE GRAFF, L.; VAN DEN BROEK, H.; VISSER, J. Isolation and transformation of the pyruvate kinase gene of *Aspergillus nidulans*. **Current Genetics**, v.13, p.315-321, 1988.
- EDWARDS, O.R.; HOY, M.A. Polymorphism in two parasitoids detected using random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. **Biological Control**, v.3, p.243-257, 1993.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995, 220p.
- GAWEL, N.J.; BARTLETT, A.C. Characterization of differences between whiteflies using RAPD-PCR. **Insect Molecular Biology**, v.2, p.33-38, 1993.
- GIOVANNONI, S.J.; BRITSCHGI, T.B.; MOYER, C.L.; FIELD, K. Genetic diversity in sargasso sea bacterioplankton. **Nature**, v.344, p.60-63, 1990.
- GUIDET, F. A powerful new technique to quickly prepare hundreds of plant extracts for PCR and RAPD analyses. **Nucleic Acids Research**, v.22, p.1772-1773, 1994.
- HAYMER, D.S. Arbitrary (RAPD) primer sequences used in insect studies. **Insect Molecular Biology**, v.3, p.191-194, 1994.
- HOLBEN, W.E.; JANSSON, J.K.; CHELM, B.K.; TIEDJE, J.M. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.703-711, 1988.
- HUNT, G.J.; PAGE JR., R.E. Patterns of inheritance with RAPD molecular markers reveal novel types of polymorphism in the honey bee. **Theoretical and Applied Genetics**, v.85, p.15-20, 1992.
- INGLIS, P.W. Internal stipe necrosis of *Agaricus bisporus* - ethiology and molecular genetics studies. London: Nottingham University, 1995. 175p. PhD Thesis.

- LEE, S.B.; TAYLOR, J.W. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In: INNIS, et al, eds. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p.282-287.
- LEMA, M.W.; BROWN, A.; CLAKINS, J.H. A general method for the extraction of DNA from bacteria. **Journal of Microbiological Methods**. v.19, p.167-172, 1994.
- LIESACK, W.; WEYLAND, H.; STACKEBRANDT, E. Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S rDNA analysis of a mixed culture of strict barophilic bacteria. **Microbial Ecology**. v.21, p.191-198, 1991.
- LOVELL, C.R.; PICENO, Y. Purification of DNA from estuarine sediments. **Journal of Microbiological Methods**. v.20, p.161-174, 1994.
- MÖLLER, E.M.; BAHNWEG, G.; SANDERMANN, H.; GEIGER, H.H. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies and infected tissues. **Nucleic Acids Research**. v.20, p.6115-6116, 1992.
- OGRAM, A.; SAYLER, G.S.; BARKAY, T. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. **Journal of Microbiological Methods**. v.7, p.57-66, 1987.
- PFEIFER, T.A.; KHACHATOURIANS, G.G. Isolation and characterization of DNA from the entomopathogen *Beauveria bassiana*. **Experimental Mycology**. v.13, p.392-402, 1989.
- PORTEUS, L.A.; ARMSTRONG, J.L. A simple mini-method to extract DNA directly from soil for use with polymerase chain reaction amplification. **Current Microbiology**. v.27, p.115-118, 1993.
- PURDE, K.J.; EMBLEY, T.M.; TAKII, S.; NEDWELL, D.B. Rapid extraction of DNA and rRNA from sediments by a novel hydroxyapatite spin-column method. **Applied and Environmental Microbiology**. v.62, p.3905-3907, 1996.
- RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**. v.1, p.17-20, 1985.
- ROGERS, S.O.; BENDICH, A.J. Extraction of DNA from plant tissues. **Plant Molecular Biology Manual**. v.A6, p.1-10, 1988.
- SAANO, A.; TAS, E.; PIPPOLA, S.; LINDSTRÖM; VAN ELSAS, J.D. Extraction and analysis of microbial DNA from soil. In: TREVORS, J.T.; VAN ELSAS, J.D. (ed.), **Nucleic acids in the environment: methods and applications**. Berlin: Springer Verlag, 1995. p.49-67. (Springer Laboratory Manual).
- SAIKI, R.K.; GELFANCE, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification with a thermostable DNA polymerase. **Science**. v.239, p.487-491, 1988.
- SAYLER, G.S.; FLEMING, J.T.; APPEGATE, B.; WARNER, C. Nucleic acid extraction and analysis: detecting genes and their activity in the environment. In: WELLINGTON, E.M.H.; VAN ELSAS, J.D., ed. **Genetic interactions among microorganisms in the natural environment**. London: Pergamon Press, 1992, p.237-257.
- SCHMIDT, T.M.; DE LONG, E.F.; PACE, N.R. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. **Journal of Bacteriology**. v.173, p.4371-4378, 1991.
- STAHL, D.A.; FLESHER, B.; MANSFIELD, H.R.; MONTGOMERY, L. Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. **Applied and Environmental Microbiology**. v.54, p.1079-1084, 1988.
- STEFFAN, R.L.; ATLAS, R.M. DNA amplification to enhance detection of genetically engineered bacteria in environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**. v.54, p.2185-2191, 1988.
- STEINER, J.J.; POKLEMBIA, C.J.; FJELLSTROM, R.G.; ELLIOT, L.F. A rapid one-tube genomic DNA extraction process for PCR and RAPD analyses. **Nucleic Acids Research**. v.23, p.2569-2570, 1995.
- TORSVIK, V.; GOKOSOYR, J.; DAAE, F.L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. v.56, p.782-787, 1990.
- TSAI, Y.L.; OLSON, B.H. Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**. v.58, p.2292-2295, 1992.
- TSUSHIMA, S.; HASEBE, A.; KOMOTO, Y.; CARTE, J.P.; MIYASHITA, K.; YOKOYAMA, K.; PICKUP, R.W. Detection of genetically engineered microorganisms in paddy soil using a simple and rapid "nests" polymerase chain reaction method. **Soil Biology and Biochemistry**. v.27, p.219-227, 1995.
- THOMSON, D.; HENRY, R. Single-Step protocol for preparation of plant tissue for analysis by PCR. **BioTechniques**. v.19, p.394-400, 1995.
- WARD, D.M.; WELLER, R.; BATESON, M.M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured inhabitants in a natural community. **Nature**. v.345, p.63-65, 1990.

8

APLICAÇÕES DA PCR EM ECOLOGIA MOLECULAR

Maria Helena P. Fungaro

Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina
Caixa Postal 6001, CEP 86051-970, Londrina, PR

Maria Lúcia Carneiro Vieira

Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de S. Paulo
Caixa Postal 83, CEP 13400-970, Piracicaba, SP

INTRODUÇÃO

Os microrganismos representam uma fonte de recursos naturais de fácil manipulação em laboratório, que tem sido usada para o entendimento da natureza de vários processos vitais. Como ciência aplicada, a microbiologia trata de problemas relacionados à medicina, agricultura e indústria. Os microrganismos são responsáveis por grande parte das doenças que afetam o homem, as plantas e os animais. Além disso, têm papel importante na fertilidade dos solos e na produção animal. Muitos dos processos industriais em larga escala utilizam-se de microrganismos e deram origem a uma nova disciplina, a moderna biotecnologia.

Os microrganismos podem ser igualmente estudados em seus ambientes naturais. Do ponto de vista da Ecologia, são partes importantes do ecossistema, pois têm papel crucial na transformação de energia e em processos biogeoquímicos. Considerando esse fato, são de grande valia estudos que permitam o isolamento, a identificação e a quantificação desses organismos em vários habitats. Nos últimos anos, novas abordagens metodológicas, principalmente de genética molecular, têm sido muito

úteis na geração de um quadro mais completo sobre ecologia microbiana em um dado habitat. Neste capítulo, será discutida a potencialidade da técnica da PCR (Reação de Polimerização em Cadeia) na detecção e identificação de microrganismos em ambientes naturais.

REAÇÃO DE POLIMERAÇÃO EM CADEIA (PCR)

A PCR, descrita por Saiki *et al.* (1985), permite amplificar pequenos e específicos segmentos do genoma. É uma técnica pela qual se obtém *in vitro* várias cópias de um determinado segmento de DNA, e por essa razão teve grande impacto na Biologia Molecular.

Para amplificar-se uma dada seqüência de DNA, três etapas devem ser seguidas: a) extração de DNA, b) reação de amplificação (PCR), c) eletroforese do produto da reação normalmente em géis de agarose. A extração de DNA genômico, ou seja, a obtenção de DNA livre de outros constituintes celulares, é a maneira pela qual se obtêm cópias do DNA-alvo que serão utilizadas como molde na reação de amplificação. Existem vários protocolos que permitem a extração de DNA, alguns mais laboriosos, outros mais simplificados. No caso da PCR, é possível utilizarem-se métodos simplificados de extração, uma vez que essa técnica requer quantidades mínimas de DNA, e este não necessariamente precisa apresentar alto grau de pureza. Comparando-se com outras técnicas da Biologia Molecular, essa é uma das vantagens da PCR.

Uma vez extraído o DNA-molde a ser amplificado, a próxima etapa é a reação de amplificação. É nessa fase que um determinado segmento será duplicado alguns milhões de vezes. A duplicação de DNA *in vitro* se dá de maneira semelhante àquela que ocorre dentro da célula, exigindo basicamente os mesmos componentes: DNA-molde, desoxinucleotídeos trifosfatados (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), DNA polimerase e oligonucleotídeos *primers*. Para amplificar-se um dado segmento de DNA pela PCR deve-se utilizar um par de oligonucleotídeos *primers* que flanqueiam a região-alvo. Os *primers* são oligonucleotídeos com seqüências complementares às extremidades 3' de cada uma das fitas.

A PCR envolve repetidos ciclos de amplificação, cerca de 30 a 45. Cada ciclo de amplificação tem três etapas, que diferem em relação à temperatura: inicialmente, a temperatura de 90 a 95°C provoca a desnaturação do DNA; a seguir ocorre o anelamento dos *primers* com a região de homologia à temperatura de 40 a 55°C e, finalmente, a 72°C, ocorre o alongamento

A interpretação dos géis de PCR depende dos propósitos pelos quais se utiliza a técnica. Em Genética e Ecologia a PCR é aplicada, por exemplo, para identificar e quantificar a variabilidade genética. A coexistência em uma população de mais de um variante é chamada de polimorfismo genético. No caso da PCR, polimorfismos podem ser detectados nas seguintes situações: a) quando ocorrem alterações na seqüência de bases das regiões complementares aos *primers*; essas farão com que o complexo *primer*-molde não se forme e conseqüentemente a amplificação não ocorra (esse tipo de polimorfismo é reconhecido pela ausência da banda); b) quando há inserções de seqüências entre os sítios de ligação dos *primers*, o que faz com que o segmento-molde passe a apresentar um tamanho maior do que a capacidade de extensão da enzima, impedindo que a amplificação ocorra (esse tipo de polimorfismo também é reconhecido pela ausência da banda); c) quando ocorrem inserções ou deleções entre os sítios de ligação dos *primers*, e nesses casos haverá amplificação, produzindo uma banda de peso molecular maior ou menor, respectivamente.

USO DA PCR NA DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS EM ECOSISTEMAS NATURAIS

Os métodos utilizados para contar microrganismos em cultura pura podem ser adaptados para amostras obtidas em populações naturais. Por exemplo, o procedimento de diluição, seguido de semeadura e contagem de colônias em placa, tem sido usado para contar microrganismos coletados de amostras do solo e da água. No entanto, em alguns casos, o microrganismo de interesse em um ecossistema encontra-se em freqüência muito baixa ou não é passível de ser cultivado em meio de cultura. Diante desse fato, vários estudos foram conduzidos no sentido de desenvolver metodologias que permitam detectar microrganismos em amostras obtidas de ambientes naturais, sem a necessidade de cultivá-los em laboratório. O sucesso da utilização da técnica de PCR para amplificar segmentos específicos de DNA de um microrganismo presente em amostras obtidas de ambientes naturais, contendo uma grande população microbiana mista, depende obviamente do sucesso na extração dos DNAs.

Ogram *et al.* (1987) descreveram, pela primeira vez, um método que permite extrair diretamente o DNA de microrganismos presentes em uma matriz ambiental, como solo ou sedimento. Neste método, as células são

lisadas quando ainda estão presentes na matriz, por incubação com SDS, seguida de ruptura física e extração do DNA, usando-se tampão fosfato-alcálico. Posteriormente, vários métodos alternativos para a extração de DNA de microrganismos coletados em diferentes habitats, incluindo solo (Cresswell *et al.*, 1991; Steffan & Atlas, 1990), sedimentos (Holben *et al.*, 1988; Ogram *et al.*, 1987) e água (Fuhrman *et al.*, 1988; Somerville *et al.*, 1989), foram descritos e utilizados em reações de PCR com sucesso.

Considerando que uma reação de PCR fosse realizada a 100% de sua eficiência máxima, Gibbs (1990) estimou que, teoricamente, é possível gerar 100 mg de um fragmento único de 1-Kb, a partir de 100 ng de DNA total humano, em 25 ciclos de PCR. Entretanto, na maioria das vezes, somente poucos microgramas de DNA-alvo amplificado são produzidos, mesmo sob as condições de máxima otimização. Os trabalhos de Paul *et al.* (1990) e de Steffan & Atlas (1990) comentam que não foi possível obter-se quantidades suficientes de seqüências-alvo amplificadas a partir de DNA ambiental que permitissem sua visualização em um gel de agarose corado com brometo de etídeo. Porém, o produto foi facilmente detectável após *Southern* ou *dot blotting*, seguido de hibridização com sondas específicas.

Segundo Steffan & Atlas (1991), essa inabilidade de se visualizar o produto amplificado diretamente em gel de agarose pode ser melhor compreendida a partir da seguinte análise hipotética. Primeiramente, os autores assumem que todas as células no solo ou sedimento teriam o mesmo tamanho de genoma (5×10^6 pb). Também supõem que a amostra do sedimento ou solo teria 10^{10} m células por grama, e que nessa amostra haveria uma célula-alvo contendo uma única cópia de um fragmento-alvo de 500 pb. Assim, a célula-alvo e seu genoma representam 10^{-10} das células totais e dos genomas presentes na amostra.

Posteriormente, os autores supõem que foi feita uma extração de DNA a partir de 100 g desta amostra e que foram recuperados 100 mg de DNA, altamente purificado. O genoma-alvo representa 10^{-10} do DNA, ou seja, 10^{-8} mg de DNA. Como o tamanho de genoma da célula-alvo é da ordem de 5×10^6 pb e o fragmento-alvo, de 500 pb (10^{-4} do total do genoma), a quantidade de alvo no DNA extraído representa 10^{-12} mg. Se a reação de PCR for realizada com 1 mg (10^{-2} do total) de DNA total, a amostra vai conter 10^{-14} mg (0,01 ag) de DNA-alvo. Assumindo que 0,1 ng de um fragmento de 500 pb pode ser detectado em um gel de agarose, corado com brometo de etídeo, para se ver o fragmento será necessária uma amplificação de 10^{10} vezes (aproximadamente 2^{33}). Com a utilização de

sondas, no entanto, é possível detectar-se um DNA-alvo com apenas 0,1 pg, o que requer uma amplificação de apenas 10^7 vezes (aproximadamente 2^{24}). O limite de detecção, fazendo-se uso de sondas, sem amplificação, está geralmente na faixa de 10^3 a 10^4 células por grama de solo ou sedimento. Com a amplificação de uma seqüência-alvo, usando-se 30 ciclos de PCR, uma única célula-alvo pode ser detectada após hibridização com a sonda específica (Fig. 2).

Esses procedimentos, que incluem a amplificação de uma seqüência específica e sua detecção por hibridização, têm sido utilizados com a finalidade de monitorar indicadores de poluição, detectar a presença de microrganismos selvagens ou geneticamente engenheirados no ambiente ou de microrganismos patógenos em águas, solos e sedimentos, e ainda indicar a presença de microrganismos viáveis, porém não passíveis de cultivo em laboratório.

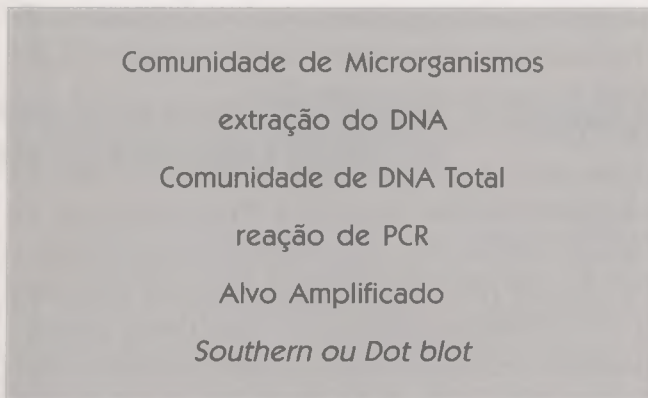


FIGURA 2. Passos para a detecção de dado microrganismo em uma comunidade microbiana natural.

DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS ENGENHEIRADOS LIBERADOS NO AMBIENTE

Microrganismos geneticamente engenheirados (MGEs) podem ser utilizados na indústria, agricultura e medicina. Entretanto, seu uso extensivo tem sido limitado pela falta de metodologias capazes de monitorar e detectar sua presença após a liberação no ambiente. Métodos de cultivo são pouco sensíveis para esse propósito, pois dependem da recuperação e do cultivo do microrganismo engenheirado presente na amostra ambiental.

O método de extração do DNA microbiano, a partir de amostras ambientais, seguida da hibridização com sondas específicas, embora mais

sensível que os métodos de cultivo, também não atinge o nível de sensibilidade requerida para se determinar o destino dos MGEs, devido ao pequeno número de cópias-alvo presentes na amostra.

A técnica de PCR permite que se amplifique, milhões de vezes, o gene exógeno do MGE, facilitando sua detecção em ambientes nos quais foi liberado. Com o objetivo de detectar a presença da bactéria *Pseudomonas cepacia* AC1100, capaz de degradar o herbicida 2,4,5-T após sua liberação no solo, Steffan & Atlas (1988) usaram a técnica de PCR, seguida de *dot-blot* e hibridização. A amplificação de uma sequência de 1,3 Kb, realizada após extração de DNA obtido a partir de amostras de sedimento, aumentou consideravelmente a sensibilidade do *dot-blot*. Dessa forma, foi possível detectar cerca de 100 células de *P. cepacia* AC1100 em 100 g de amostra de sedimento contra um background de 10^{11} de diversos organismos não-alvos, o que significa que *P. cepacia* foi encontrada na concentração de uma célula por grama de sedimento. Essa taxa representa um aumento de 10^3 vezes na sensibilidade de detecção, em relação a amostras não amplificadas.

Chaudhry *et al.* (1989) cloraram um fragmento de 0,3-Kb obtido de *Pennisetum purpureum* em um plasmídeo (pRC10) degradativo do herbicida ácido 2,4-D e introduziram este plasmídeo em *E.coli*. Esse microrganismo geneticamente alterado foi liberado em condições ambientais controladas, na concentração de 10^4 células por ml. Fazendo-se a amplificação do marcador clonado (fragmento de 0,3-Kb) e hibridização específica foi possível detectar-se a presença do MGE, mesmo após 14 dias de incubação.

DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS SELVAGENS NO AMBIENTE

Uma das formas de se eliminar poluentes e resíduos tóxicos no ambiente é promover sua biodegradação por microrganismos selvagens. A detecção desses microrganismos pode ser feita usando-se amplificação por PCR de regiões conservadas de genes presentes em diferentes grupos de microrganismos despoluentes. Quando um sítio poluído é identificado, é importante investigar a presença de vários micróbios despoluentes nesse local. Pelos métodos convencionais isso não é possível, pois muitos micróbios selvagens não se mostram viáveis em condições de cultura.

A revisão de Bej & Mahbubani (1992) traz informações sobre trabalhos em que a amplificação por PCR, utilizando *primers* específicos, permitiu a detecção de várias bactérias capazes de degradar compostos cloro-aro-

máticos. Esses oligonucleotídeos *primers* foram sintetizados a partir da análise da seqüência de nucleotídeos do gene *tfdC* de *Alcaligenes eutrophus*, responsável pela degradação da clorocatecol dioxigenase. Da mesma forma, bactérias capazes de degradar o herbicida 2,4-D foram detectadas por amplificação de uma região do gene *tfdB*. A sensibilidade desse método permitiu a detecção de um microrganismo específico em uma população microbiana mista.

A formação de biofilmes de microrganismos em várias superfícies pode ser benéfica ou prejudicial ao meio ambiente. A agregação de micróbios é necessária, por exemplo, em tratamentos da água, porém pode causar corrosão extensiva e deterioração. Métodos convencionais de detecção eliminam muitos dos micróbios presentes nos biofilmes que não sobrevivem em culturas isoladas, pois são metabolicamente dependentes da comunidade microbiana. A amplificação por PCR permite a detecção desses micróbios. Usando *primers* que permitem a amplificação de regiões conservadas do gene que transcreve RNAr 16S, bactérias gram-negativas reductoras de sulfato foram detectadas (revisão de Bej & Mahbubani, 1992).

DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS INDICADORES DE QUALIDADE DA ÁGUA E PATÓGENOS

A PCR pode ser usada na identificação de microrganismos patogênicos de importância clínica ou agrícola e também no controle de ambientes naturais (Atlas & Bej, 1990; Bej *et al.*, 1990). A amplificação por PCR de regiões dos genes *lacZ* e *lambB* de *E.coli*, seguida de hibridização, permitiu a Bej *et al.* (1990) detectarem a presença de bactérias coliformes em águas. Usando uma temperatura de anelamento de 50°C para amplificar a região *lacZ* foi possível detectar *E.coli* e outras bactérias coliformes (incluindo *Shigella* spp.), mas não *Salmonella* spp. e outras não-coliformes. Usando *primers* correspondentes à região *lambB* e a mesma temperatura de anelamento, detectaram *E.coli*, *Salmonella* e *Shigella* spp. Essa metodologia permitiu aos autores detectarem de 1 a 5 células viáveis de *E.coli* por 100 ml de água, o que demonstra a eficiência do método na detecção de indicadores de contaminação fecal na água.

Legionella spp. são micróbios aquáticos patogênicos ao homem, cuja detecção também tem sido realizada usando-se a PCR (Starnbach *et al.*, 1990; Mahububani *et al.*, 1990). Todas as espécies de *Legionella*, incluindo 15 serogrupos de *L. pneumophila*, foram detectados usando-se ampli-

ficação por PCR de uma seqüência de DNA de 104 pb, que codifica uma região do RNAr5S, seguida de hibridização com uma sonda correspondente a uma parte interna do gene. Vale ressaltar que *Pseudomonas* spp., que exibe reação antigênica cruzada quando se faz detecção serológica, não mostrou sinal positivo.

Outro patógeno microbiano, *Giardia lamblia*, pôde ser detectado por PCR. Normalmente, sua detecção é feita sob microscopia, usando-se corantes fluorescentes. Amplificando-se diferentes segmentos do gene giardina de *G. lamblia* foi possível diferenciar *G. lamblia* de *G. muris* (Mahbubani *et al.*, 1991, citado por Bej & Mahbubani, 1992). Até mesmo um único cisto de *G. lamblia* foi detectado por PCR, após sua separação por micromanipulador.

Recentemente, a amplificação de seqüências de DNA patógeno-específico por PCR foi usada na detecção de vários patógenos em hospedeiros vegetais. *Xylella fastidiosa* é uma bactéria gram-negativa responsável por perdas econômicas em muitas plantas de importância comercial, incluindo a videira, *Citrus* e o pêssego. Linhagens de *X. fastidiosa* podem ser agrupadas em dois ou mais patotipos. Em alguns hospedeiros a população microbiana é baixa e difícil de ser detectada. Métodos sensíveis que permitam sua detecção, e técnicas para distinguir os patotipos são necessários para estudos epidemiológicos e ecológicos dessa bactéria. Assim, Minsavage *et al.* (1994) desenvolveram um protocolo de detecção sensível e específico para *X. fastidiosa*, baseado em PCR, 100 vezes mais eficiente em comparação ao obtido usando-se teste ELISA.

DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS VIÁVEIS MAS NÃO-CULTIVÁVEIS

Há vários registros da ocorrência de microrganismos viáveis no ambiente, mas que não sobrevivem em condições de cultivo. Alguns deles são patógenos de animais ou plantas que se tornam infecciosos em condições favoráveis. Mahbubani *et al.* (1990) demonstraram ser possível a detecção de células metabolicamente ativas de *Legionella pneumophila* por amplificação do RNA-mensageiro codificado pelo gene *mip*. No sentido de estabilizar os RNAs-mensageiros bacterianos, a cultura é previamente tratada com cloranfenicol. O controle da expressão desses genes pela célula limita, de certa forma, a utilização desse método.

Vibrio vulnificus é o agente causal de uma infecção fatal para o homem, que pode ser detectado por PCR, usando-se *primers* específicos do

gene da hemolisina. Brauns *et al.* (1991) detectaram 31 pg de DNA de *V. vulnificus*, usando células não-cultiváveis.

MARCADORES MOLECULARES DERIVADOS DA TÉCNICA DE PCR, COM ÊNFASE NO RAPD

Marcadores genéticos são recursos poderosos em estudos de biologia de populações e ecologia do comportamento. Desde o início deste século, os geneticistas têm-se utilizado de tais recursos para avaliar populações naturais e domesticadas no sentido de conhecer sua estrutura e inferir sobre sua evolução. Com a descoberta dos marcadores bioquímicos, principalmente das isoenzimas, muito progresso se fez na área da genética e ecologia vegetal, animal e microbiana. Entretanto, o maior avanço nessa área ocorreu a partir da década de 80, quando foram descritas as primeiras técnicas que revelam marcadores de DNA. Esses, pelo fato de não estarem sujeitos à influência ambiental, podem ser estudados a partir de amostras coletadas em qualquer idade ou condição fisiológica do organismo vivo ou mesmo a partir de amostras de sangue, resíduos orgânicos ou até de materiais fossilizados. Embora exista um grande número de técnicas que revelam polimorfismos de DNA, várias das quais baseadas na PCR, este tópico discorrerá sobre um dos marcadores moleculares, o RAPD ou polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (Williams *et al.*, 1990).

O sucesso dessa técnica se deve ao fato de requerer pequena quantidade de DNA, ser capaz de revelar alto grau de marcas polimórficas e ser um método rápido e passível de automatização. Ao contrário da PCR, que exige a utilização de dois *primers* específicos e, portanto, o conhecimento das seqüências de nucleotídeos complementares a esses *primers*, o RAPD baseia-se na amplificação de fragmentos não-específicos de DNA. Na PCR, um determinado segmento de DNA é amplificado, sendo que um dos *primers* reconhece a extremidade 3' de uma das fitas e o outro, a extremidade 3' da outra fita. O que limita a região a ser amplificada é justamente o anelamento dos *primers* nas extremidades que flanqueiam esse segmento de DNA. No RAPD não se escolhe, a princípio, a região a ser amplificada. Utilizam-se *primers* com seqüências arbitrárias de nucleotídeos e analisam-se os produtos amplificados. No RAPD, uma única seqüência *primer* é utilizada por reação. A amplificação somente ocorrerá quando coincidir desta mesma seqüência *primer* reconhecer um sítio

de homologia em uma das fitas e também reconhecer o mesmo sítio, porém com orientação invertida, na outra fita da molécula de DNA. Esses sítios deverão estar separados por um intervalo máximo de 4 a 10 kb (dependendo da enzima utilizada), pois este é o limite da PCR. O tamanho dos *primers* usados no RAPD é bem menor do que aqueles utilizados para ampliações específicas, justamente em função da necessidade de haver coincidência de sítios homólogos aos *primers* dentro do intervalo limite da PCR.

O fato das seqüências *primers* serem geradas arbitrariamente permite a observação de perfis de RAPDS com vários produtos de amplificação, decorrentes da existência de vários sítios homólogos a esses *primers* espalhados no genoma, assim como pode-se observar géis que não mostram amplificação alguma. Portanto, o primeiro passo, quando se deseja aplicar esta técnica, é fazer uma seleção de *primers* que sejam apropriados para o material em estudo. A condição ótima da reação de amplificação pode variar de organismo para organismo, de maneira que a condução de experimentos, visando o estabelecimento dessa condição, é essencial. Os principais fatores a otimizar são a concentração de íons magnésio, que pode variar de 1,5 até 5,0 mM, e a concentração de DNA, que em fungos filamentosos pode variar de 10 até 180 ng. Como exemplo, a Tabela 1 mostra as condições otimizadas da reação para a amplificação do fungo *Metarhizium anisopliae* (Fungaro *et al.*, 1996).

TABELA 1. Condição ótima de reação no fungo *Metarhizium anisopliae* visando a detecção de polimorfismos de RAPD.

REAGENTES	VOLUME	CONCENTRAÇÃO ESTOQUE	CONCENTRAÇÃO FINAL
H ₂ O milli Q	8,7 µl	—	—
Tampão 10X	2,5 µl	10 X	1 X
dNTPs	4,0 µl	1,25 mM	100 µM
<i>primer</i>	2,5 µl	4 mM	0,4 mM
MgCl ₂	3,0 µl	12,5 mM	1,5 mM*
Taq polimerase	0,3 µl	5 U/µl	1,5 U
DNA	4,0 µl	5 ng/µl	20 ng

*A concentração final de íons Mg²⁺ na reação é 3,0 mM, pois 1,5 mM advém do tampão.

Neste capítulo, pretende-se discutir as várias aplicações da técnica do RAPD em Ecologia Molecular, incluindo o diagnóstico de entidades taxonômicas e de suas relações filogenéticas, análise de amostras mistas contendo diferentes genomas e a produção de sondas específicas a partir do DNA amplificado por RAPD. As abordagens metodológicas usadas no tratamento de dados gerados por RAPD, visando a diversidade genética em ambientes naturais, serão detalhadamente apresentadas.

DIAGNÓSTICO DE ENTIDADES TAXONÔMICAS

Fenótipos moleculares, gerados por RAPD, podem servir para diagnosticar diferentes níveis taxonômicos. Considerando-se um determinado *primer*, os produtos de amplificação, via RAPD, podem ser classificados em 2 grupos: variáveis (polimórficos) e constantes (não-polimórficos). Estas definições referem-se a uma determinada unidade taxonômica operacional. Considere-se, por exemplo, uma análise de vários indivíduos de uma espécie e de várias espécies de um mesmo gênero (Fig. 3). Perfis de RAPD de representantes de vários gêneros podem conter bandas comuns a um ou outro gênero, enquanto outras bandas podem ser exclusivas. Se várias espécies pertencentes a esse gênero forem analisadas e uma das bandas exclusivas do gênero estiver presente em todas elas, pode-se concluir que esta banda é um marcador gênero-específico. Da mesma forma, quando se tem o perfil de RAPD de espécies de um mesmo gênero, algumas bandas poderão ser compartilhadas por algumas espécies, enquanto outras poderão ser exclusivas de uma dada espécie. Se vários indivíduos dessa espécie forem analisados e essa banda estiver presente em todos eles, pode-se concluir que é um marcador espécie-específico.

Assim, os marcadores de RAPD podem ser utilizados para diagnóstico molecular de diferentes níveis taxonômicos (Crowhurst *et al.*, 1991; Aufauvre-Brown *et al.*, 1992; Demeke *et al.*, 1992; Fukuoka *et al.*, 1992; Castiglione *et al.*, 1993; Stiles *et al.*, 1993; Strongman & Mackay, 1993). Fragmentos polimórficos detectados entre indivíduos de uma população também podem ser utilizados para se determinar o que se chama de identidade clonal, o que normalmente é requerido em estudos envolvendo organismos de reprodução assexual. Marcadores clone-específicos têm sido descritos em vários trabalhos, como o de Smith *et al.* (1992). É importante ressaltar que, em análises de categorias distantes, deve-se ter a cautela de eliminar fragmentos

de mesmo tamanho, que são decorrentes de ampliações a partir de locos não-homólogos. Essa exclusão é feita utilizando-se *Southern blot*, seguido de hibridização usando o DNA do próprio fragmento como sonda.

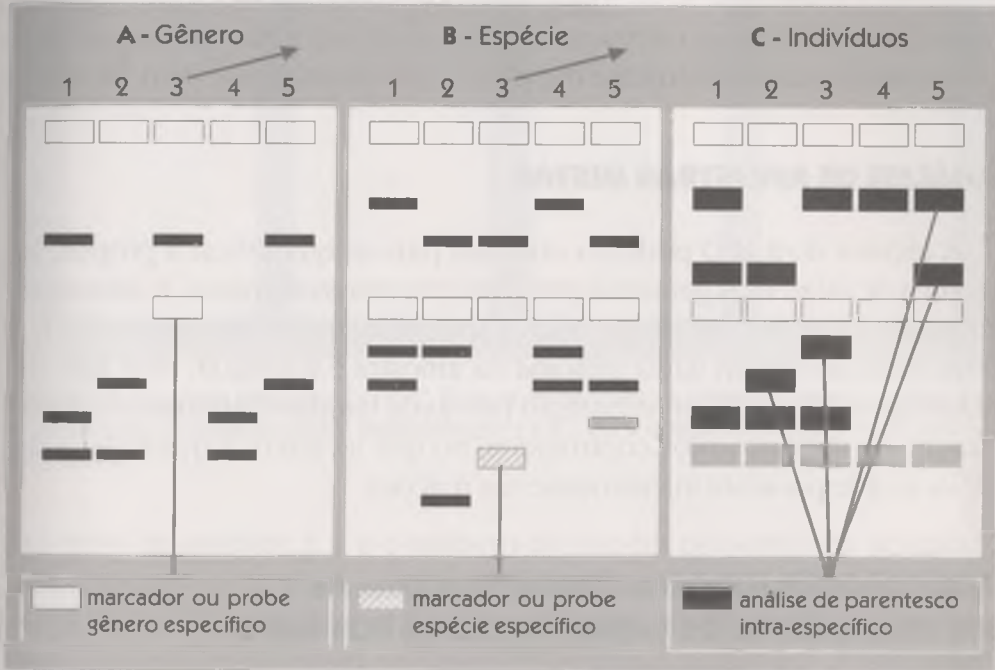


FIGURA 3. Perfis esquemáticos de RAPDs construídos a partir do estudo hipotético de diferentes gêneros, espécies e indivíduos (Hadrys *et al.*, 1992), visando ilustrar o potencial do uso de fragmentos polimórficos e não-polimórficos como marcas de diagnósticos para diferentes níveis taxonômicos. No gel A, um fragmento específico do gênero 3 é identificado, devido à sua presença em todas as espécies do gênero 3 (e conseqüentemente em todos os indivíduos dessas espécies); este fragmento gênero-específico pode servir como uma marca para diagnóstico em análises de RAPD ou como uma sonda gênero-específica, em análises de RFLP. Similarmente, um fragmento espécie-específico (gel B) é identificado por sua presença em todos os indivíduos da espécie 3, servindo como um marcador de RAPD ou como sonda espécie-específica. Finalmente, o gel C mostra 5 fragmentos polimórficos compartilhados diferentemente por indivíduos da espécie 3, que podem ser usados em análises infraespecíficas.

GERAÇÃO DE NOVAS SONDAS ESPECÍFICAS

As bandas de RAPD que se mostrarem apropriadas como marcadores para diagnóstico podem ser eluídas do gel e reamplificadas, utilizando os mesmos nucleotídeos *primers* marcados radioativamente com ^{32}P , por exem-

lo. O produto da amplificação radioativa poderá ser utilizado como sonda para fins de investigações taxonômicas ou para estimar quantitativamente a presença de certo genoma em uma amostra mista. Williams *et al.* (1990) demonstraram que seis entre onze marcadores de RAPD, avaliados como sondas em análises de RFLP, foram úteis por hibridizarem-se com DNAs de cópia única. Os demais, entretanto, não foram úteis por hibridizarem-se com DNAs moderada ou altamente repetitivos, presentes no genoma da soja.

ANÁLISE DE AMOSTRAS MISTAS

A técnica do RAPD pode ser utilizada para se quantificar a proporção relativa de diferentes genomas presentes em amostras mistas. A intensidade relativa das bandas-diagnóstico é quantificada por densitometria e a concentração de um dado genoma na amostra é estimada. Esse tipo de abordagem requer o conhecimento prévio de bandas-diagnóstico e a realização de experimentos controlados, no que se refere à quantidade de DNA-molde presente inicialmente nas reações.

BORDAGENS METODOLÓGICAS UTILIZADAS O TRATAMENTO DE DADOS GERADOS POR RAPD

A princípio, marcadores de RAPD podem ser tratados como alelos mendelianos. O fato desse marcador ser do tipo dominante faz com que a análise das relações de parentesco, entre organismos diplóides, não possa ser conduzida a partir do cálculo das frequências alélicas. Os dados de RAPD são de natureza binária (presença ou ausência da banda) e requerem tratamento estatístico apropriado. Matrizes binárias são geradas, e a partir delas calculam-se coeficientes de similaridade.

Existem várias medidas de similaridade. Os coeficientes de coincidência simples e de Jaccard têm sido amplamente usados em análises de dados gerados via RAPD. Esses coeficientes de similaridade medem o grau de concordância entre duas unidades. O coeficiente de similaridade de coincidência simples é dado pela fórmula $S_{(SM)} = a+d/a+b+c+d$, enquanto o coeficiente de Jaccard pela formulação, $S_{(J)} = a/a+b+c$. O significado de **a**, **b**, **c** e **d** pode ser entendido observando-se a Fig. 4.

O valor de **a** corresponde ao número de bandas presentes na unidade **J** e na unidade **K**; **b** é o número de bandas presentes na unidade **K** mas

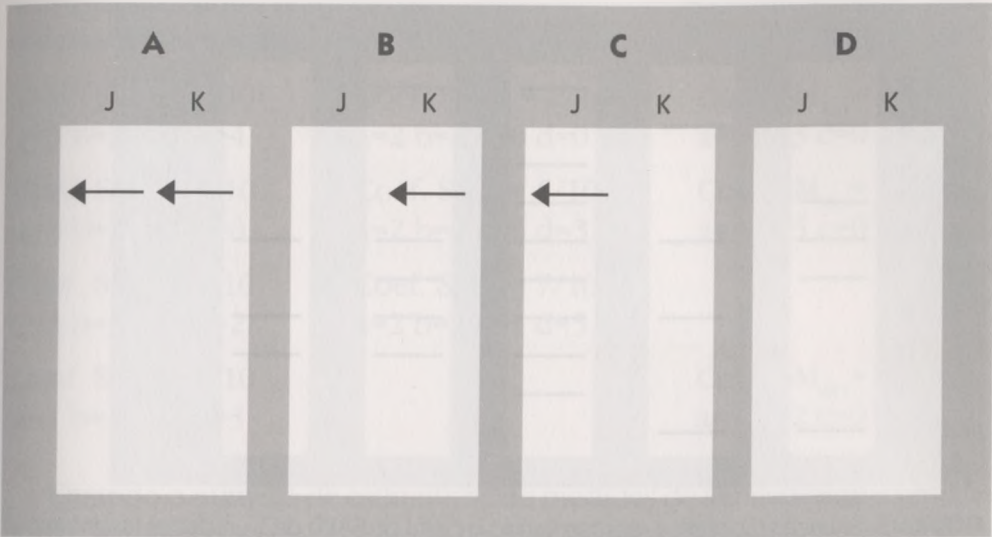


FIGURA 4. Possíveis situações (A, B, C, D) que podem ser encontradas quando se faz a comparação de duas unidades taxonômicas (J e K), com relação à presença ou ausência de bandas.

ausentes na unidade J; **c** é o número de bandas presentes na unidade J mas ausentes em K; **d** é o número de bandas ausentes em K e J. Portanto, **a** e **d** representam o número de concordâncias positivas e negativas, respectivamente, enquanto **b** e **c** representam as discordâncias. É necessário observar que o coeficiente de coincidência simples mede o grau de concordância entre as unidades, levando-se em conta as concordâncias negativas e positivas, enquanto o coeficiente de Jaccard desconsidera as concordâncias negativas.

Na Fig. 5 está representado o perfil de RAPD de 5 unidades taxonômicas. Essa situação hipotética será utilizada para os cálculos de similaridades e análises de agrupamento. A análise de agrupamento tem por finalidade reunir, por algum critério de classificação, as unidades taxonômicas em grupos, de tal forma que exista homogeneidade dentro dos grupos e heterogeneidade entre eles. Alternativamente, as técnicas de agrupamento também têm por objetivo a divisão de um grupo original de observações em vários grupos, segundo algum critério de similaridade ou dissimilaridade. O processo de agrupamento envolve basicamente duas etapas: a primeira relaciona-se com a estimação de uma medida de similaridade (ou dissimilaridade) entre as unidades taxonômicas, e a segunda, com a adoção de uma técnica de agrupamento, à formação dos grupos (Cruz, 1994).

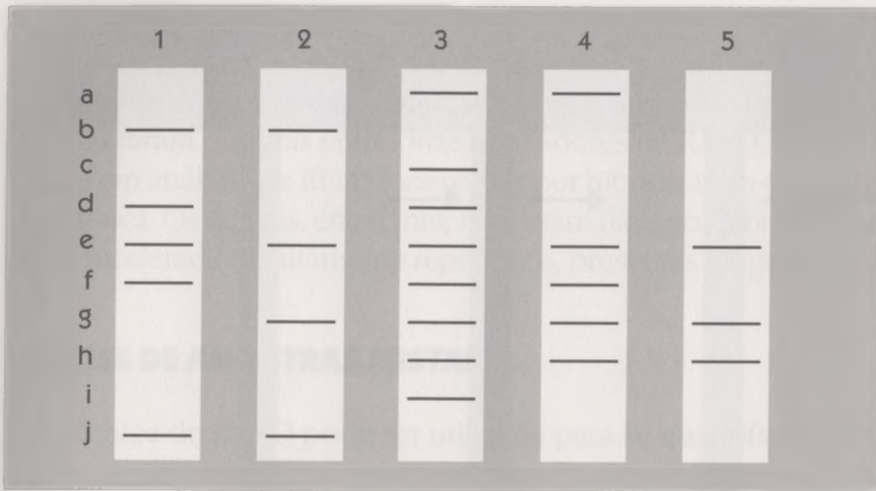


FIGURA 5. Situação hipotética representando o perfil de RAPD de 5 unidades taxonômicas.

Para facilitar o cálculo dos coeficientes de similaridade deve-se construir uma matriz de dados, atribuindo-se valor 1 para a presença de banda e valor zero para a ausência de banda (Tabela 2).

TABELA 2. Matriz dos dados compilados a partir da análise da Fig. 5.

	1	2	3	4	5
a	0	0	1	1	0
b	1	1	0	0	0
c	0	0	1	0	0
d	1	0	1	0	0
e	1	1	1	1	1
f	1	0	1	1	0
g	0	1	1	1	1
h	0	0	1	1	1
i	0	0	1	0	0
j	1	1	0	0	0

Com os dados da Tabela 2 podemos calcular os coeficientes de similaridade, sejam eles de coincidência simples ou de Jaccard. As estimativas de

similaridade entre as unidades, utilizando o coeficiente simples (a+d/a+b+c+d), são as seguintes:

Coef. $SM_{1 \times 2} = 7/10$
a=3 b=2 c=1 d=4

Coef. $SM_{2 \times 2} = 2/10$
a=2 b=2 c=6 d=0

Coef. $SM_{3 \times 4} = 7/10$
a=5 b=3 c=0 d=2

Coef. $SM_{1 \times 3} = 3/10$
a=3 b=2 c=5 d=0

Coef. $SM_{2 \times 2} = 5/10$
a=2 b=2 c=3 d=3

Coef. $SM_{3 \times 5} = 5/10$
a=3 b=5 c=0 d=2

Coef. $SM_{1 \times 4} = 4/10$
a=2 b=3 c=3 d=2

Coef. $SM_{2 \times 5} = 7/10$
a=2 b=2 c=1 d=5

Coef. $SM_{1 \times 5} = 4/10$
a=1 b=4 c=2 d=3

Coef. $SM_{4 \times 5} = 8/10$
a=3 b=2 c=0 d=5

Quando o número de estimativas de medidas de similaridade é grande, torna-se difícil o reconhecimento de grupos homogêneos pela simples observação visual dessas estimativas. Os métodos de agrupamentos hierárquicos permitem que as unidades sejam agrupadas por um processo que se repete em vários níveis, até que seja estabelecido um dendrograma. Existem vários métodos de agrupamento disponíveis, e cabe ao pesquisador decidir qual o mais apropriado ao seu trabalho, uma vez que os diferentes métodos podem levar a diferentes padrões de agrupamentos (Bussab *et al.*, 1990). No caso da análise de dados de RAPD aplicados a problemas taxonômicos, o método denominado UPGMA (*Unweighted pair-group method with arithmetical averages*) tem sido bastante utilizado.

Observando a matriz de similaridade (Tabela 3) obtida pelo coeficiente de coincidência simples, nota-se que os indivíduos mais próximos são 4 e 5, cuja similaridade é 0,8. Assim, esses dois materiais são agrupados em um único grupo, formando, então, 4 grupos: 1, 2, 3 e (4,5).

TABELA 3. Matriz de similaridade usando o coeficiente de concordância simples.

	1	2	3	4	5
1	—	0,7	0,3	0,4	0,4
2		—	0,2	0,5	0,7
3			—	0,7	0,5
4				—	0,8
5					—

A partir do momento em que se unem os materiais 4 e 5, eles passam a formar um grupo e, portanto, deve-se construir uma nova matriz de similaridade. Como os materiais 1, 2 e 3 não sofreram alterações, as similaridades entre eles não mudam. É necessário definir a similaridade entre o grupo (4,5) e os demais materiais. O método que estamos discutindo define a similaridade entre dois grupos como a média entre os valores individuais das unidades de um dos grupos com os valores do outro, ou seja:

$$1 \times (4,5) = (S1x4) + (S1x5)/2 = 0,4 + 4/2 = 0,4$$

$$2 \times (4,5) = (S2x4) + (S2x5)/2 = 0,5 + 0,7/2 = 0,6$$

$$3 \times (4,5) = (S3x4) + (S3x5)/2 = 0,7 + 0,5/2 = 0,6$$

TABELA 4. Matriz de similaridade após o 1º agrupamento.

	1	2	3	(4,5)
1	—	0,7	0,3	0,4
2		—	0,2	0,6
3			—	0,6
(4,5)				—

Observando a nova matriz construída (Tabela 4), nota-se que os indivíduos mais próximos são 1 e 2, cuja similaridade é 0,7. Dessa forma, os dois materiais serão agrupados, restando apenas 3 grupos, (1,2), 3 e (4,5). Em função desse novo agrupamento, uma nova matriz é construída (Tabela 5). Em seguida, as estimativas de similaridades são definidas pelas médias:

$$(1,2) \times 3 = (S1 \times 3) + (S2x3)/2 = 0,3 + 0,2/2 = 0,25$$

$$(1,2) \times (4,5) = (S1x4) + (S1x5) + (S2x4) + (S2x5)/4 = 0,4 + 0,4 + 0,5 + 0,7/4 = 0,5$$

$$3 \times (4,5) = (S3 \times 4) + (S3 \times 5)/2 = 0,7 + 0,5/2 = 0,6$$

TABELA 5. Matriz de similaridade após o 2º agrupamento.

	(1,2)	3	(4,5)
(1,2)	—	0,25	0,5
3		—	0,6
(4,5)			—

Nessa nova matriz, a maior proximidade ocorre entre o material 3 e o grupo (4,5) com similaridade de 0,6. Após o agrupamento (3,4,5) restam apenas dois grupos, ou seja, (1,2) e (3,4,5). A última matriz (Tabela 6) agrupará os dois grupos com similaridade de 0,42, ou seja:

$$S(1,2) \times (3,4,5) = (S1 \times 3) + (S1 \times 4) + (S1 \times 5) + (S2 \times 3) + (S2 \times 4) + (S2 \times 5)/6 = 0,3 + 0,4 + 0,4 + 0,2 + 0,5 + 0,7 = 0,42$$

TABELA 6. Matriz de similaridade após o 3º agrupamento.

	(1,2)	(3,4,5)
(1,2)	—	0,42
(3,4,5)		—

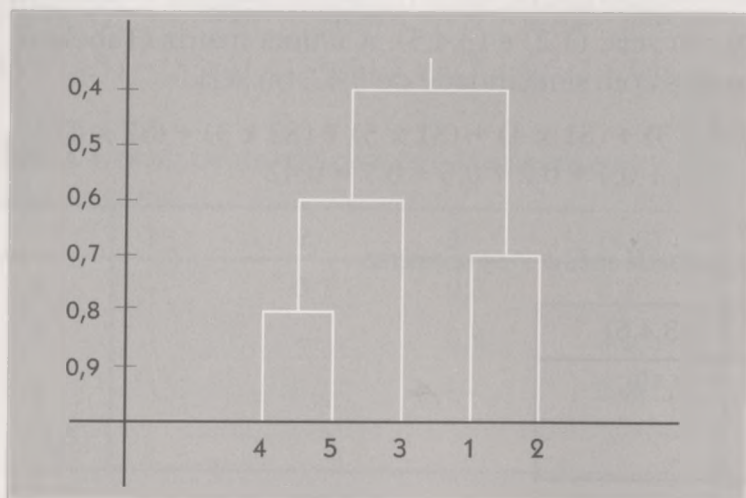
A Tabela 7 resume as etapas descritas acima, mostrando cada passo da formação dos grupos e os respectivos níveis em que eles são formados. Esta tabela possui uma representação gráfica conhecida por dendrograma, ilustrada na Fig. 6. A escala vertical à esquerda indica o nível de similaridade. No eixo horizontal são marcadas as unidades, em uma ordem conveniente, e as linhas verticais, partindo das unidades, têm altura correspondente ao nível em que as unidades são consideradas semelhantes.

O mesmo procedimento usado para construir o dendrograma, a partir dos dados de similaridades calculados pelo coeficiente de coincidência simples, pode ser utilizado para obter o dendrograma a partir dos dados de similaridade calculados por outros coeficientes.

Dependendo do número de unidades e variáveis (bandas), torna-se difícil a análise de agrupamento sem o uso da informática. Existem vários programas de computador que realizam esse tipo de análise. Um desses

TABELA 7. Formação dos grupos em seus respectivos níveis.

PASSO	JUNÇÃO	NÍVEL
1	4,5	0,80
2	1,2	0,70
3	3,(4,5)	0,60
4	(1,2) (3,4,5)	0,42

**FIGURA 6.** Dendrograma construído utilizando-se o coeficiente de similaridade de coincidência simples e o método de agrupamento UPGMA.

programas é o “Numerical taxonomy system of multivariate programs” (NTSYS), desenvolvido para auxiliar pesquisas em taxonomia numérica. Para análise hierárquica, o programa dispõe de 8 métodos, 16 coeficientes de parença para atributos qualitativos e 9 para atributos quantitativos (Bussab *et al.*, 1990).

No caso específico do *Metarhizium anisopliae*, estudado por Fungaro *et al.* (1996), a técnica do RAPD foi usada para analisar 13 isolados (Fig. 7), dos quais 6 foram coletados em diferentes regiões do Brasil e estavam colonizando o inseto *Deois flavopicta*. Os demais provieram do solo de uma única região do estado do Paraná. Foram selecionadas 71 bandas para o cálculo dos coeficientes de similaridade. Conforme pôde ser observado no dendrograma (Fig. 7) elaborado a partir dos coeficientes de simi-

laridade, uma ampla diversidade entre os isolados do inseto foi muito menor do que aquela encontrada entre os isolados do solo. Esse é um exemplo claro da importância da técnica de RAPD, que deriva da PCR, no entendimento de mecanismos que definem o comportamento de microrganismos, no que se refere à sua adaptabilidade nos diferentes ecossistemas. Evidentemente, essas preferências estão associadas à variabilidade genética presente nas populações microbianas.

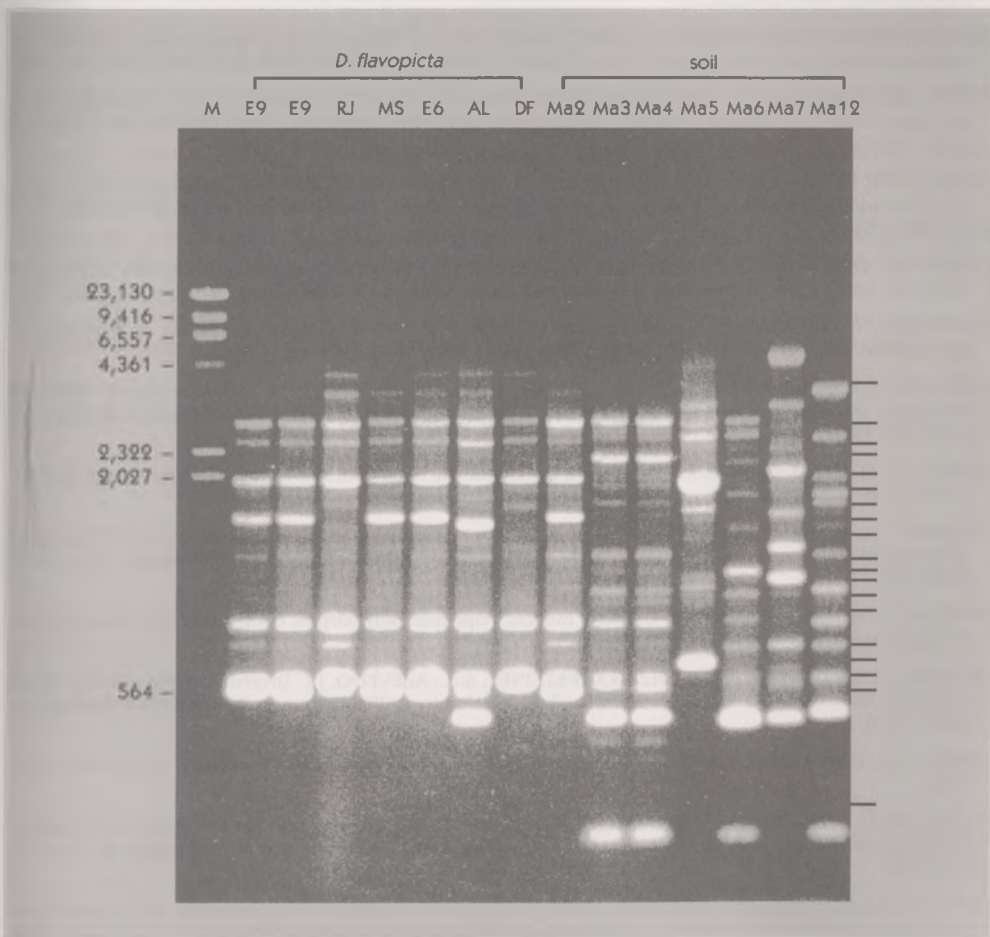
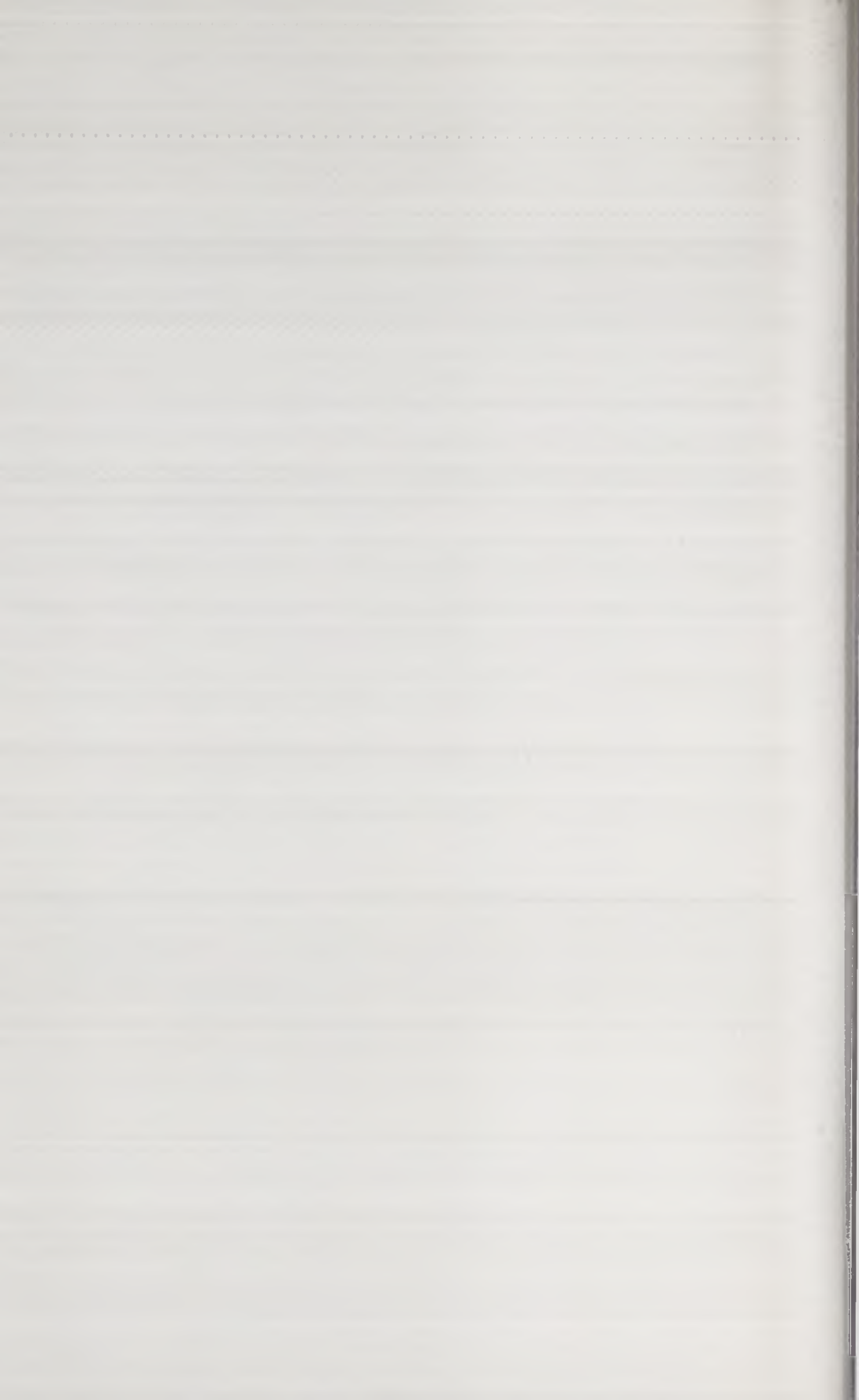


FIGURA 7. RAPD de 13 isolados de *M. anisopliae* var. *anisopliae* obtido com o primer OPX 11. Acima de cada linha encontra-se a denominação do isolado. O isolado E9 foi amplificado duas vezes para se ter um controle da repetibilidade. Na linha M, apresenta-se o marcador de peso molecular (DNA Hind III). Somente as bandas fortes foram utilizadas para o cálculo dos coeficientes de similaridade (como indicado à direita).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATLAS, R.M.; BEJ, A.K. Detecting bacterial pathogens in environmental water samples by using PCR and gene probes. INNIS, M.; GELFAND, O.; SNINSKY, D.; WHITE, T., ed. **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic Press, 1990. p.399-407.
- AUFAUVRE-BROWN, A.; COHEN, J.; HOLDEN, D.W. Use of randomly amplified polymorphic DNA markers to distinguish isolates of *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, p.2991-2993, 1992.
- BALICK, H.M.; SCHIERWATER, B. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPDs) in molecular ecology. **Molecular Ecology**, v.1, p.53-63, 1992.
- BEJ, A.K.; MAHBUBANI, M.H. Applications of the polymerase chain reaction in environmental microbiology. **PCR Methods and Applications**, v.1, p.151-159, 1992.
- BEJ, A.K.; STEFFAN, R.J.; DICESARE, J.; HAFF, L.; ATTLAS, R.M. Detection of coliform bacteria in water by polymerase chain reaction and gene probes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.307-314, 1990.
- BUSSAB, W.O.; MIAZAKI, E.S.; ANDRADE, D.F. SIMPÓSIO NACIONAL DE PROBABILIDADE E ESTATÍSTICA, 9, São Paulo, 1990. **Introdução à análise de agrupamentos**. São Paulo: Associação Brasileira de Estatística, 1990. 105p.
- CASTIGLIONE, S.; WANG, G.; DAMIANI, G.; BANDI, C.; BISOFFI, C.; SALA, F. RAPD fingerprints for identification and for taxonomic studies of elite poplar (*Populus* spp.) clones. **Theoretical and Applied Genetics**, v.87, p.54-59, 1993.
- CHAUDHRY, G.R.; TORANZOS, G.A.; BHATTI, A.R. Novel method for monitoring genetically engineered microorganisms in the environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, p.1301-1304, 1989.
- CRESSWELL, N.; SAUNDERS, V.A.; WELLINGTON, E.M.H. Detection and quantification of *Streptomyces violaceolatus* plasmid DNA, in soil. **Letters in Applied Microbiology**, v.13, p.193-197, 1991.
- CROWHURST, R.N.; HAWTHORNE, B.T.; RIKKERINK, E.H.A.; TEMPLETON, D.M. Differentiation of *Fusarium solani* f.sp. *cucurbitae* races 1 and 2 by random amplification of polymorphic DNA. **Current Genetics**, v.20, p.391-396, 1991.
- DEMEKE, T.; ADAMS, R.P.; CHIBBAR, R. Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA (RAPD): a case study in *Brassica*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.84, p.990-994, 1992.
- FUHRMAN, J.A.; COMEAU, D.E.; HAGSTROM, A.; CHAN, A.M. Extraction from natural planktonic microorganisms of DNA suitable for molecular biological studies. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.1426-1429, 1988.
- FUKUOKA, S.; HOSAKA, K.; KAUIMA, O. Use of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) for identification of rice accessions. **Japanese Journal Genetics**, v.67, p.243-252, 1992.
- FUNGARO, M.H.P.P.; VIEIRA, M.L.C.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Diversity among soil and insects isolates of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* detected by RAPD. **Letters in Applied Microbiology** (in press). 1996.
- GIBBS, R.A.A. DNA amplification by the polymerase chain reaction. **Analytical Chemistry**, v.62, p.1202-1214, 1990.
- HOLBEN, W.E.; JANSSON, J.K.; CHELM, B.K.; TIEDJE, J.M. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.703-711, 1988.
- MAHBUBANI, M.H.; BEJ, A.K.; MILLER, R.; HAFF, L.; DICESARE, J.; ATLAS, R.M. Detection of *Legionella* with polymerase chain reaction and gene probe methods. **Molecular and Cellular Probes**, v.4, p.175-187, 1990.
- MINSAVAGE, G.V.; THOMPSON, C.M.; HOPKINS, D.L.; LEITE, R.M.V.B.; STALL, R.E. Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. **Phytopathology**, v.84, p.456-461, 1994.
- OGRAM, A.; SAYLER, G.S.; BARKAY, T. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. **Journal of Microbiological Methods**, v.7, p.57-66, 1987.
- PAUL, J.H.; CAZARES, L.; THURMOND, J. Amplification of the *rbcl* gene from dissolved and particulate DNA from aquatic environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.1963-1966, 1990.

- SAIKI, R.K.; SCARF, S; FALOONA, F.A.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v.230, p.1350-1354, 1985.
- SMITH, M.L.; BRUHN, J.N.; ANDERSON, J.B. The fungus *Armillaria bulbosa* is among the largest and oldest living organisms. **Nature**, v.356, p.428-431, 1992.
- SOMERVILLE, C.C.I.T.; STRAUBE, W.L.; COLWELL, R.T. Simple, rapid method for direct isolation of nucleic acids from aquatic environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, p.548-554, 1989.
- STARNBACH, M.N.; FALKOW, S.; TOMPKINS, L.S. Species specific detection of *Legionella pneumophila* in water by DNA amplification and hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, v.27, p.1257-1261, 1990.
- STEFFAN, R.J.; ATLAS, R.M. DNA amplification to enhance the detection of genetically engineered bacteria in environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.2185-2191, 1988.
- STEFFAN, R.J.; ATLAS, R.M. Solution hybridization assay for detecting genetically engineered microorganisms in environmental samples. **BioTechniques**, v.8, p.316-318, 1990.
- STEFFAN, R.J.; ATLAS, R.M. Polymerase chain reaction: applications in environmental microbiology. **Annual Review of Microbiology**, v.45, p.134-161, 1991.
- STILES, J.I.; LEMME, C.; SONBUR, S.; MORSHIDI, M.B.; MANSARDT, R. Using randomly amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationships among papaya cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, v.85, p.697-701, 1993.
- STRONGMAN, D.B.; MACKAY, R.M. Discrimination between *Hirsutella longicolla* var. *longicolla* and *Hirsutella longicolla* var. *cornuta* using random amplified polymorphic DNA fingerprinting. **Mycologia**, v.85, p.65-70, 1993.
- WILLIAMS, G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.L.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.6531-6535, 1990.



APLICAÇÕES DA TÉCNICA DE ELETROFORESE DE CAMPO PULSADO PARA SEPARAÇÃO DE CROMOSSOMOS DE MICRORGANISMOS

Aline A. Pizzirani-Kleiner

Gilda Santos Mühlen

Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de S. Paulo
Caixa Postal 83, CEP 13400-970, Piracicaba, SP

INTRODUÇÃO

Em uma eletroforese convencional com gel de agarose, é possível separar moléculas de DNA que se posicionam no gel em função do seu peso molecular, que pode variar de 0.1 a 60 kb. Acima desse tamanho, os DNAs migram juntos, pois são maiores do que os poros do gel, e sob um campo elétrico estão sujeitos a produzirem forças contrárias ao movimento, que deixa de ser dependente do poro do gel e da força do campo elétrico e, portanto, não é mais função do peso molecular.

O problema da co-migração foi estudado inicialmente por Schwartz *et al.* (1982) e Schwartz & Cantor (1984). Baseados no fato de que o tempo de reorientação das moléculas de DNA está relacionado ao tamanho, empregaram a estratégia de desorganizar a orientação de um campo elétrico estabelecido e forçar as moléculas a processos de reorientação. Para isso, desenvolveu-se um sistema de eletroforese com dois campos elétricos perpendiculares em suas direções de migração de modo que, após um certo tempo de corrida (pulso), a direção era alterada, forçando as moléculas à migração em nova direção. As grandes moléculas que migram segundo um processo de reptação se reorientam quando da alteração do campo elétrico, até tomarem novamente a conformação esticada que per-

mite sua passagem pelos poros do gel. O tempo dispendido neste processo de reorientação é proporcional ao tamanho da molécula, de modo que as menores se adiantam em relação às maiores e, portanto, podem ser separadas. O processo foi denominado "eletroforese em campo pulsado", PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis). Um esquema simplificado para explicar a separação de duas moléculas de alto peso molecular está apresentado na Fig. 1.

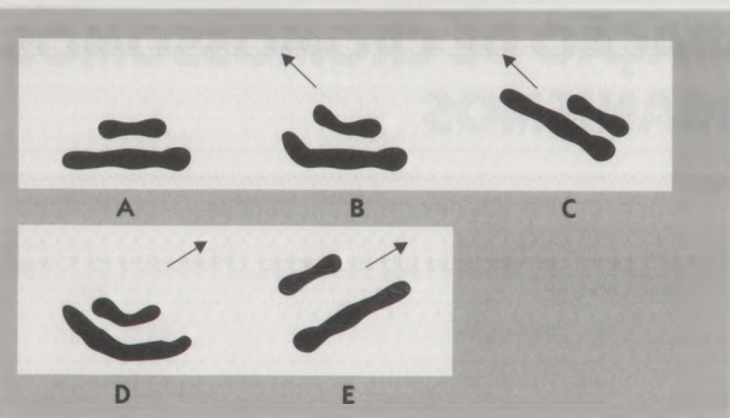


FIGURA 1. Representação esquemática da separação de grandes moléculas de DNA em eletroforese de campo pulsado (PFGE). A – Posição das moléculas de DNA antes do 1º pulso. B – Posição depois do início do 1º pulso. C – Posição no final do 1º pulso. D – Posição depois do início do 2º pulso. E – Posição no final do 2º pulso.

EQUIPAMENTOS PARA ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO

Após a publicação da técnica (Schwartz & Cantor, 1984) utilizando um campo elétrico não-homogêneo e outro homogêneo, e separando cromossomos de *Saccharomyces cerevisiae* com pesos moleculares acima de 700 kb, diferentes equipamentos foram desenvolvidos com alterações principalmente na configuração dos eletrodos. Os primeiros equipamentos descritos são mostrados na Fig. 2 e relacionados na Tabela 1, juntamente com outros sistemas mais recentemente desenvolvidos. O aperfeiçoamento dos sistemas também envolveu mudanças para maior controle sobre as variáveis que interferem no processo, com a inclusão de circuitos eletroeletrônicos, computadores, câmeras de vídeo para programação e acompanhamento da movimentação eletroforética do DNA.

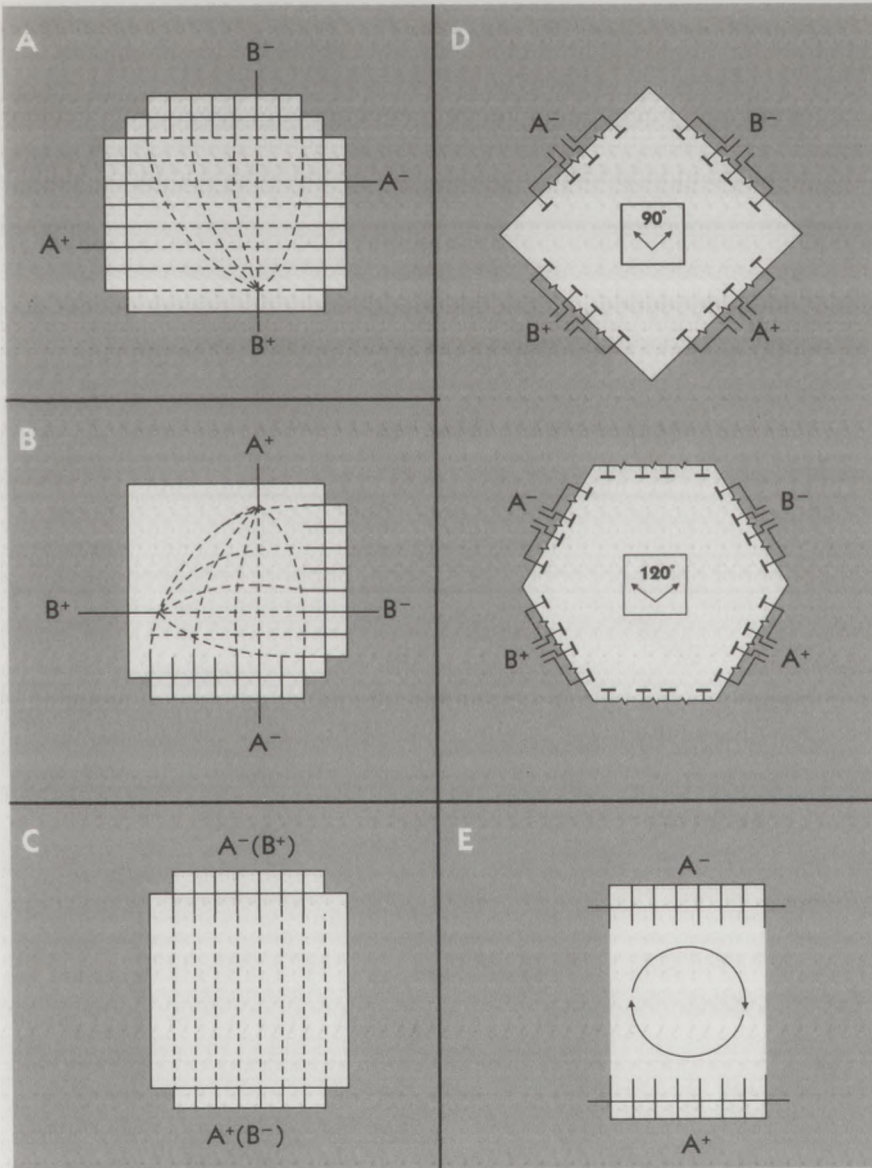


FIGURA 2. Diferentes disposições de eletrodos para separar cromossomos e DNAs de alto peso molecular. A – PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis), um campo não-homogêneo e o outro homogêneo (Schwartz & Cantor, 1984). B – OFAGE (Orthogonal Field Alternation Gel Electrophoresis), dois campos não-homogêneos e gel com disposição ortogonal na cuba (Carle & Olson, 1984). C – FIGE (Field Inversion Gel Electrophoresis), cuba convencional com campo homogêneo periodicamente invertido (Carle *et al.*, 1986). D – CHEF (Contour-Clamped Homogeneous Electric Field), eletrodos múltiplos dispostos de forma contínua com contorno quadrado ou hexagonal (Chu *et al.*, 1986). E – RGE (Rotating Gel Electrophoresis), eletrodos contínuos e fixos com gel circular e rotativo (Cantor *et al.*, 1988).

TABELA 1. Diferentes sistemas eletroforéticos descritos para separação de moléculas de DNA de alto peso molecular (Birren & Lai, 1993, modificado).

SIGLA	SISTEMA ELETROFORÉTICO	REFERÊNCIA
PAGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis	Schwartz & Cantor, 1984
DFAGE	Orthogonal Field Alternation Gel Electrophoresis	Carle & Olson, 1984
IFGE	Field Inversion Gel Electrophoresis	Carle <i>et al.</i> , 1986
TAPE	Transverse Alternating Field Electrophoresis	Gardiner <i>et al.</i> , 1986
CHFE	Contour-Clamped Homogeneous Electric Field	Chu <i>et al.</i> , 1986
RG	Rotating Gel Electrophoresis	Serwer, 1987 Southern <i>et al.</i> , 1987
CFGE	Crossed-Field Gel Electrophoresis	
PHOGE	Pulsed Homogeneous Orthogonal Field Gel Electrophoresis	Bancroft & Wolk, 1988
PACE	Programmable Autonomously Controlled Electrodes	Clark <i>et al.</i> , 1988
ZIFE	Zero Integrated Field Electrophoresis	Turmel <i>et al.</i> , 1990
VACHEF	Variable Angle Contour-Clamped Homogeneous Electric Field	Chu & Gunderson, 1991
ST/RIDE	Simultaneous Tangential/Retangular Inversion Decussate Electrophoresis	Kolble & Sim, 1991
CZE	Capillary Zone Electrophoresis	Liu <i>et al.</i> , 1991
BSFGE	Biased Sinusoidal Fields Gel Electrophoresis	Sudor & Novotny, 1994

De maneira geral, os equipamentos são relativamente simples, compostos por uma cuba de eletroforese com eletrodos dispostos conforme o sistema a ser utilizado, um sistema eficiente para o tampão de corrida (bomba peristáltica), um sistema de refrigeração e uma unidade para gerar e alternar

campos elétricos. As corridas são feitas geralmente em temperaturas entre 4 a 16°C, com voltagem, amperagem e tempo de corrida variáveis conforme as dimensões das moléculas de DNA ou dos cromossomos inteiros. O esquema simplificado de um equipamento é apresentado na Fig. 3.

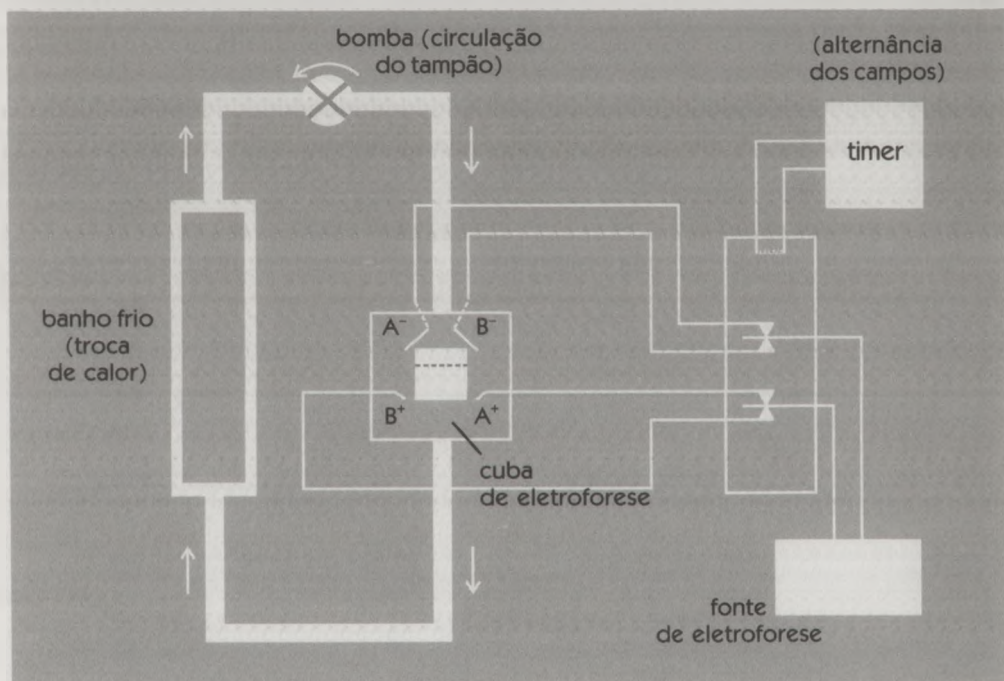


FIGURA 3. Representação esquemática dos componentes de um equipamento para eletroforese em campo pulsado (Carle & Olson, 1984).

FATORES QUE INFLUENCIAM A RESOLUÇÃO E MOBILIDADE DOS FRAGMENTOS DE DNA

Diversos parâmetros influenciam o perfil da resolução eletroforética, alguns mais decisivos e outros de menor importância, mas de forma geral, a resolução é determinada pela interação de vários parâmetros. Individualmente, os fatores são: a) relacionados à cuba: ângulo de reorientação, homogeneidade do campo elétrico; b) às condições de corrida: intervalo de pulso, voltagem, temperatura, agarose (tipo e concentração), concentração do tampão; c) às propriedades da amostra: concentração de DNA, concentração de sais, proteínas contaminantes. Algumas dessas variáveis estão citadas na Tabela 2, assim como as condições desejadas para cada

uma delas e a soluções necessárias para a obtenção do parâmetro adequado. Os efeitos da voltagem, concentração da agarose e temperatura estão exemplificados em *S. cerevisiae* e são mostrados na Fig. 4.

TABELA 2. Resumo dos efeitos das variáveis da eletroforese em campo pulsado (Birren & Laj, 1993).

VARIÁVEL	CONDIÇÃO DESEJADA	AÇÃO NECESSÁRIA
Voltagem	Separação de > 2Mb	Usar baixa voltagem (2 V/cm)
	Uso de baixa voltagem	Aumentar o tempo de pulso
	Uso de alta voltagem	Diminuir o tempo de pulso
Tipo de agarose	Migração rápida	Usar agarose específica para campo pulsado
	Uso de agarose LMP (Low Melting Point)	Aumentar o tempo de pulso
Concentração de agarose	Migração rápida	Reduzir a concentração de agarose
	Bandas nítidas	Aumentar a concentração de agarose
	Uso de altas concentrações	Aumentar o tempo de pulso
	Uso de baixas concentrações	Diminuir o tempo de pulso
Temperatura	Migração rápida	Usar temperatura mais alta
	Bandas nítidas	Usar temperatura mais baixa
	Uso de altas temperaturas	Diminuir tempo de pulso
	Uso de baixas temperaturas	Aumentar tempo de pulso
Pulsômetro	Migração rápida	Usar TAE
	Uso prolongado	Usar TBE
	Uso de altas voltagens	Usar TBE
	Separação > 2 Mb	Usar TAE
Ângulo de reorientação	Migração rápida	Usar ângulo 106°

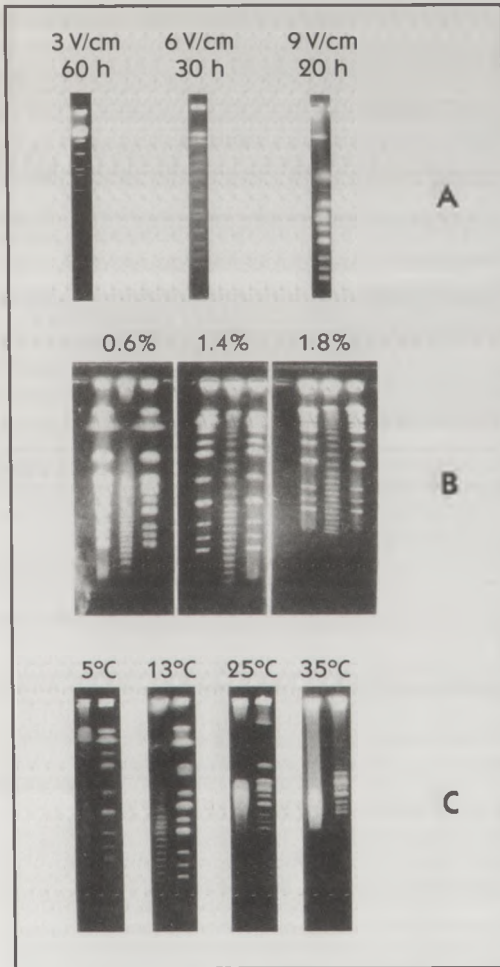


FIGURA 4. Efeito da voltagem (A), da concentração da agarose (B) e de diferentes temperaturas (C) em *Saccharomyces cerevisiae* (adaptado de Birren & Lai, 1993).

MOBILIDADE ELETROFORÉTICA E INVERSÃO DE BANDAS

Em alguns sistemas eletroforéticos pode ocorrer inversão de bandas em função da localização da amostra no gel. Vollrath & Davis (1987) consideram quatro regiões de definição na corrida: região 1, de boa definição, onde o DNA migra em função do seu tamanho; região 2, pequena região de resolução reduzida; região 3, região de máxima resolução; região 4, região de baixa resolução, onde todos os fragmentos migram em uma taxa mais ou menos constante (região de compressão) em CHEF. A Fig. 5 mostra as quatro regiões cuja mobilidade foi calculada em relação ao monômero de DNA de lambda (48.5 kb) e a Fig. 6, as quatro regiões indicadas na separação dos cromossomos de *S. cerevisiae*.

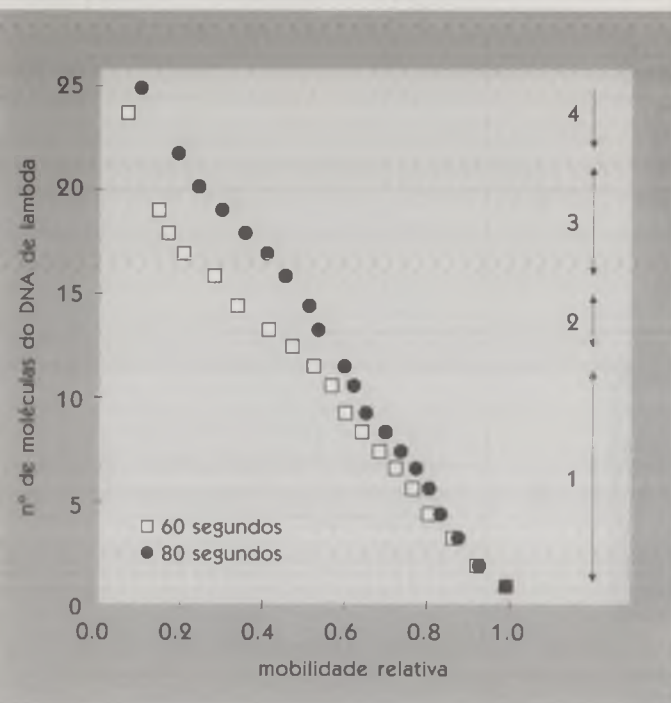


FIGURA 5. Quatro regiões de resolução em eletroforese CHEF com mobilidade calculada em relação ao monômero de DNA de lambda (48.5 kb). As setas à direita indicam a extensão aproximada das quatro regiões para a curva de 80 segundos de tempo de pulso (Vollrath & Davis, 1987).

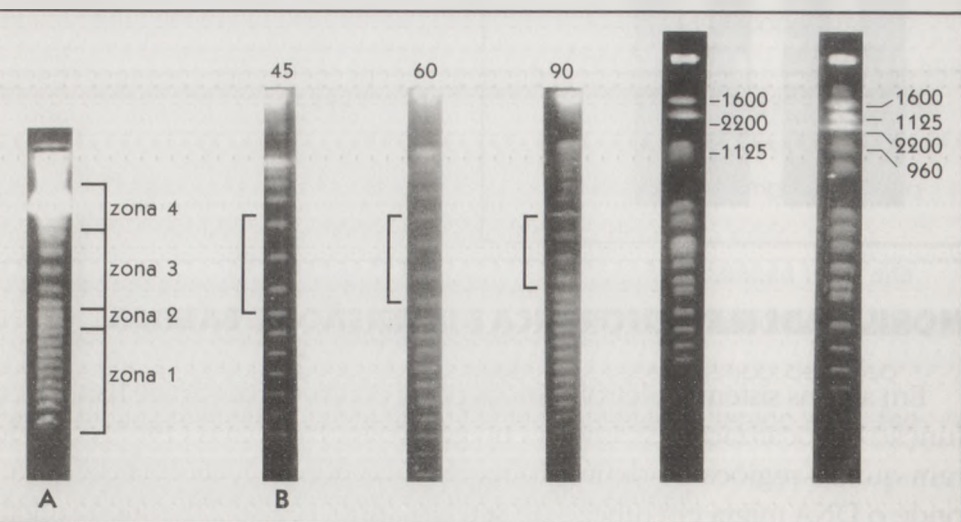


FIGURA 6. Inversão dos cromossomos maiores em *Saccharomyces cerevisiae*. Zonas de resolução em CHEF: zona 1 – migração linear do DNA em função do seu tamanho; zona 2 – região pequena de reduzida resolução; zona 3 – região de alta resolução; zona 4 – baixa resolução onde todos os fragmentos migram em taxa mais ou menos constante (zona de compressão). A – DNA de lambda (75 segundos); B – *S. cerevisiae*: com 45 segundos a zona 3 contém fragmentos de 350 a 550 kb; com 60 segundos, fragmentos de 550 a 750 kb; com 90 segundos fragmentos de 650 a 900 kb (adaptado de Birren & Lai, 1993).

Outros exemplos de inversão de bandas também são relatados empregando-se concatêmeros de DNA de lambda (Sanseau *et al.*, 1990) no sistema 2D-PFGE (Two Dimensional Pulsed Field Gel Electrophoresis), onde o DNA é inicialmente submetido à migração em OFAGE, e a seguir o gel é virado perpendicularmente e submetido a FIGE. Nesse caso, 5 bandas distintas (de resolução) são descritas: I, II, III, IV e V, e a ocorrência de um inesperado efeito de inversão em FIGE: moléculas de maior peso molecular migram mais rapidamente que moléculas de peso molecular menor (bandas IV e V), como pode ser verificado na Fig. 7.

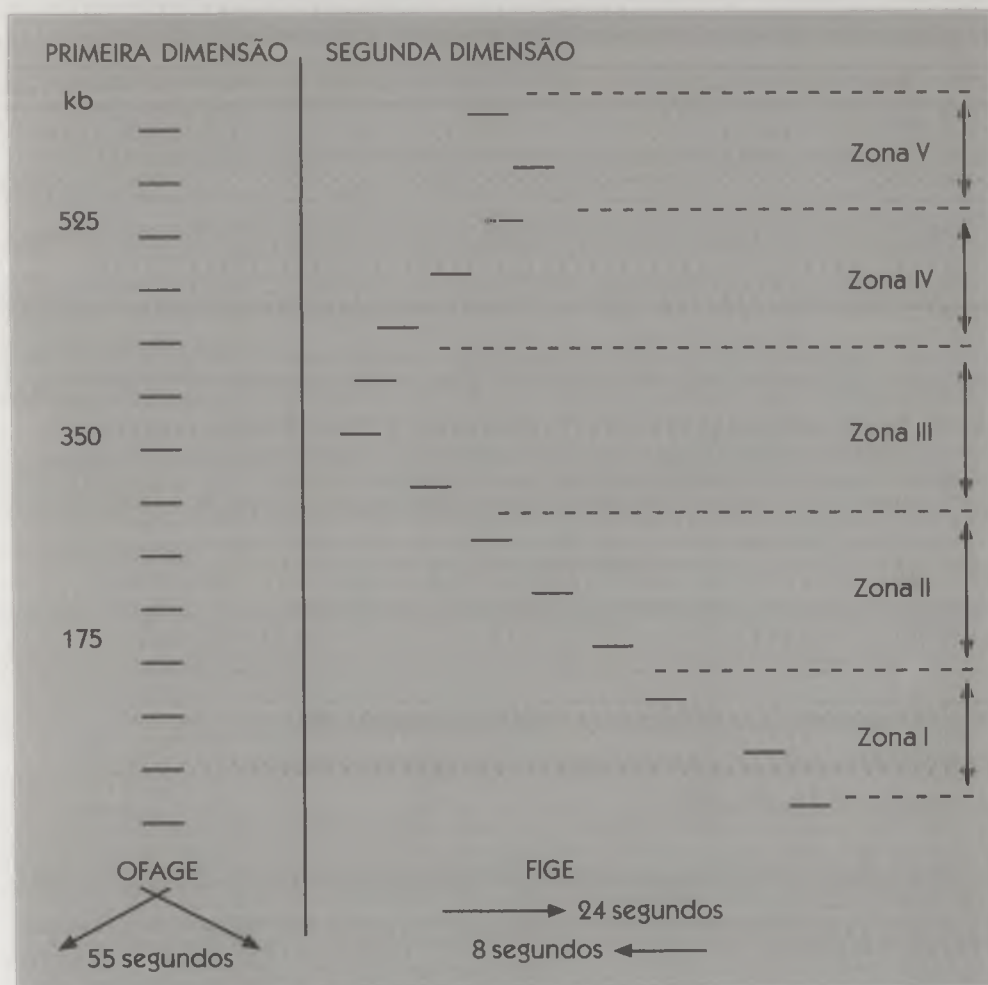


FIGURA 7. Representação esquemática da migração relativa em 2D-PFGE (Two Dimensional Pulsed Field Gel Electrophoresis) com concatêmeros de DNA de lambda em OFAGE e FIGE (Sanseau *et al.*, 1990).

Inversão de bandas já foram identificadas em FIGE, em PFGE e, em menor escala, em CHEF. Carle (1992) relaciona o tamanho das moléculas com sua mobilidade em FIGE de acordo com a localização no gel, dividido em 4 regiões: A, B, C, D. Em B, C, D, a migração é inversamente proporcional ao tamanho da molécula, como esperado, mas, na zona A, ocorre inversão (Fig. 8). Maiores detalhes sobre os princípios e a evolução da técnica da eletroforese em campo pulsado constam da revisão de Mühlen (1995).

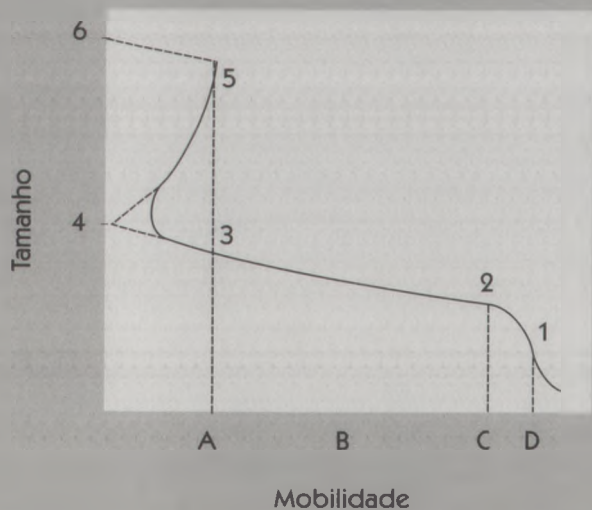


FIGURA 8.

Representação da relação entre o tamanho das moléculas do DNA e mobilidade. Nas regiões B, C, D a migração é inversamente proporcional ao tamanho da molécula como esperado e na zona A ocorre inversão. O ponto 4 representa o tamanho correspondente à ressonância, para o regime de pulsos empregados (Carle, 1992).

METODOLOGIA EMPREGADA PARA SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS BANDAS CROMOSSÔMICAS DE MICRORGANISMOS

As etapas para a preparação das amostras para a eletroforese em campo pulsado do DNA ou cromossomos intactos de microrganismos são basicamente as mesmas. O importante nas preparações é o mínimo de manipulação com o DNA, principalmente para separação de cromossomos. Para isso, as células (leveduras) ou protoplastos (fungos filamentosos) são incluídos em pequenos géis de agarose ("plugs"), e todos os tratamentos

posteriores são feitos com esses plugs, que são a seguir colocados no gel de corrida na cuba de eletroforese. Esse procedimento permite grande estabilidade do DNA e facilita o armazenamento. Para leveduras, por exemplo, pode-se incluir células intactas nos plugs, seguindo-se a obtenção de protoplastos, lise e aplicação no gel de corrida. Para fungos filamentosos, geralmente os protoplastos previamente obtidos são incluídos nos plugs. Diferentes protocolos e métodos são descritos por Burmeister & Ulanovsky (1992).

Como exemplo, descrevemos abaixo um protocolo para separação dos cromossomos de fungos filamentosos (*Aspergillus nidulans*, de Brody & Carbon, 1989, com modificações).

Preparação dos Plugs

- a) Inoculação de uma suspensão de esporos em meio de cultura líquido (1×10^9 esporos/ml) e incubação a 32°C, por 18-20 horas em agitador incubador (150 rpm).
- b) Coleta do micélio por filtração, lavagem por duas vezes com tampão isotônico (0.6 M KCl, pH 5.8) e suspensão do mesmo em tampão isotônico (100 mg de micélio em 2 ml), adição de enzima lítica (Novozym 234, Novo Industries) na concentração 2.5 mg/ml e incubação por 2 horas, a 32°C, sob agitação branda (50 rpm).
- c) Filtração da suspensão em seringa com lâ de vidro, centrifugação do filtrado contendo os protoplastos a 2.500 rpm por 10 minutos e o *pellet* de protoplastos lavados com tampão isotônico e centrifugados por mais três vezes.
- d) Adição de igual volume da suspensão de protoplastos com 1.4% de agarose de baixo ponto de fusão (LGT, Sigma A 4018), a 37°C (agarose pré-aquecida a 42°C) e adição da mistura protoplastos/agarose nos moldes dos plugs. A concentração final da agarose é de 0.7% com $2-4 \times 10^8$ protoplastos/ml.
- e) Resfriamento dos plugs a 4°C por 10 minutos e tratamento com tampão NDS (0.5 M EDTA, pH 5.8/10 mM Tris-HCl, pH 9.5/1% N-lauroilsarcosinato de sódio) contendo proteinase K (1 mg/ml) a 50°C por 18 horas.
- f) Lavagem dos plugs por três vezes em 50 mM EDTA, pH 8.0, a 50°C por 30 minutos, lavagem por duas vezes em 50 mM EDTA à temperatura ambiente por 30 minutos e estocagem a 4°C em 50 mM EDTA.

CONDIÇÕES DA ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO EM CHEF

Para a resolução dos cromossomos de fungos filamentosos em CHEF (CHEF DR II, Bio Rad) que tem disposição hexagonal dos eletrodos e ângulo fixo de 120°, as condições (também para *A. nidulans* de acordo com Brody & Carbon, 1989, com modificações) são:

- a) O gel é preparado com agarose 0.8% (agarose para eletroforese em campo pulsado – Sigma A 2929) em tampão TBE 0.5 x (45 mM Tris-borato/1 mM EDTA, pH 8) e colocado diretamente no molde do equipamento.
- b) Os plugs de agarose são inseridos nas canaletas e vedados com agarose.
- c) A eletroforese é efetuada nas seguintes condições: temperatura constante de 12°C, 48 volts e três intervalos de pulso de 50, 45 e 37 minutos com duração de 73, 18 e 73 horas, respectivamente (total de 164 horas = 6,83 dias).
- d) Após a corrida, o gel é corado com solução de brometo de etídio (0.5 µg/ml) por 30-45 minutos e a seguir observado em transiluminador.

As condições de corrida podem ser alteradas quanto a tampão de corrida (TBE como descrito ou TAE), intervalos de tempo fixo dos pulsos e tempo de cada pulso, ou ainda com um gradiente linear de tempo dos pulsos (em rampa linear) como tempo de pulso gradativo de 30 a 90 minutos por um total de 168 horas; voltagem; concentração do gel; temperatura, entre outros. Essas alterações são feitas principalmente em função do tamanho dos cromossomos.

Se o objetivo da separação for apenas determinação do tamanho dos cromossomos de uma determinada espécie e, conseqüentemente, a determinação do tamanho do genoma, emprega-se uma espécie padrão na mesma corrida e faz-se a estimativa do peso molecular das bandas obtidas pelo diagrama traçado do log do peso molecular conhecido versus a distância de migração no gel (cm).

Para ilustrar, a Fig. 9 mostra os 8 cromossomos de *A. nidulans* que podem ser visualizados em 6 bandas cromossômicas (duas bandas são duplas), obtidas conforme a metodologia aqui descrita. As linhagens A e B (canaletas 2 e 3) não mostram a banda cromossômica correspondente ao cromossomo II do controle (canaleta 1, linhagem haplóide), mas apre-

sentam uma nova banda de aproximadamente 5.2 Mb, que por análise genética, corresponde a uma parte do cromossomo I duplicado e translocado para o cromossomo II. A Tabela 3 apresenta o tamanho das 6 bandas cromossômicas (Mb) estimadas por Brody & Carbon (1989) e de 7 bandas estimadas por Montenegro *et al.* (1992), pela separação dos cromossomos III e VI (corrida de 15 dias).

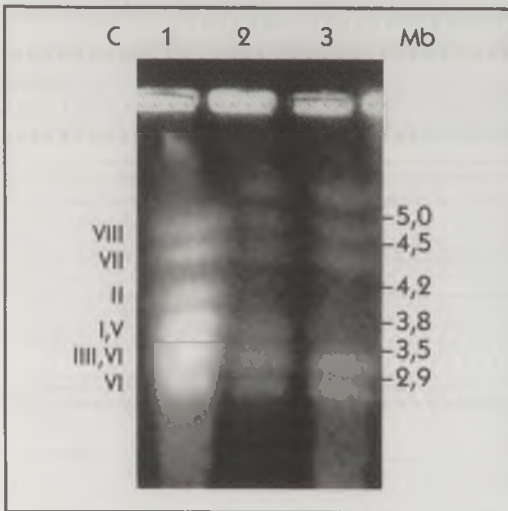


FIGURA 9. Resolução de bandas cromossômicas de *Aspergillus nidulans*, identificação dos cromossomos e de duplicação cromossômica. Canaleta 1 – linhagem haplóide AM. Canaletas 2 e 3 – linhagens haplóides e portadoras de duplicação cromossômica (Queiroz *et al.*, 1997).

TABELA 3. Estimativa do peso molecular dos cromossomos de *Aspergillus nidulans* obtida por duas diferentes metodologias.

CROMOSSOMOS DE ASPERGILLUS NIDULANS

Brody & Carbon, 1989		Montenegro <i>et al.</i> , 1992	
Cromossomo	Tamanho (Mb)	Cromossomo	Tamanho (Mb)
VIII	5.0	VIII	5.0
VII	4.5	VII	4.5
II	4.2	II	4.1
I, V	3.8	I, V	3.7
III, VI	3.5	III	3.4
		VI	3.0
IV	2.9	IV	2.4

Se o interesse é a identificação de um determinado cromossomo, o procedimento adequado é fazer uso da hibridação das bandas cromossômicas com uma sonda marcada. O DNA do gel é transferido para uma membrana de nylon, e plasmídeos ou fragmentos de DNA marcados são hibridados com essa membrana; a seguir, a localização de um gene ou de um segmento específico de DNA é revelada pela auto-radiografia. Os cromossomos de *A. nidulans*, *Neurospora crassa* e *S. cerevisiae* foram rapidamente identificados e relacionados aos seus respectivos grupos de ligação pela hibridação com grande número de marcadores já anteriormente mapeados por análise genética.

APLICAÇÕES DA TÉCNICA

A eletroforese em campo pulsado tem sido utilizada em praticamente todos os organismos, de vírus a eucariotos superiores, como plantas e ani-mais, incluindo o homem, e com as mais diversas finalidades. Aqui serão citadas algumas das aplicações relacionadas aos microrganismos, com maior ênfase nos fungos. Uma lista de referências bibliográficas por aplicações e por organismo pode ser encontrada em Birren & Lai (1993).

Determinação do Cariótipo Eletroforético

O termo "cariótipo", por definição, é o conjunto completo de cromossomos de uma célula ou organismo, e é empregado especialmente para designar o arranjo dos pares de cromossomos homólogos em ordem decrescente de tamanho e organizado a partir de fotografias de metáfases mitóticas. Essa definição se aplica perfeitamente para organismos eucariotos superiores diplóides, pois, em grande parte deles, o cariótipo é considerado como um dos parâmetros utilizados para definir uma determinada espécie.

No entanto, em fungos, onde a maioria é haplóide, os cromossomos são extremamente pequenos para serem observados em microscopia ótica e, por isso, é difícil haver cariótipos descritos. Em muitas espécies de fungos, naquelas que são geneticamente bem estudadas, são conhecidos os grupos de ligação determinados por análises genéticas. Porém, uma correlação entre os grupos de ligação e identidades físicas, os cromossomos,

tão bem estabelecida em *Drosophila*, milho, homem e tantas outras espécies, era dificultada nos fungos. Com a técnica da eletroforese em campo pulsado, o genoma dos microrganismos passou a ter uma identidade física, desde que a maioria deles contenha cromossomos na faixa de peso molecular possível de ser separada em gel (de 50 a 15 Mb), formando bandas cromossômicas cujo conjunto tem sido denominado de "cariótipo eletroforético". Atualmente, cerca de 70 espécies de fungos tem o seu cariótipo determinado.

Como Técnica Auxiliar na Taxonomia

O polimorfismo revelado no padrão de bandas cromossômicas está diretamente relacionado ao peso molecular dos cromossomos. Assim, essa técnica tem sido utilizada como auxiliar na taxonomia, identificando variações cromossômicas a nível de espécie e gênero. Variações entre linhagens de uma mesma espécie também são possíveis (como as duplicações cromossômicas mostradas na Fig. 9). Um dos primeiros trabalhos nessa linha foi realizado com diferentes gêneros e espécies de leveduras e espécies de basidiomicetos empregando-se OFAGE e um padrão de *S. cerevisiae* (Jonge *et al.*, 1986). Uma representação esquemática do padrão eletroforético para as espécies de leveduras está apresentada na Fig. 10, onde pode ser evidenciado o alto polimorfismo entre as diferentes espécies e mesmo entre as 5 linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas.

Separação de DNAs Circulares

A eletroforese em campo pulsado trata-se também de uma técnica útil na separação de DNAs circulares de alto peso molecular, uma vez que estes são menos sensíveis às mudanças dos intervalos de pulso do que DNAs lineares. Os grandes DNAs circulares podem ter aproximadamente a mesma mobilidade em corridas com variações drásticas de pulso, que provocam grandes mudanças na mobilidade de DNAs lineares. Assim, é possível a distinção entre um DNA circular e um linear, como pode ser verificado na Fig. 11. Com pulso de 10 segundos, o plasmídeo circular de 60 kb migra aproximadamente como o DNA linear de 200 kb. Com 30 segundos, esse mesmo plasmídeo co-migra com o DNA linear de 670 kb.

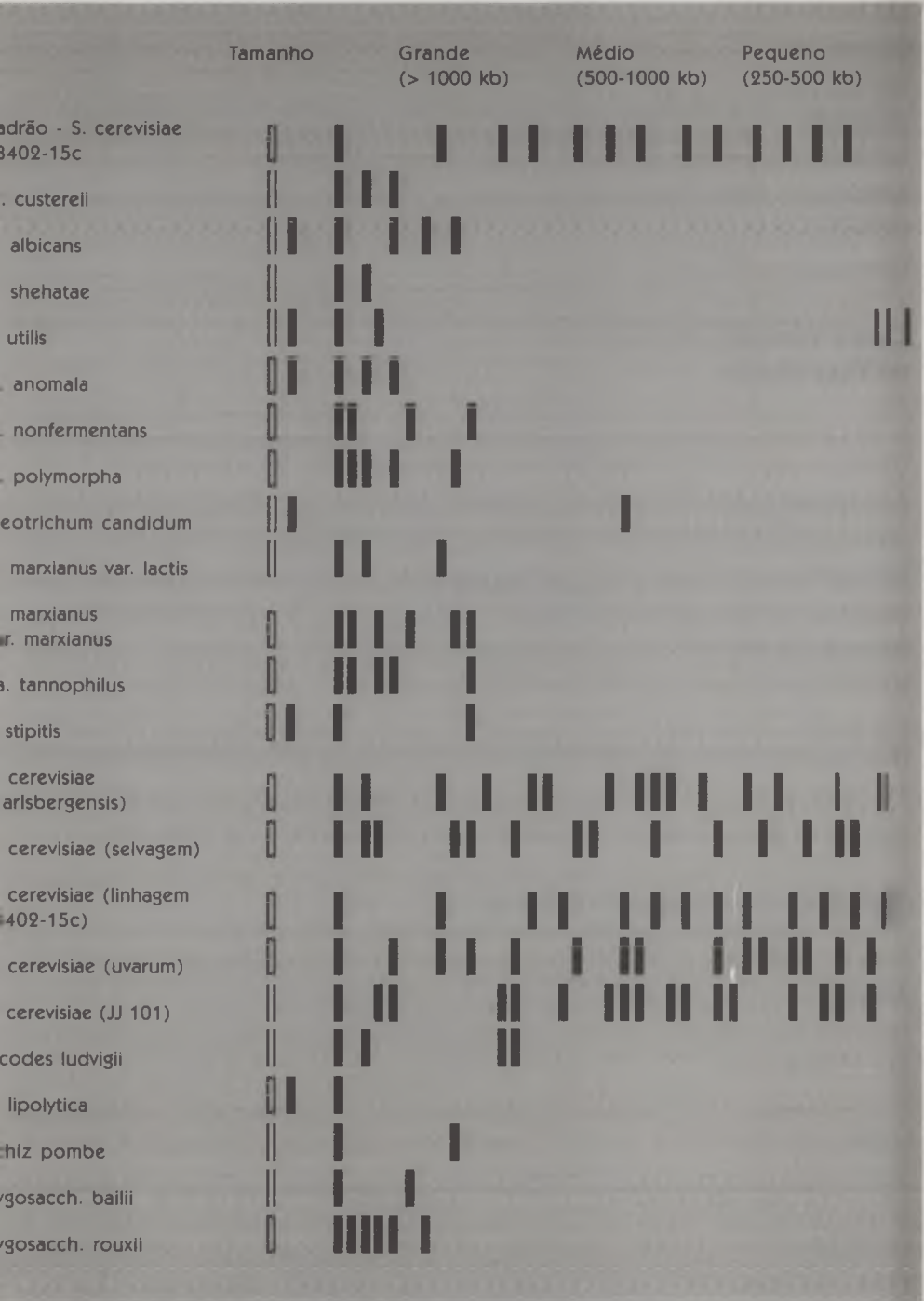


FIGURA 10. Representação esquemática do padrão eletroforético de diferentes espécies de leveduras com OFAGE (adaptado de Jonge *et al.*, 1986).

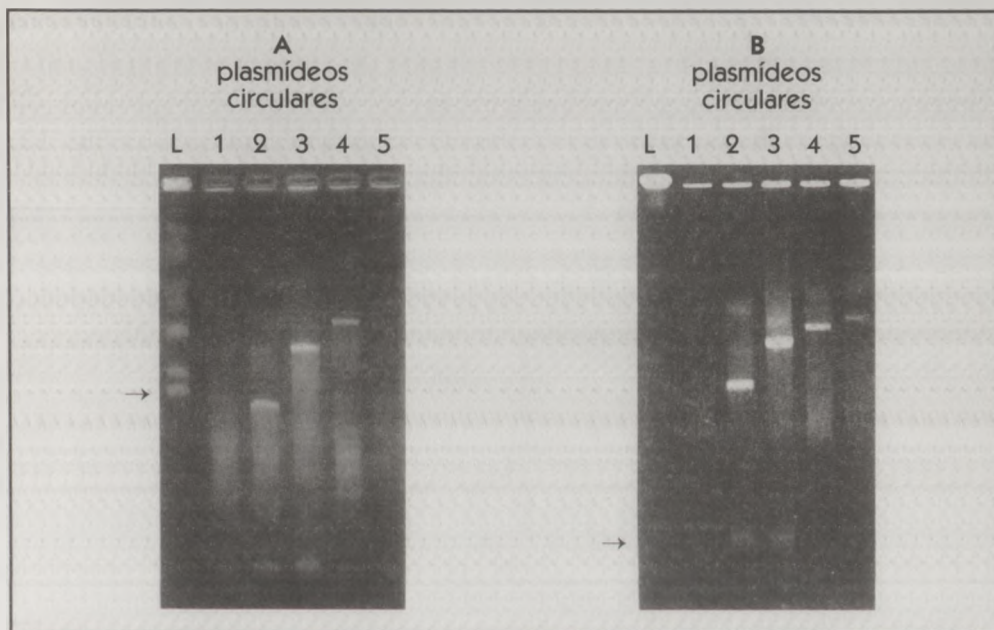


FIGURA 11. Separação diferencial de DNA circular e linear em função de intervalos de pulso. L – cromossomos lineares de levedura; 1, 2, 3, 4, e 5 – plasmídeos circulares de *E. coli* com 60, 100, 140 e > 400 kb, respectivamente; A – pulso de 10 segundos; B – pulso de 30 segundos. A seta indica a posição do menor cromossomo de levedura, 200 kb (Birren & Lai, 1993).

LOCALIZAÇÃO DE MARCADORES EM TRANSFORMANTES

Após uma transformação genética, muitas vezes torna-se necessária a confirmação da mesma entre os transformantes obtidos e a distinção entre os tipos de transformação: por não-integração ou integração, e, neste último caso, a distinção entre uma substituição e uma inserção homóloga ou heteróloga. Os cromossomos individualizados em um gel prestam-se perfeitamente para essa finalidade, facilitando a localização do gene transformado pela hibridação dos cromossomos com o gene (ou o vetor) usado como sonda. Para ilustrar essa aplicação da eletroforese em campo pulsado, a confirmação da integração do gene *argB* no cromossomo III de *A. nidulans* foi realizada por Fungaro *et al.* (1995) em um transformante obtido via biolística. A análise genética anteriormente realizada revelou que houve integração (ou substituição) de *argB* na região homóloga (cromossomo III) ou muito próxima a ela. A hibridação do plasmídeo (sem o

gene *argB*) com o gel contendo os cromossomos confirmou a integração no cromossomo III e eliminou a possibilidade de ter ocorrido transformação por substituição. O gel com as bandas cromossômicas e a análise da hibridação do transformante e do controle estão apresentados na Fig. 12.

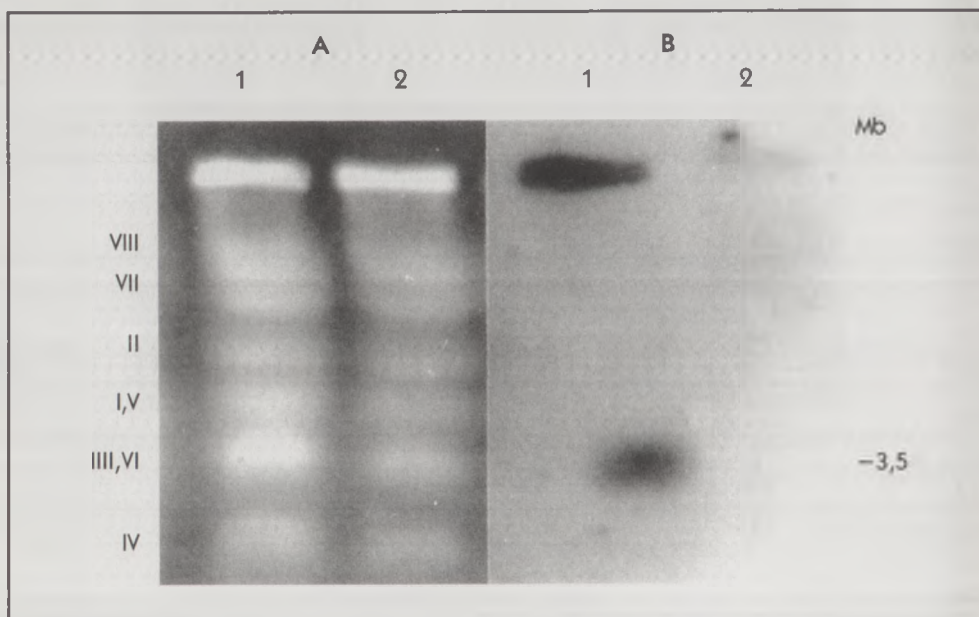


FIGURA 12. Separação do DNA cromossomal intacto de *Aspergillus nidulans* em CHEF (A) e análise da hibridação com o plasmídeo pUC8 marcado com ^{32}P (B) de linhagens transformada (1) e não-transformada (2). O número à direita corresponde ao tamanho dos cromossomos III e VI em Mb (Fungaro *et al.*, 1995).

A confirmação da localização do gene de resistência ao herbicida metolachlor em transformantes de *S. cerevisiae* também foi possível pela separação dos cromossomos em campo pulsado, comprovando-se o mapeamento genético prévio de inserção do referido gene no grupo de ligação XV. A banda cromossômica correspondente ao cromossomo XV foi recortada do gel e, por eletroeluição, o DNA foi extraído, purificado e hibridado com o plasmídeo pMTC 15, vetor contendo o gene de resistência a metolachlor. A Fig. 13 mostra o padrão eletroforético obtido para linhagens resistentes e sensíveis (CHEF) e a Fig. 14 mostra a auto-radiografia da hibridação do cromossomo XV com o plasmídeo pMTC 15 nos transformantes resistentes e não-hibridação dos cromossomos XIII e XVI de transformantes resistentes e de linhagens sensíveis (Silva, 1995).

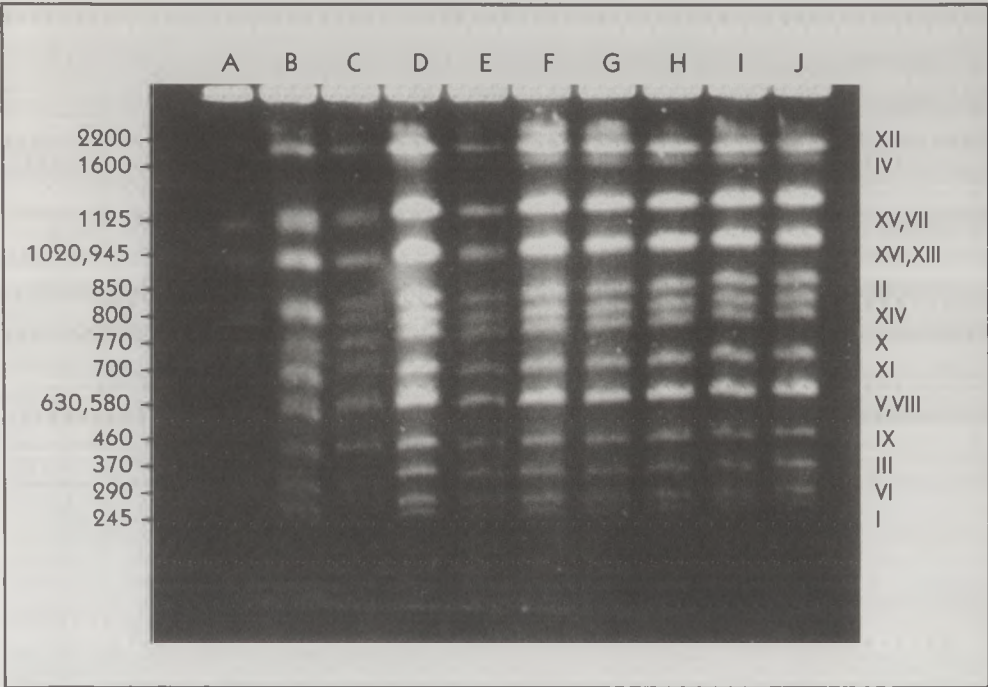


FIGURA 13. Padrão de bandas cromossômicas de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* por CHEF. A – 1904; B – Fleischmann; C – M 300A; D – AH22; E – M 304-2C; F/H – MD 3000 (LiAc); I/J – MD 3000 (KAc) (Silva, 1995).

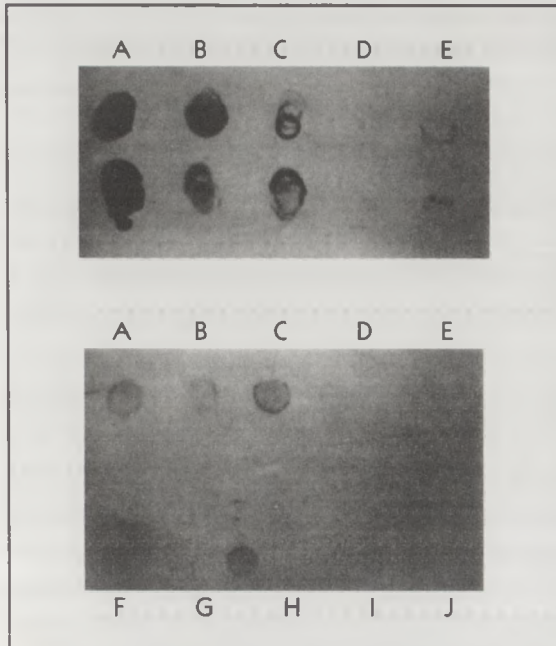


FIGURA 14. Auto-radiografia da hibridação dos cromossomos XV e XIII/XVI de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com o plasmídeo pMTC 15. A – M 300 2C R (XV); B – M 30A R (XV); C – MD 3000 (XV); D, E – MD 3000 (XIII/XVI); F – MD 3000 (XV); G – M 304-2C R (XIII/XVI); H – AH22 R (XV); I – AH 22 R (XIII/XVI); J – M300A R (XV) (Silva, 1995).

CONSTRUÇÃO DE BANCO GENÔMICO DE CROMOSSOMOS ESPECÍFICOS (RETIRANDO O CROMOSSOMO DO GEL, UTILIZAÇÃO DE CAMPO PULSADO BI-DIMENSIONAL)

Mapeamento do Genoma Bacteriano por 2D-Pulsed Field

Os princípios para essas duas aplicações são basicamente os mesmos e estão apresentados no esquema da Fig. 15. Uma banda cromossômica específica, obtida após uma primeira corrida em gel por campo pulsado, ou uma seqüência de bandas, é submetida ao tratamento com enzimas de restrição e colocada para uma segunda corrida em uma segunda dimensão, onde fragmentos de um cromossomo ou de um segmento específico são separados, restringindo-se assim regiões específicas de interesse.

Utilização da Cariotipagem em Leveduras Industriais

Na produção industrial de álcool, diversas linhagens de *S. cerevisiae* como Fleishmann, Itaiquara, IZ-1904, TA (M-300-A), NF (não-floculante), linhagens termotolerantes, linhagens osmotolerantes, linhagens alcotolerantes, têm sido selecionadas e empregadas já por muitos anos pelas destilarias do estado de São Paulo. No entanto, até aproximadamente 5 anos atrás, existia certa dificuldade na identificação e constatação da permanência ou não da linhagem inoculada durante todo o processo da fermentação. Nesse sentido, o departamento de Química e o departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da ESALQ/USP têm realizado um acompanhamento das leveduras durante o processo em 25 destilarias, pela análise do cariótipo eletroforético, além das outras análises químicas e microbiológicas. Interessante que diferentes linhagens são identificadas durante o processo de fermentação, com períodos diferentes de permanência e também diferentes quanto às destilarias analisadas. De maneira geral, as leveduras industriais inoculadas permanecem no processo por apenas 30 a 40 dias, sendo substituídas por outras, denominadas nativas pelos pesquisadores envolvidos nesse trabalho (Amorin, H.V.; Basso, L.C.; Oliveira, A.J.). Por exemplo, durante o ano de 1995, a Destilaria Alta Mogiana, que na época utilizava 300 toneladas de fermento e produzia 700.000 litros de álcool/dia (hoje produz mais de 1.000.000), iniciou o processo com 10 toneladas de Fleischmann e 1.5 kg de 3 diferentes linhagens (pela cariotipagem) que anteriormente haviam sido constatadas nessa destilaria. Após 15 dias do início da fermen-

tação, havia predominância das 3 linhagens, e após 30 dias, apenas uma dessas linhagens foi constatada (Amorin, 1995, comunicação pessoal).

OUTRAS APLICAÇÕES

Entre as outras aplicações da eletroforese em campo pulsado estão a análise do genoma de protozoários: cariótipo, estrutura cromossômica e banco genômico de cromossomos específicos; construção de banco genômico de cromossomos artificiais de leveduras (YACs); análise de clones

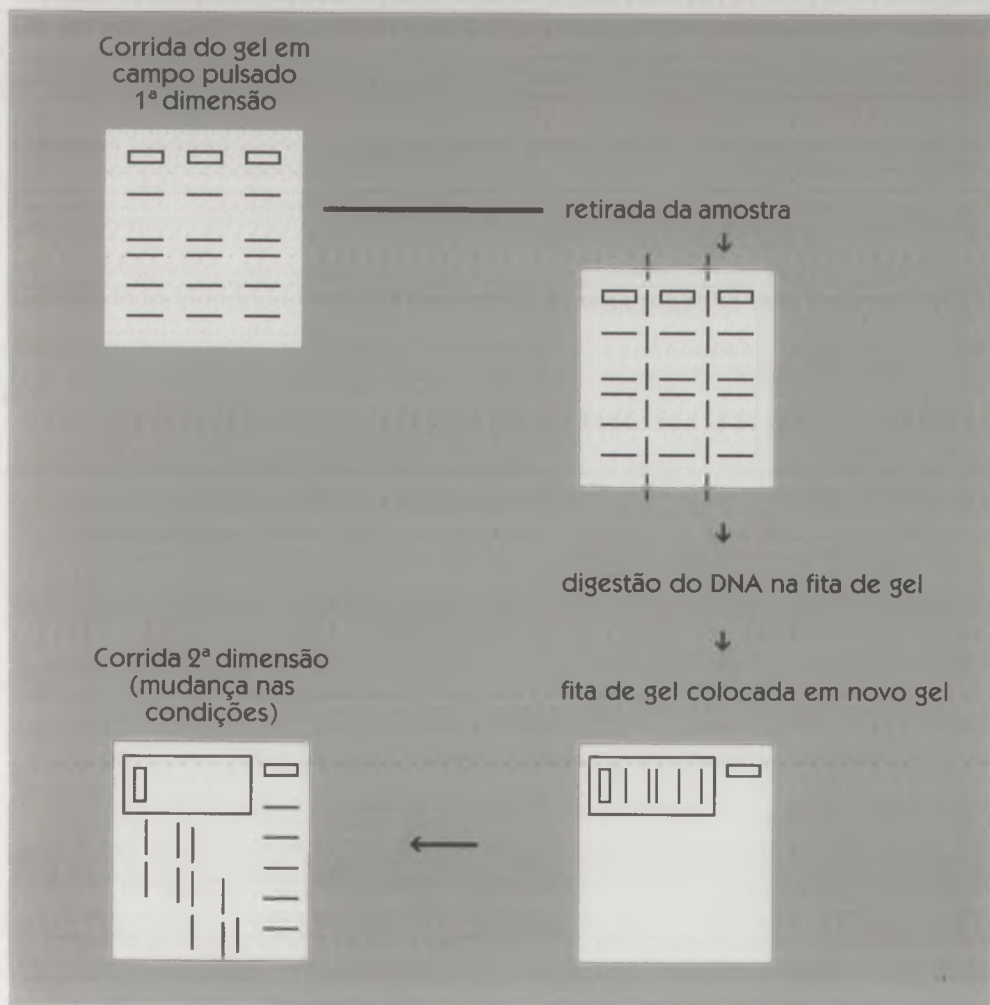


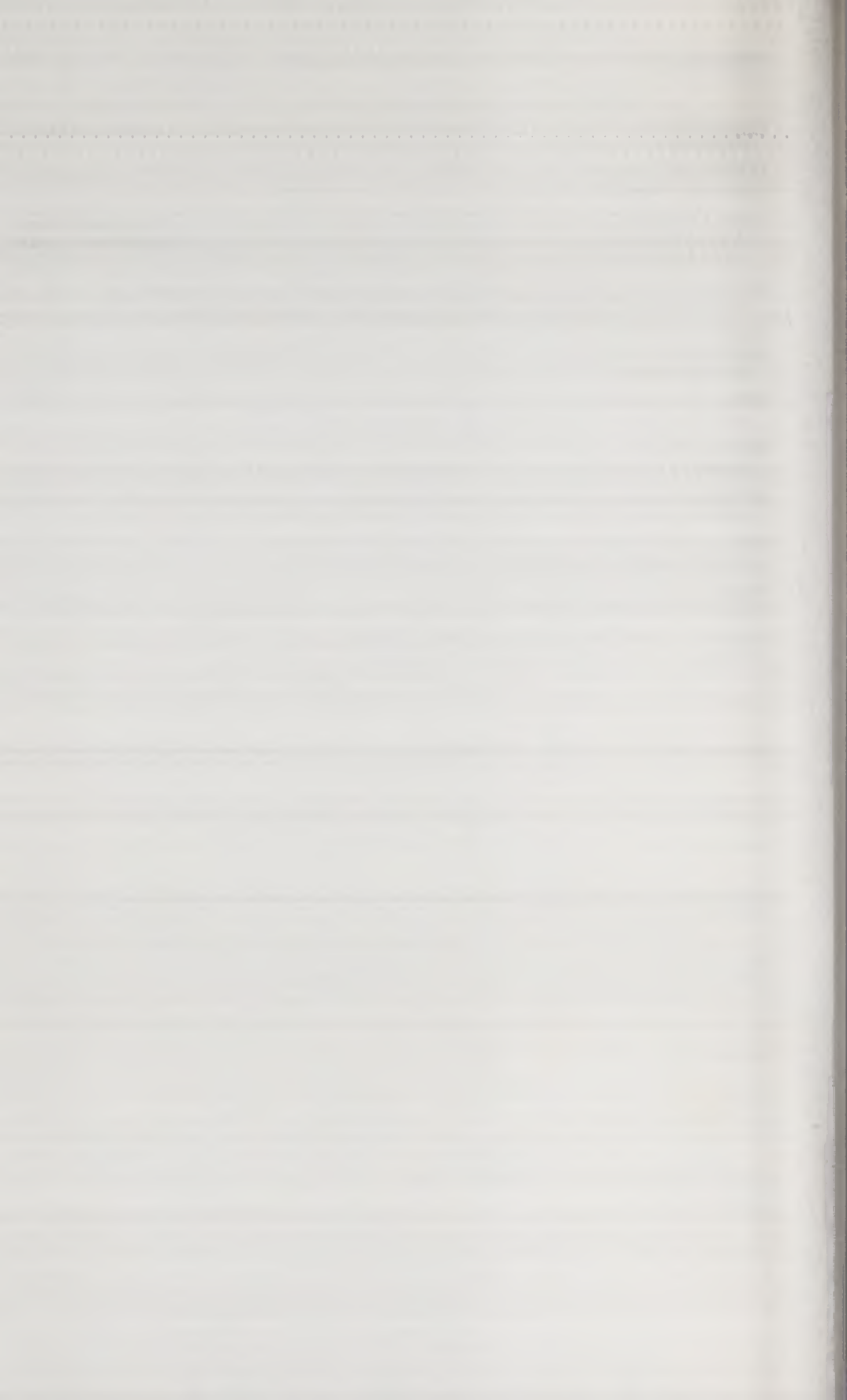
FIGURA 15. Metodologia para construção de banco genômico de cromossomo específico/mapa de restrição por eletroforese em campo pulsado bi-dimensional.

de YACs; estratégias para mapeamento de grandes regiões do genoma humano; análise de regiões de DNA repetitivo do genoma humano (satélite alfa centromérico); construção de banco de grandes fragmentos de lambda.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANCROFT, I.; WOLK, C.P. Pulsed homogeneous orthogonal field gel electrophoresis (PHOGE). **Nucleic Acids Research**. v.16, p.7405-7418, 1988.
- BIRREN, B.; LAI, E. **Pulsed field gel electrophoresis: a practical guide**. San Diego: Academic Press, 1993. 253p.
- BRODY, H.; CARBON, J. Electrophoretic karyotype of *Aspergillus nidulans*. **Proceedings of the National Academy of Science, USA**, v.86, p.6260-6263, 1989.
- BURMEISTER, M.; ULANOVSKY, L. ed. **Pulsed-field gel electrophoresis: protocols, methods, and theories**. New Jersey: Humana Press, 1992. 481p. (Methods in Molecular Biology, 12).
- CANTOR, C.R.; GAAL, A.; SMITH, C.L. High-resolution separation and accurate size determination in pulsed field gel electrophoresis of DNA. 3. Effect of electrical field shape. **Biochemistry**. v.2, p.9216-9221, 1988.
- CARLE, G.F. Field-inversion gel electrophoresis. In: BURMEISTER, M.; ULANOVSKY, L. ed. **Pulsed-field gel electrophoresis: protocols, methods, and theories**. New Jersey: Humana Press, 1992. p.3-18 (Methods in Molecular Biology, 12).
- CARLE, G.F.; OLSON, M.V. Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field-alternation gel electrophoresis. **Nucleic Acids Research**. v.12, p.5647-5664, 1984.
- CARLE, G.F.; FRANK, M.; OLSON, M.V. Electrophoretic separation of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. **Science**, v.232, p.65-68, 1986.
- CHU, G.; GUNDERSON, K. Separation of large DNA By a variable-angle contour-clamped homogeneous electric field apparatus. **Analytical Biochemistry**. v.194, p.439-446, 1991.
- CHU, G.; VOLLRATH, D.; DAVIS, R.W. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. **Science**. v.234, p.1582-1585, 1986.
- CLARK, S.M.; LAI, E.; BIRREN, B.W.; HOOD, L. A novel instrument for separating large DNA molecules with pulsed homogeneous electric fields. **Science**. v.241, p.1203-1205, 1988.
- FUNGARO, M.H.P.; RECH, E.; MÜHLEN, G.S.; VAINSTEIN, M.H.; PASCON, R.C.; QUEIROZ, M.V.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Transformation of *Aspergillus nidulans* by microprojectile bombardment on intact conidia. **FEMS Microbiology Letters**. v.125, p.293-298, 1995.
- GARDINER, K.; LAAS, W.; PATTERSON, W. Fractionation of large mammalian DNA restriction fragments using vertical pulsed field gradient gel electrophoresis. **Somatic Cell Molecular Genetics**, v.12, p.185-195, 1986.
- JONGE, P.; JONGH, F.C.M.; MEIJERS, R.; STEENSMA, H.Y.; SCHEFFERS, W.A. Orthogonal-field alternation gel electrophoresis banding patterns of DNA from yeasts. **Yeast**, v.2, p.193-204, 1986.
- KOLBLE, K.; SIM, R.B. An angle-variable three-dimensional pulsed field gel electrophoresis system. **Analytical Biochemistry**. v.192, p.32-38, 1991.
- LIU, J.; HSIEH, Y.Z.; WIESLER, D.; NOVOTNY, J. Design of 3-(4-carboxybenzoyl)-2 quinoline carboxyaldeide as a reagent for ultrasensitive determination of primary amines by capillary electrophoresis using laser fluorescence detection. **Analytical Chemistry**. v.63, p.408, 412, 1991.
- MONTENEGRO, E.; FIERRO, F.; FERNANDEZ, F.J.; GUTIERREZ, S.; MARTIN, J.F. Resolution of chromosomes III and VI of *Aspergillus nidulans* by pulsed-field gel electrophoresis shows that penicillin biosynthetic pathway genes **pcbAB**, **pcbC**, and **penDE** are clustered on chromosome VI (3.0 megabases). **Journal of Bacteriology**, v.174, p.7063-7067, 1992.
- MÜHLEN, G.S. Eletroforese em campo pulsado: evolução da técnica e sua aplicação em um caso específico. Piracicaba: ESALQ-USP, 1995. 126 p. Dissertação de Mestrado.

- PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. **Técnicas eletroforéticas para separação de cromossomos de microrganismos**. Piracicaba: FEALQ, 1989. 31p. (Manual Técnico FEALQ).
- QUEIROZ, M.V.; GLATIGNY, A.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; SCAZZOCCHIO, C.; AZEVEDO, J.L. Electrophoretic karyotype of *Aspergillus nidulans* strains with chromosome duplications. 1997. (no prelo)
- SANSEAU, P.; TIFFOCHE, C.; KAHLOUN, A.E.; COLLIN, O.; ROLLAND, J.P.; LE PENNEC, J.P. Increased resolution of large DNA fragments by a two dimensional pulse field gel electrophoresis **Analytical Biochemistry**, v.189, p.142-148, 1990.
- SCHWARTZ, D.C.; CANTOR, C.R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Cell**, v.37, p.67-75, 1984.
- SCHWARTZ, D.C.; SAFFRAN, W.; WELSH, J.; HAAS, R.; GOLDENBERG, M.; CANTOR, C.R. New techniques for purifying large DNAs and studying their properties and packaging. **Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology**, v.47, p.189-195, 1982.
- SERWER, P. Gel electrophoresis with discontinuous rotation of the gel: An alternative to gel electrophoresis with changing direction of the electric field. **Electrophoresis**, v.8, p.301-304, 1987.
- SILVA, N.A. Clonagem e mapeamento molecular do gene de resistência ao metolachor em *Saccharomyces cerevisiae*. Piracicaba: ESALQ-USP, 1995. 94p. Dissertação de Mestrado.
- SOUTHERN, E.M.; ANAND, R.; BROWN, W.R.A.; FLETCHER, D.S. A model for the separation of large DNA molecules by crossed field gel electrophoresis. **Nucleic Acids Research**, v.15, p.5925-5943, 1987.
- SUDOR, J.; NOVOTNY, V. Separation of large DNA fragments by capillary electrophoresis under pulsed field conditions. **Analytical Biochemistry**, v.66, p.2446-2450, 1994.
- TURMEL, C.; BRASSARD, E.; SLATER, G.W.; NOOLANDI, J. Molecular detrapping and band narrowing with high frequency modulation of pulsed field electrophoresis. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.569-575, 1990.
- VOLLRATH, D.; DAVIS, R.W. Resolution of DNA molecules greater than 5 megabases by contour-clamped homogeneous electric fields. **Nucleic Acids Research**, v.15, p.7865-7876, 1987.



10

USO DE TÉCNICAS NUCLEARES EM ECOLOGIA MICROBIANA

Siu Mui Tsai

Artur E. Ribeiro Bastos

David Henry Moon

Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo
Caixa Postal 96, CEP 13400-970, Piracicaba, SP

INTRODUÇÃO

Um dos problemas mais cruciais dos ambientalistas é conhecer a habilidade dos microrganismos para degradarem xenobióticos e detectar os produtos recalcitrantes derivados dos processos biológicos. Essas estimativas são importantes porque permitem que os pesticidas, por exemplo, sejam usados de modo adequado, trazendo economia para o sistema produtivo através de um aumento na produtividade das culturas e a preservação do meio em que vivemos.

O usuário dos produtos sempre irá se deparar com as seguintes perguntas: onde e quando se deve aplicar o produto no solo? Quanto se deve adicionar? Há necessidade ou não do uso do produto em questão?

Usando isótopos como traçadores ou “espiões”, obteremos novas informações, pois eles podem ser diferenciados com grande precisão dos íons do composto que já está no ambiente ou solo, mesmo que não haja comportamento químico diferente. O sucesso do uso das técnicas nucleares baseou-se principalmente na sua alta sensibilidade de detecção. É possível, sob certas condições, medir quantidades de até 10^{-15} g a uma precisão de 1% de vários elementos, tais como carbono ou fósfo-

ro. Além disso, o tempo de experimentação para acompanhar um processo metabólico fica mais reduzido, em alguns casos, podendo-se obter a informação em questão de minutos ou até de segundos.

Os isótopos podem ser usados como traçadores ou fontes de radiação nessa área de estudo. Suas vantagens como traçadores podem ser assim descritas:

- a) maior sensibilidade em relação às medidas químicas;
- b) permitem a descrição dos passos de um elemento particular através de um processo metabólico, o que seria impossível pelos métodos comuns;
- c) podem ser detectados e localizados por filmes de raio X e podem ser distinguidos dos seus homólogos não-radioativos, apesar do comportamento químico semelhante.

Como fontes de radiação, suas aplicações estão principalmente na medicina, nas pesquisas genéticas como irradiação esterilizante e nas medidas físicas do ambiente a ser monitorado. Nos estudos em ecologia microbiana, a radiação gama tem sido muito usada para indução de mutação em microrganismos (doses mais baixas, abaixo de 100 krad) e para esterilização de substratos ou solos (doses acima de 5 Mrad), para uso como veículos de inoculantes ou para eliminação de microrganismos.

Os isótopos usados como traçadores em ecologia são os que correspondem aos elementos que compõem o produto: ^{32}P , ^{35}S , ^{45}Ca , ^{59}Fe , ^{64}Cu , ^{65}Zn , ^{14}C , ^3H , ^{15}N e ^{18}O , sendo os dois últimos isótopos estáveis. Grande parte deles pode ser facilmente utilizada, uma vez que apresentam radiações de baixa energia, como ^{32}P e ^{35}S , mas o ^{14}C e ^{45}Ca têm problemas, respectivamente, de meia-vida longa (5700 anos) e possibilidade de ser incorporado ao esqueleto ósseo quando ingerido.

A aplicação desses isótopos nos estudos da relação microrganismo-ambiente tem sido bastante diversa, contribuindo para elucidar principalmente problemas de fisiologia e bioquímica, de modo preciso e eficaz. Porém, seu uso tem sido importante em países onde o fator limitante ainda é o custo de insumos de produção, quando torna-se crucial o uso mais adequado desses produtos. A recomendação é governada principalmente pelo "status" do elemento no solo, pelo tipo de solo, vegetação (planta) e fatores climáticos, que, em última análise, só podem ser determinados pela experimentação. A recomendação obtida com esses experimentos é limitada principalmente por causa do custo. Porém, os estudos de eficiência desses insumos podem ser considerados de âmbito econômico.

OBTENÇÃO DE RADIOISÓTOPOS

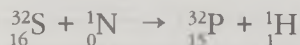
Os seguintes radioisótopos são assim comumente obtidos:

- a) ^{32}P — por captura de deutério com emissão de próton (item a.1) ou por captura de neutron rápido com emissão de próton (item a.2).

- a.1) $^{31}\text{P} (\text{d}, \text{p}) ^{32}\text{P}$



- a.2) $^{32}\text{S} (\text{n}, \text{p}) ^{32}\text{P}$

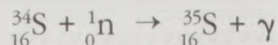


- b) ^{14}C — por captura de neutron rápido com emissão de próton.



- c) ^{35}S — por captura de neutron lento.

- c.1.) $^{34}\text{S} (\text{n}, \gamma) ^{35}\text{S}$



- c.2.) $^{35}\text{Cl} (\text{n}, \text{p}) ^{35}\text{S}$



- d) $^{24}\text{Mg} (\text{d}, \alpha) ^{22}\text{Na}$



O ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{45}Ca , ^{89}Sr são preparados no Reator do IPEN, na Universidade de São Paulo. As unidades de radioatividade mais empregadas são o Curie (símbolo Ci) e o Becquerel (símbolo Bq). O Ci foi originalmente definido em relação à desintegração de 1 g de rádio. Essa desintegração corresponde a $3,7 \times 10^{10}$ dps (desintegrações por segundo) ou 37 GBq. O valor de 1 Curie se estende para todos os outros isótopos. Comumente, para estudos com animais e plantas, emprega-se o millicurie (mCi = $3,7 \times 10^7$ dps) e o microcurie ($\mu\text{Ci} = 3,7 \times 10^4$ dps). Como

não se mede experimentalmente o número de átomos e como é difícil o preparo de um padrão de uma atividade absoluta conhecida para alguns radioisótopos, usamos o conceito de “atividade específica relativa” (ou atividade específica, para simplificar), que vem a ser a taxa de contagem por mg do elemento ($d^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ou $\text{dpm}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$).

Para marcação do composto, ocorrem grandes problemas. A marcação adequada de um produto é difícil pois, além das suas alterações, há o inconveniente dos outros elementos, os que fazem parte da sua composição química, também serem marcados, contaminando o produto final. Para diminuir esse problema, deve-se usar uma pequena quantidade dos mesmos, ou trabalhar com o produto puro, sem mistura de solvente, denominado “livre de carregador” ou “carrier-free”. Outra maneira é estudar simultaneamente os elementos interferentes, conhecidos os seus espectros de energia e tendo meias-vidas relativamente longas. Dessa maneira, poderão ser utilizadas maiores quantidades do produto. Exemplo, na obtenção de ^{32}P , os elementos Fe e Mn são marcados também, transformando-se em ^{59}Fe e ^{51}Mn .

TABELA 1. Isótopos de interesse nos estudos em ecologia microbiana.

ELEMENTO NÚMERO DE MASSA	MEIA-VIDA	CARACTERÍSTICAS DA RADIAÇÃO	ENERGIA (MeV)
^3H	12 A*	β^-	0,018
^{14}C	5.700 A	β^-	0,155
^{15}N	Estável	—	—
^{32}P	14,3 d	β^-	1,710
^{35}S	87,1 d	β^-	0,167
^{42}K	12,4 h	β^-, n	—
^{45}Ca	152 d	β^-	0,254
^{59}Fe	47 d	β^-, n, γ	0,27; 0,46
^{60}Co	5,3 A	β^-, n	1,1; 1,3
^{65}Zn	215 d	β^-, n, γ	0,324; 1,12
^{33}P	25,3 min	γ	0,250

*A = anos; d = dias; h = horas; min = minutos.

USO DE ISÓTOPOS COMO TRAÇADORES

Isótopos nos Ciclos Biológicos do C, N e P

O solo pode ser considerado um organismo vivo porque apresenta todos os processos vitais: nasce (pedogênese), tem estrutura pseudo-coloidal (colóides orgânicos e minerais); respira, assimila (nas transformações químicas e geoquímicas que são absolutamente essenciais ou críticas para a continuação da existência das plantas e dos animais superiores). Uma variedade de processos geoquímicos é modificada e, ocasionalmente, é governada inteiramente pelos processos bioquímicos catalizados pelos organismos vivos. Nas transformações processadas pelos microrganismos que ocorrem no solo, podem estar incluídos os seguintes processos de importância geoquímica:

- a) Mineralização
- b) Imobilização
- c) Oxidação
- d) Redução
- e) Volatilização ou fixação
- f) Formação de depósitos
- g) Solubilização
- h) Acumulação de substâncias inorgânicas nas superfícies microbianas
- i) Fracionamento isotópico

Essas transformações são responsáveis pela ocorrência dos fenômenos biológicos do solo, que participam dos grandes ciclos do carbono, nitrogênio, fósforo e outros nutrientes e degradação dos compostos orgânicos pelos microrganismos do solo.

O CICLO DO CARBONO

Processos Metabólicos do Ciclo do Carbono

O ciclo do carbono é de importância vital, pois este elemento tem papel principal na estrutura protoplasmática e é essencial para o metabolismo de energia dos heterotróficos, com a forma mineral CO_2 de importância para os autotróficos. Dentro desse processo, um vasto número de moléculas orgânicas está interagindo em seqüência com com-

postos inorgânicos de C, num ciclo que descreve o movimento do carbono de estado inorgânico para o orgânico, e vice-versa.

Para estudar essas transformações, o ^{14}C é introduzido nos compostos para descrever todo o processo metabólico. Dentre muitas dessas transformações, podemos citar:

- a) Incorporação do CO_2 pelos microrganismos autotróficos.
- b) Decomposição da celulose, hemicelulose e lignina.
- c) Degradação de substratos orgânicos/compostos químicos (herbicidas, inseticidas etc.).
- d) Estudos sobre exsudatos de raízes.
- e) Processos metabólicos:
 - Embden-Meyerhoff (EM)
 - Entner-Doudoroff (ED)
 - Hexose monofosfato (HMP)
- f) Utilização da glicose ^{14}C em estudos de biomassa microbiana.
- g) Eficiência fotossintética.

A identificação dos compostos orgânicos (aminoácidos, amins, amidas, proteínas etc.) pode ser realizada facilmente, por menor que seja a fração em que eles se apresentem. Podemos citar outro exemplo, o item **e** – processos metabólicos. Muitos estudos sobre persistência dos resíduos de pesticidas são feitos com o auxílio do isótopo ^{14}C . Conhecendo-se todos os componentes do processo metabólico da biodegradação dos pesticidas, basta marcar o substrato inicial para determinar o caminho realizado. O isótopo é, pois, um “espião”.

Outro exemplo é dado pelo item **f**. Quando se quer avaliar os caminhos metabólicos glicolíticos, utilizamos dois métodos:

- a) Medindo a produção do $^{14}\text{CO}_2$ que aparece após a degradação da glicose especificamente marcada.
- b) Medindo a radioatividade em um produto chave da glicólise, por exemplo, o piruvato.

Pode-se medir a radioatividade específica (portanto, é radioatividade por unidade de peso) do composto ou a radioatividade num carbono particular na molécula.

Neste último caso, podemos acompanhar um carbono marcado da glicose para estudo da sua degradação. Atualmente, sabe-se que é possível dirigir o C-metil do piruvato por uma das três rotas metabólicas

glicolíticas principais: Embden-Meyerhoff (EM), Entner-Doudoroff (ED) e Hexose Monofosfato (HMP).

Em alguns casos, a glicose marcada no átomo de carbono-1 é mais prontamente oxidada a $^{14}\text{CO}_2$ do que aquela marcada na posição 6. Se a seqüência glicolítica fosse o único meio pelo qual a glicose pudesse ser convertida em piruvato-3- ^{14}C e depois decomposta até $^{14}\text{CO}_2$, então, dessa forma, o $^{14}\text{CO}_2$ deverá ser produzido com igual intensidade a partir de glicose-1- ^{14}C e glicose-6- ^{14}C . Se o principal caminho metabólico é pelo ED, o carbono-1 da glicose entra no carboxil do piruvato. Se HMP é o principal caminho, o carbono 1 da glicose não entrará no carboxil do piruvato, mas será convertido em CO_2 quando a ribulose-5-P (carbono-5) é formada do ácido 6-fosfogluconico. A oxidação completa do piruvato no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) produz uma razão C-6 (CO_2): C-1 (CO_2) de 1 para a rota EM, e menor que 1 pelas vias HMP e ED. Basta marcar, pois, o C-1 ou C-6 da glicose para se determinar o caminho principal tomado. A análise da radioatividade indicará a localização dos C marcados encontrados no ácido pirúvico. Duas alternativas para cada caminho metabólico podem ser determinadas, conforme o carbono marcado.

O ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) serve como principal rota para a utilização do piruvato na planta e em células de animais. A presença do ciclo do TCA nos microrganismos, especialmente fungos, já está bem documentada. O ciclo TCA está localizado nas mitocôndrias, enquanto as reações dos caminhos metabólicos glicolíticos estão localizadas principalmente no citoplasma.

Com o uso de isótopos em leveduras, demonstrou-se que a primeira função do ciclo TCA é a produção de intermediários para a biossíntese. O ciclo TCA fornece importantes precursores para os aminoácidos, que podem ser sintetizados através da transaminação e aminação redutiva. Descobriu-se também que o CO_2 foi fixado como oxaloacetato.

Biodegradação de Compostos Orgânicos

No estudo do comportamento de moléculas orgânicas, submetidas à ação de um agente (biológico, físico ou químico) de transformação, é fundamental a definição de um método analítico adequado, com sensibilidade suficiente para monitorar a ocorrência do processo (Soulas & Fournier, 1987). O uso de moléculas radiomarcadas é um método importante e preciso na caracterização de processos de transformação (Khan,

1991; Steber & Wierich, 1978). Vários métodos radiométricos têm sido utilizados para monitorar a transformação biológica de poluentes orgânicos em amostras ambientais (Knaebel & Vestal, 1988; Hsu *et al.*, 1990). A aplicação destes métodos normalmente segue a atividade coletada em captadores especiais e aquela remanescente no meio de estudo (Deeley *et al.*, 1985). Apesar da eficiência de detecção da molécula radiomarcada na forma de gases voláteis, metabólitos não-voláteis e do produto original, podem ocorrer perdas destes compostos, não consideradas no balanço total de atividade devido à impossibilidade de sua determinação nos métodos habitualmente utilizados. Independente do meio de estudo, sólido (solo, planta) ou líquido (meio de cultivo, águas), estas perdas podem ser significativas, sendo responsáveis pela baixa recuperação do ^{14}C nos coletores (Hsu *et al.*, 1990; Chandrasena & Sagar, 1986). Podem ser vários os motivos destas perdas, principalmente devido a um sistema de coleta ineficiente, à volatilização do produto em estudo e a vazamentos dos gases formados no processo de transformação. Apesar de vários trabalhos utilizarem compostos radiomarcados, são poucos aqueles que relacionam perdas do produto durante os estudos. Na avaliação da biodegradação do fenol por *Candida nitrativorans*, isolada de solo amazônico, foram observadas perdas do composto e foi caracterizada a ocorrência real da biodegradação com o uso de fenol radiomarcado, com aproximadamente 10^6 dpm (16.700 Bq) de fenol radiomarcado ($^{14}\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ -UL- ^{14}C Sigma). A perda de atividade no frasco controle foi de 19%, provavelmente apenas por causa volatilização do fenol, e no frasco inoculado (*C. nitrativorans*) a perda foi de 58%, relacionada ao fenol e $^{14}\text{CO}_2$ (Fig. 1). Utilizando-se um sistema de coletores externos ao frasco de cultivo, com aeração forçada, fez-se a coleta de $^{14}\text{CO}_2$ em uma série de três coletores externos. As perdas foram reduzidas neste sistema, sendo que no frasco inoculado a perda foi de 33% e no frasco controle de 24%. Portanto, apenas 9% da atividade inicial seriam atribuídos a processos biológicos. Observou-se que a atividade medida a partir do frasco controle não era relacionada à produção de CO_2 , mas à volatilização do fenol (Fig. 2). As curvas obtidas na Fig. 2, utilizando o sistema de coletores externos, produziu uma curva de degradação muito semelhante a uma curva de crescimento da levedura. Com base nestes dados, o sistema de coleta externo, quando comparado ao de coleta interno, deve ser indicado para o estudo de um processo de degradação estritamente aeróbico, através de radiorespi-

rometria, utilizando-se substrato sensível à quebra do equilíbrio das fases gasosa e líquida, como o fenol (Bastos *et al.*, 1997).

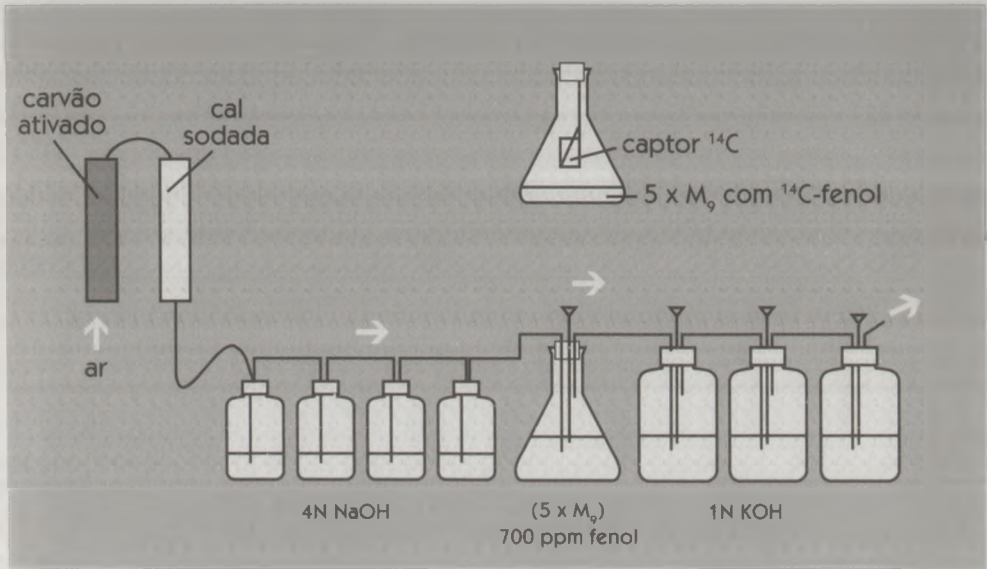


FIGURA 1. Teste radiorespirométrico, com uso de sistema de captores KOH (1N), externos ao frasco de cultivo, para detecção da atividade liberada no processo (Bastos *et al.*, 1997).

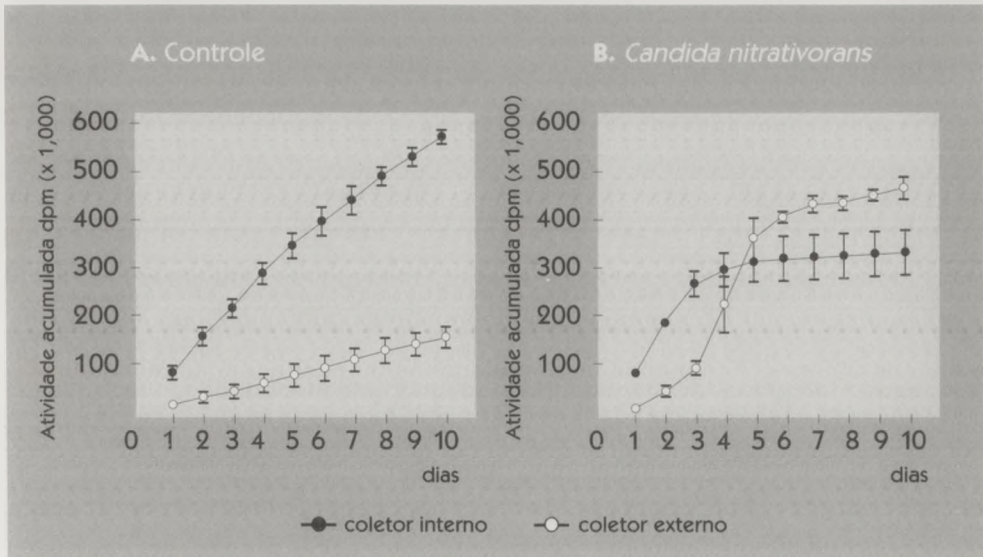


FIGURA 2. Comparação da atividade acumulada no controle (A) e no cultivo com *Candida nitrativorans* (B), usando os sistemas interno e externo de coleta.

Dependendo do objetivo do estudo, o composto é aplicado na planta (estudos de interação planta-microrganismo) ou no solo (atividade microbiana). As plantas ou solos tratados são então coletados dentro de uma seqüência de tempo ou em um dado tempo. Dependendo do elemento ou composto a ser separado e estudado, diferentes protocolos são aplicados para extração e purificação do produto presente na planta ou no solo. Os compostos ou metabólitos marcados são separados usando métodos bioquímicos tais como a cromatografia de camada delgada (TLC—Thin Layer Chromatography), cromatografia gasosa (GC—Gas Chromatography) ou cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC—High-Performance Liquid Chromatography), em combinação com a detecção da radioatividade através da contagem por cintilação líquida. Metabólitos não marcados (“frios”), representando uma porcentagem substancial da quantidade originalmente aplicada para radioatividade são especialmente purificados e concentrados para identificação via cromatografia gasosa/espectrometria de massa (GC/MS—Gas Chromatography/Mass Spectrometer) ou elucidação da estrutura por outros métodos espectrométricos tais como infravermelho (IR—Infrared) ou espectrometria de ressonância nuclear magnética (NMRS—Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry).

Estudos das Interações Planta-Microrganismo-Solo Usando ^{14}C

Compostos orgânicos marcados com ^{14}C têm sido usados extensivamente para acompanhar as taxas de decomposição (mineralização) e estabilização de produtos microbianos. Os substratos podem variar de simples, tais como glicose, acetato e aminoácidos, a complexos, tais como celulose, hemicelulose e proteínas. Materiais como folhas e raízes de plantas, esterco ou compostos com alto peso molecular também podem ser marcados e usados para acompanhamento do processo biológico de decomposição e/ou imobilização dos nutrientes, através do ^{14}C presente nesses substratos (Voroney *et al.*, 1991).

Sem o uso de substratos marcados seria impossível acompanhar os processos de transformação. Segundo Voroney *et al.* (1991), é importante ressaltar que a liberação de $^{14}\text{CO}_2$ ou a determinação do ^{14}C orgânico residual acumulado no solo não reflete a decomposição exclusiva do substrato adicionado, exceto durante o pico da atividade metabólica inicial. Isso acontece porque, durante a decomposição, uma porção

significativa do substrato pode ser usada para biossíntese e esses produtos microbianos poderiam estar sujeitos à degradação. Desse modo, a decomposição de substratos adicionados pode diferir daqueles mesmos produtos presentes no solo e gerados *in situ*, devido à interação dos compostos orgânicos com os constituintes do solo.

As medidas do fluxo de C através da biomassa microbiana no solo que recebeu adições de substratos marcados com ^{14}C podem ser feitas pelo método de fumigação-incubação com clorofórmio (CHCl_3). O fluxo de CO_2 , devido à mineralização das células mortas através da fumigação, é diretamente proporcional ao conteúdo de C da biomassa microbiana (Jenkinson, 1966).

Medida da Decomposição da Matéria Orgânica Usando Abundância Natural de ^{13}C

A conservação das reservas naturais tem sido foco de preocupação de pesquisadores e ambientalistas em anos mais recentes. Em escala global, as reservas de C do solo podem significar uma fonte de suprimento ou dreno de CO_2 atmosférico, e desse modo, torna-se importante o conhecimento do comportamento do C ativo e seu tempo de residência nos solos. Em escala local, os fluxos da matéria orgânica podem gerar gases (por exemplo, metano e óxido nitroso, gases reconhecidos com potenciais "efeito estufa") e desempenhar um papel fundamental na fertilidade do solo, sendo fonte de diversos nutrientes. O fluxo da matéria orgânica no solo é governado pelas suas propriedades de cargas eletrostáticas, de poder quelante e de superfície, contribuindo tanto para reter nutrientes como poluentes, como metais e moléculas xenobióticas (Fig. 3). Além disso, governa as transformações biológicas de N e P (imobilização, mineralização) no solo.

As transformações da matéria orgânica no solo vêm sendo estudadas há muito tempo através de métodos químicos convencionais, métodos isotópicos com a marcação de materiais orgânicos com ^{14}C , ^{13}C ou ^{15}N , e através de datação com radiocarbono da matéria orgânica do solo. O método do fracionamento isotópico também pode ser uma ferramenta muito útil, uma vez que usa a abundância natural de isótopos estáveis para traçar as suas variações naturais no ambiente (Balesdent & Mariotti, 1996). Sua vantagem é permitir a descrição do material orgânico, desde a sua origem, acompanhando os caminhos metabólicos das suas transfor-

mações, assim como a interpretação qualitativa e quantitativa do seu fluxo. Um outro aspecto resultante desse método é a possibilidade de estudos da fotossíntese através do fracionamento isotópico do carbono. Com essa técnica, está sendo possível determinar a grande diferenciação isotópica entre materiais de plantas C_4 e C_3 , e aplicá-la então em estudos de decomposição de C no solo. A possibilidade de se determinar o material de origem através da identificação do C da matéria orgânica pela sua composição $^{13}C/^{12}C$ gerou estudos de impacto ambiental, tais como a descrição de desmatamentos e a gradual recomposição das áreas por pastagens ou por plantas C_4 , notadamente de crescimento





CO ₂ Atmosférico (área urbana)		CO ₂ Atmosférico (área rural)	
-7,8 a -12‰		-7,8‰	
Antropogênico	Plantas C3	Plantas C4	Plantas CAM
CO ₂ -25‰	-27‰	-13‰	-10 a -28‰
			
Combustíveis derivados de fósseis	Material orgânico de solo		
	-27‰	-13‰	?
Carvão	CO ₂ do solo		
-25‰	-22‰	-8‰	?
Gás natural	Carbonato pedogênico		
-40‰	-12‰	+2‰	?
Petróleo			
-30‰			
		Lençóis subterrâneos	
		Carbono inorgânico dissolvido	
		-30 a 0‰	

FIGURA 3. Razões isotópicas do carbono estável encontradas nos principais componentes de ecossistemas terrestres (Boutton, 1991).

anual. A grande vantagem do método é que se pode determinar *in situ* as variações dentro de uma escala que vai de um a centenas ou milhares de anos.

O princípio da técnica da marcação natural do ^{13}C baseia-se na seguinte relação:

$$\delta^{13}\text{C} (\%) = \frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{amostra}}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{referência}}} - 1 \times 1000$$

Essa técnica pode ser aplicada em ecossistemas e agrossistemas que apresentaram inicialmente vegetações C_3 alteradas por vegetação C_4 ou vice-versa. O efeito dessas mudanças pode ser esquematizado conforme a Fig. 4, onde A e B representam as duas vegetações contrastantes nos processos fotossintéticos (C_3 e C_4). Pode-se acompanhar as mudanças graduais das vegetações através da determinação da composição isotópica do $\delta^{13}\text{C}$ ao longo do perfil do solo. A matéria orgânica tende a migrar para as maiores profundidades do solo à medida em que ela se decompõe, e pode ser caracterizada quantitativamente através de modelos (Jenkinson & Rayner, 1977, Parton *et al.*, 1987).

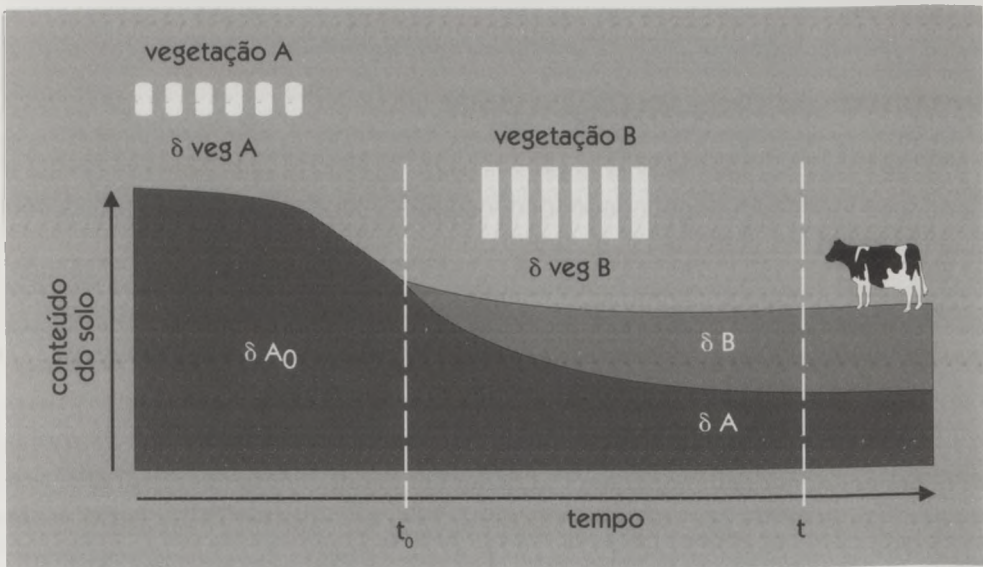


FIGURA 4. Representação esquemática do deslocamento do carbono do solo derivado de uma vegetação A, pelo carbono de uma nova vegetação B, ao longo de um determinado tempo (Balesdent & Mariotti, 1996).

Uma equação simplificada foi proposta por Balesdent & Mariotti (1996):

$$F = \frac{\delta - \delta_{refA}}{\Delta}$$

onde δ é a composição isotópica da amostra do solo em estudo e δ_{refA} é a amostra de solo tomada de uma área referênciada, sob cultivo da vegetação inicial. Como Δ é igual à diferença média entre $\delta^{13}C$ da vegetação na área em estudo e a área de referênciada, a equação pode ficar mais simples:

$$\Delta = \delta_{vegB} - \delta_{vegA}$$

Para efeito de comparação, deve-se assumir que ambos os sítios tenham histórico similar, com uma dinâmica do C bastante semelhante.

A primeira investigação da transformação biológica do C usando a técnica do $\delta^{13}C$ foi desenvolvida por Cerri e colaboradores (Cerri *et al.*, 1985), que estudaram uma cronoseqüência de 50 anos de um solo, inicialmente com floresta tropical (plantas C_3) na região de São Paulo (sudeste do Brasil) e cultivado com cana-de-açúcar (planta C_4) após seu desmatamento. Usando-se essa técnica, é possível quantificar a incorporação progressiva e a taxa de decomposição de uma nova fonte de C em frações orgânicas do solo, determinando com mais precisão a dinâmica da matéria orgânica em um solo (Balesdent *et al.*, 1987, 1988).

Processos do Ciclo Biológico do N

O nitrogênio tem seis isótopos, variando em massa atômica de 12 a 17. Desses, ^{14}N e ^{15}N são isótopos estáveis, enquanto os restantes são radioativos (Hardarson *et al.*, 1987).

Na natureza, não existe radioisótopo do nitrogênio com meia-vida mais longa que 10,05 min. Apesar da utilização do radioisótopo ^{13}N ser possível em experimentos de curta duração para investigações da transformação do N no sistema solo-planta, esses estudos requerem equipamentos e facilidades extraordinários para contornar a limitação da meia-vida curta desse radioisótopo. Experimentos com ^{13}N para estudos biológicos não podem portanto ultrapassar 2 horas. Ao mesmo tempo, com a produção em maior escala de materiais enriquecidos com o isótopo estável ^{15}N (e também a forma empobrecida do isótopo, com concentração abaixo do ambiente — ao redor de 0,3663%), o custo de fertilizantes marcados com o isótopo estável declinou bastante, estando dispo-

nível para as pesquisas do N. A restrição maior permaneceria somente na análise do elemento pela espectrometria de massa e sua operação. Mas existem atualmente diversos laboratórios (inclusive brasileiros) processando as análises de forma rotineira.

Historicamente, as pesquisas aplicadas com nitrogênio enriquecido ou empobrecido com ^{15}N se desenvolveram a partir de 1955. Anteriormente, os estudos eram conduzidos sob condições controladas de laboratório e casa-de-vegetação, concentrando-se na avaliação dos processos de desnitrificação, fixação simbiótica e associativa de N_2 , mineralização e imobilização. Em todos os processos biológicos do N, o uso do traçador ^{15}N tem sido bastante informativo, pois através do uso de fertilizantes marcados ou da sua incorporação à matéria orgânica, pode-se seguir esse elemento na planta, no solo ou na água.

Muitos dos resultados promissores na FBN, detectados com auxílio da ferramenta isotópica, estimularam posteriormente o desenvolvimento de pesquisas básicas — bioquímicas e genéticas — sobre os microrganismos responsáveis e a seleção dos seus melhores hospedeiros. Mais recentemente, as pesquisas têm demonstrado que a sustentabilidade de um sistema produtivo deve integrar o cultivo de leguminosas fixadoras de nitrogênio em sistemas produtivos de gramíneas, tanto para obtenção de N adicional através da FBN, quanto para reduzir a intensidade das doenças, que ocorrem com maior frequência em monocultivos. A contribuição das técnicas isotópicas foi demonstrar que o uso de fertilizante nitrogenado pode promover a lixiviação de nitrato e as perdas por volatilização, processos que podem acarretar danos ao ambiente. O nitrato (NO_3^-) pode ser levado para as águas subterrâneas usadas para consumo humano, e o óxido nitroso (N_2O), volatilizado para a atmosfera, pode promover o “efeito estufa” e afetar a camada de ozônio. Desse modo, a FBN seria um processo mais atraente por promover a economia de N-fertilizante e manter a estabilidade ecológica do sistema produtivo, através da manutenção ou melhoria da estrutura do solo, redução da erosão e do uso de defensivos agrícolas (Ledgard & Giller, 1995).

A Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN)

Dentre os processos mais estudados com ^{15}N , destaca-se a fixação biológica de N_2 (FBN). Diversos métodos foram desenvolvidos para estimar o processo biológico em leguminosas e gramíneas.

Uso de $^{15}\text{N}_2$

Burris & Miller (1941) foram os primeiros a usarem $^{15}\text{N}_2$ em estudos da fixação de N_2 . Por ser um método de medida direta, a FBN pode ser determinada em plantas expostas em atmosferas contendo $^{15}\text{N}_2$ enriquecido, acima da abundância natural de 0,3663 át.% ^{15}N , após análise (Hardarson *et al.*, 1987). Dessa forma, pode-se estimar a proporção de N na planta derivada do N_2 fixado pelo microrganismo, sendo esse o método direto para medir a FBN na planta. Porém, a necessidade de uso de câmaras fechadas, com ambiente controlado para o suprimento constante de gás $^{15}\text{N}_2$, além de O_2 e CO_2 , sob luz e temperatura adequadas, restringem o uso desse método por longos períodos. Mesmo em estudos de curta duração, as estimativas devem considerar as variações diurnas, diárias e sazonais, para não incorrerem em erros de extrapolação de dados. Deve-se considerar que as condições obtidas nessas câmaras são diferentes daquelas de casa-de-vegetação e campo.

Uso de fertilizantes ou substratos enriquecidos com ^{15}N

Esse método adota o princípio de que a planta, ao absorver nutrientes de um volume de solo, se confrontada com duas ou mais fontes de N, deverá absorver de cada uma dessas fontes em proporção direta às quantidades disponíveis (Fried & Middelhoe, 1977). Hardarson *et al.* (1987) acrescentaram condições para que esse método seja preciso:

1. Deve-se usar uma planta referência que não fixe nitrogênio. Pode-se verificar se não há fixação na planta controle com a técnica da redução de acetileno.
2. O desenvolvimento radicular e sua extensão de exploração devem ser semelhantes tanto na planta fixadora quanto na referência. Ou que ambas as plantas retirem todo seu N de uma mesma zona no solo.
3. Ambas as plantas devem apresentar crescimentos, estádios fisiológicos e períodos de maturação semelhantes.
4. Ambas as plantas devem sofrer as mesmas mudanças de condições ambientais, tais como regimes de temperatura e água durante o período experimental.

Para estimar o N_2 fixado em leguminosas, as seguintes plantas controle devem ser consideradas:

- a) Uma não-leguminosa, planta não-fixadora.
- b) Uma planta leguminosa não-nodulante.
- c) Uma planta leguminosa não-inoculada em solos, que não contém as estirpes apropriadas de *Rhizobium*.

Condição 1: Quando ambas as plantas (referência e fixadora) exploram uma mesma fonte de $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$.

Se as plantas exploram solo onde uma mesma quantidade e substratos enriquecidos com ^{15}N foram aplicados, a planta fixadora e a planta referência conterão a mesma razão $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, uma vez que estão absorvendo N com composição $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ semelhante. A fonte não-marcada (no caso, solo) irá diluir o teor de ^{15}N no interior de ambas as plantas. No caso da planta fixadora, a incorporação de N_2 não-marcado irá diminuir ainda mais esse teor de ^{15}N na planta. Na planta não-fixadora, o teor de ^{15}N será mais elevado. Essa diferença entre as plantas fixadora e referência é usada como indicativo da capacidade fixadora, e pode ser usada para estimar o N fixado no campo.

Como ilustração, a Fig. 5 pode exemplificar melhor as duas plantas — referência e fixadora, contendo respectivamente as duas fontes de N — solo e fertilizante, e três fontes de N — solo, fertilizante e FBN.

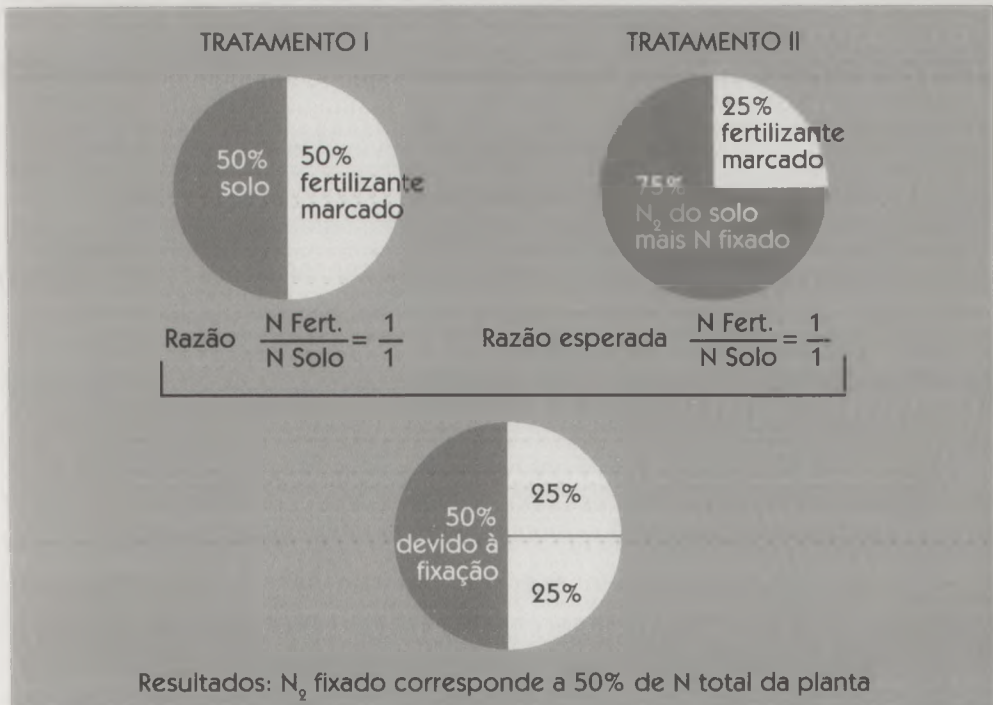


FIGURA 5. Um exemplo hipotético mostrando como a porcentagem do N derivado da fixação (FBN) pode ser determinada através da determinação da porcentagem do N derivado do fertilizante em plantas não fixadoras (I) e fixadoras (II), baseado no princípio de que ambas as plantas absorvem N de cada fonte em proporção direta às quantidades disponíveis (Hardarson *et al.*, 1987).

Fried & Middelboe (1977) derivaram a seguinte equação para estimar a FBN:

$$\% \text{ Ndfix} = 1 - \frac{\% \text{ Ndfert (planta fixadora)}}{\% \text{ Ndfert (planta não-fixadora)}} \times 100$$

Sendo que:

$$\% \text{ Ndfert} = \frac{\% \text{ átomo } ^{15}\text{N excesso amostra}}{\% \text{ átomo } ^{15}\text{N excesso fertilizante}} \times 100$$

O cálculo para a quantidade de N fixado fica assim:

$$\text{N}_2 \text{ fixado} = \frac{\% \text{ Ndfix} \times \text{N total da planta fixadora}}{100}$$

Condição 2: Quando ambas as plantas (referência e fixadora) exploram diferentes fontes de $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$.

Muitas vezes, é necessária a adição de uma quantidade maior de N à planta referência para que haja uma produção adequada em solo, por exemplo, de baixa fertilidade. Muitas vezes, as doses usadas afetam a FBN da planta fixadora. Por isso, recomenda-se o uso do valor A, determinado por Fried & Broeshart (1975, 1981), propondo as seguintes relações:

$$\frac{\% \text{ Ndfert}}{A_{\text{fert}}} = \frac{\% \text{ N dsolo}}{A_{\text{solo}}} = \frac{\% \text{ Ndsolo} + \% \text{ Ndfix}}{A_{\text{solo} + \text{fix}}} = \frac{\% \text{ Ndfix}}{A_{\text{fix}}}$$

Sendo:

$\% \text{ Ndfert}$ = %N derivado do fertilizante

$\% \text{ Ndsolo}$ = %N derivado do solo

$\% \text{ Ndfix}$ = %N derivado da FBN

A_{fert} = a quantidade de N-fertilizante aplicada

A_{solo} e A_{fix} = respectivamente, as quantidades de N (em unidades de fertilizante) do N derivado do solo e da fixação biológica de N_2 .

Dessa forma, pode-se derivar as seguintes equações:

a) Para a planta não-fixadora:

$$A_{\text{solo}} = \frac{100 - \% \text{ Ndfert}}{\% \text{ Ndfert}} \times A_{\text{fert}}$$

b) Para a planta fixadora:

$$A_{\text{solo} + \text{fix}} = \frac{100 - \% \text{ Ndfert}}{\% \text{ Ndfert}} \times A_{\text{fert}}$$

$$A_{\text{fix}} = (A_{\text{solo} + \text{fix}}) - A_{\text{solo}}$$

$$\% \text{ Ndfix} = A_{\text{fix}} \times \frac{\% \text{ Ndfert}}{A_{\text{fert}}}$$

$$\text{N fixado (kg/ha)} = \frac{\% \text{ Ndfix} \times \text{N total na planta fixadora}}{100}$$

Variação natural de $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ e enriquecimento isotópico

Mais recentemente, o uso de $\Delta^{15}\text{N}$ tem sido reconhecido como método sensível para detectar o efeito discriminante de ^{15}N em processos biológicos, tais como a fixação simbiótica de N_2 em leguminosas. O princípio do método é detectar pequenas variações na abundância isotópica em materiais contendo N. Mais especificamente, um pequeno aumento na abundância de ^{15}N é comumente encontrado em compostos nitrogenados de origem biológica, devido à discriminação em relação aos processos metabólicos contendo ^{15}N , mais pesado que ^{14}N . As variações $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ não são grandes, à base de partes por milhão, e variam de acordo com o material estudado. O papel biológico de materiais contendo $\Delta^{15}\text{N}$ natural pode ser confirmado pelo fracionamento isotópico que ocorre, por exemplo, na nitrificação da amônia e desnitrificação do nitrato.

No processo da nitrificação, tanto NO_2^- e NO_3^- são empobrecidos em ^{15}N , e o substrato NH_4^+ é enriquecido, enquanto que na desnitrificação o N_2 liberado é empobrecido em ^{15}N . Isso é explicado pela discriminação isotópica que ocorre em compostos orgânicos nitrogenados, que promove uma variação nos seus teores de ^{15}N que tendem para valores maiores, acima da concentração do N_2 atmosférico. A variação natural na razão isotópica do N combinado tem sido designada como $\Delta^{15}\text{N}$ e é expressa como partes por mil da atmosfera com um valor $\Delta^{15}\text{N}$ igual a 0,00037 át % ^{15}N . Valores negativos expressam um valor ^{15}N menor que o padrão (atmosfera), e valores positivos, maiores. Fiedler & Proksch (1975) revisaram amplamente a metodologia do uso da razão $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$,

tendo o grupo de Shearer & Kohl (Shearer *et al.*, 1975; Kohl & Shearer, 1980; Shearer & Kohl, 1986) se destacado nessa área de variação natural $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$.

A derivação da fórmula fica assim:

$$\Delta^{15}\text{N} = \frac{(\text{át. \% } ^{15}\text{N}/^{14}\text{N amostra}) - (\text{át. \% } ^{15}\text{N atm.})}{(\text{át. \% } ^{15}\text{N atm.})} \times 1000$$

A amplitude na variação natural devido ao efeito isotópico é em geral ao redor de $\pm 15 \Delta^{15}\text{N}$ unidades.

Em plantas perenes, a estimativa da FBN se torna mais complexa pela dificuldade de seguir o processo por um longo período de tempo, de forma a integrar a quantidade de N_2 fixado (Baker *et al.*, 1994). As espécies fixadoras e não-fixadoras devem ser plantadas alternadamente, de modo que cada uma delas seja exposta às mesmas mudanças no ambiente do solo ao longo do experimento. O fertilizante marcado com ^{15}N deve ser aplicado ao solo, dentro de mini-parcelas que devem ser cobertas lateralmente com filmes plásticos para vedar a passagem de raízes para zonas não marcadas com ^{15}N . Ao longo do experimento, deve-se tomar medidas de acúmulo de biomassa e teor de N em ambas as plantas (controle não-fixadora e fixadora) para assegurar que sejam fisiologicamente semelhantes, assim como a reciclagem de N não esteja influenciando a precisão das estimativas de FBN (Fig. 6).

Para experimentos onde se estuda a FBN com uso de fertilizantes nitrogenados marcados, a técnica da diluição isotópica se aplica muito bem para casos onde se acompanha plantas jovens. Neste caso, a planta se assemelha a uma cultura de ciclo anual, para a qual o método foi elaborado originalmente.

Para acompanhamento da FBN por um período mais longo, pode-se utilizar a técnica do enriquecimento do N do solo através da incorporação de palha marcada e incubação prévia por um período até a sua estabilização no substrato. Neste caso, a medida da FBN seria direta, relacionando-se diretamente à concentração de ^{15}N presente na fração do N total do solo, com a concentração de ^{15}N na planta fixadora. Lisímetros contendo volumes de solo com ^{15}N -solo estabilizado podem servir para esses estudos. Porém, a duração do experimento deverá ser condicionada à capacidade de exploração da planta, seus requerimentos nutricionais e o volume de solo disponível para o desenvolvimento adequado ao longo do período experimental.

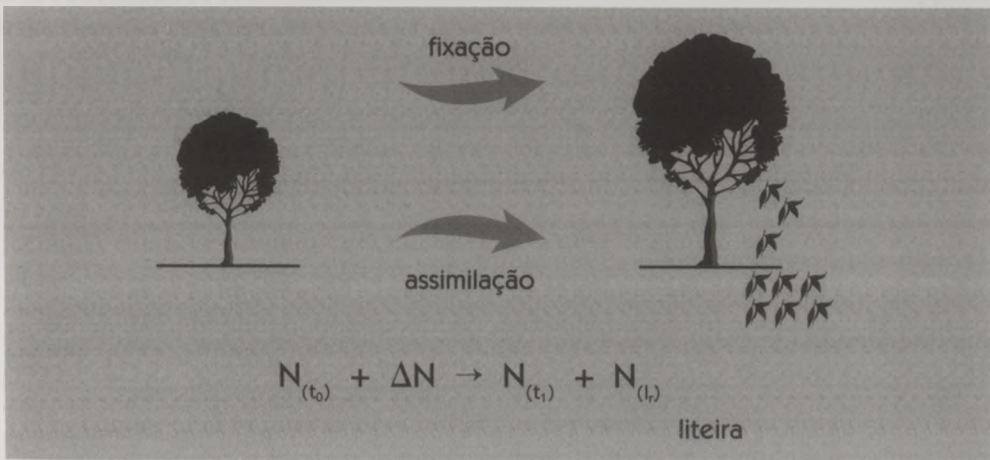


FIGURA 6. Representação esquemática do processo associado com crescimento, acúmulo e perda de N em árvores, em um período de tempo (t_0 = tempo inicial para t_1 = tempo de amostragem). $N_{(tr)}$ = N da littera; ΔN = N assimilado + N fixação biológica de nitrogênio. A técnica de ^{15}N (variação natural, ^{15}N -solo) pode diferenciar as duas fontes que contribuem para as variações do DN (Baker *et al.*, 1995).

Outra técnica bastante recomendada para medir a FBN em plantas perenes recorre à determinação da discriminação isotópica do $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ do N acumulado ($\Delta^{15}\text{N}$, ou enriquecimento isotópico) durante o intervalo do estudo. Usa-se uma planta não-fixadora como referência, aplicando-se a seguinte equação (Hardarson *et al.*, 1987):

$$\% \text{ Ndfix} = 1 - \frac{\% \text{ átomos exc. } \Delta N_{\text{fix}}}{\% \text{ átomos exc. } \Delta N_{\text{ref}}} \times 100$$

No Brasil, as pesquisas com ^{15}N realizadas no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (USP-Piracicaba, SP) e no Centro Nacional de Pesquisas em Agrobiologia (EMBRAPA, RJ) foram determinantes para avanços significativos tanto na quantificação da FBN em leguminosas, principalmente feijão e soja (Ruschel *et al.*, 1979; Boddey *et al.*, 1984; Duque *et al.*, 1985; Ruschel *et al.*, 1982; Vose *et al.*, 1982; Silva *et al.*, 1993; Tsai *et al.*, 1993a,b; Colleta Filho, 1993), quanto em gramíneas tropicais, dentre elas grama batatais, braquiária e cana-de-açúcar (DePolli, 1977; Boddey *et al.*, 1983, 1991; Boddey & Victoria, 1986). A FBN tem papel fundamental na agricultura sustentável nos trópicos, e a integração de leguminosas com gramíneas tem sido recomendada para a manutenção do sistema produtivo.

Muitos trabalhos em FBN e em ecologia microbiana têm fomentado a integração das medidas com isótopos de N (^{14}N , ^{15}N), C (^{13}C , ^{14}C) e ^{32}P , promovendo uma nova dimensão nas pesquisas, de forma a encontrar os caminhos para a melhoria e sustentabilidade dos sistemas produtivos, e ao mesmo tempo garantir a conservação do ambiente.

O Uso de Fósforo (^{32}P)

O fósforo não apresenta relações de fluxo gasoso com a atmosfera, tais como o carbono e o nitrogênio. No entanto, os organismos do solo estão intimamente envolvidos com os processos de transformação do fósforo no solo, participando na solubilização de fósforo inorgânico e na mineralização do fósforo orgânico, assim como na imobilização de fósforo disponível. A dinâmica do fósforo na biomassa microbiana é bastante intensa, mas em geral, os processos são de curta duração (Paul & Clark, 1989). A contribuição dos microrganismos no ciclo do P no solo pode ser medida com uso de ^{32}P e ^{33}P (este com mais restrições, devido à sua curta meia-vida).

Além da possibilidade do uso dessas formas marcadas de P nas transformações do P no solo, os isótopos e em especial ^{32}P têm sido muito usados na determinação da eficiência de sistemas simbióticos entre plantas-fungos micorrízicos, que absorvem e acumulam nutrientes do solo.

Desde o final da década de 60, já se fazia idéia de que as hifas dos fungos micorrízicos tinham a capacidade de absorver e translocar ^{32}P , ^{45}Ca e ^{15}N , liberando-os posteriormente para o hospedeiro, contribuindo com resultados espetaculares para o seu desenvolvimento vegetativo (Gray & Gerdermann, 1969).

O fósforo é altamente requerido para o pleno funcionamento de nódulos em leguminosas. A Fig. 7 mostra o efeito da deficiência hídrica na nodulação de feijoeiro, em fase inicial de florescimento, quando a nodulação atinge seu pico de atividade. A Fig. 7A mostra que as raízes de feijoeiro, sob 15 atm de tensão de água (deficiência hídrica drástica), não apresentam nódulos, enquanto que sob 1 atm de tensão de água (condição adequada de umidade, Fig. 7B), os nódulos são numerosos e muito ativos, acumulando também o P-fertilizante, marcado com ^{32}P (Tsai, dados não publicados). A técnica de detecção de ^{32}P (assim como de ^{35}S) através da radioautografia também pode servir para localização temporal e espacial dos sítios onde se processam as atividades microbiológicas, tanto em solo como em planta.

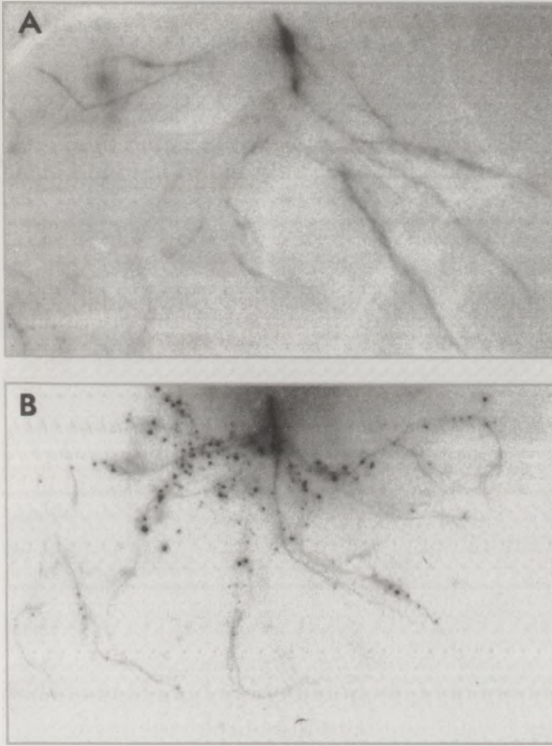


FIGURA 7. Raízes de feijoeiro, sob 15 atm de tensão de água (deficiência hídrica drástica), não apresentam nódulos (Fig. 7A). Raízes noduladas, sob adequada tensão de água (1 atm) mostram numerosos nódulos (Fig. 7B), com elevado acúmulo de fósforo, adicionado como fertilizante e marcado com ^{32}P (Tsai, dados não publicados).

Uso de Traçadores em Biologia Molecular

A associação de técnicas nucleares em estudos de biologia molecular possibilitou os avanços mais significativos nessa área. E especialmente, a comprovação da estrutura do DNA, da sua replicação semi-conservativa e da marcação de oligonucleotídeos para reconstruir DNA marcado ou para determinar a sua seqüência, foram alguns marcos que possibilitaram o sucesso da tecnologia do DNA em estudos de bioquímica, genética e ecologia microbiana.

Como exemplo, a obtenção de sondas radioativas marcadas com ^{32}P e usadas como marcadores RFLP-Restriction Fragment Length Polymorphism, permitiu a análise genética em todas as linhas avançadas de pesquisa genética em microrganismos (Fig. 8). As sondas radioativas também permitiram o acompanhamento da expressão de genes com funções conhecidas, especialmente aquelas associadas com resistência a doenças e a nodulinas, proteínas que se expressam em sistemas simbióticos (Fig. 9).

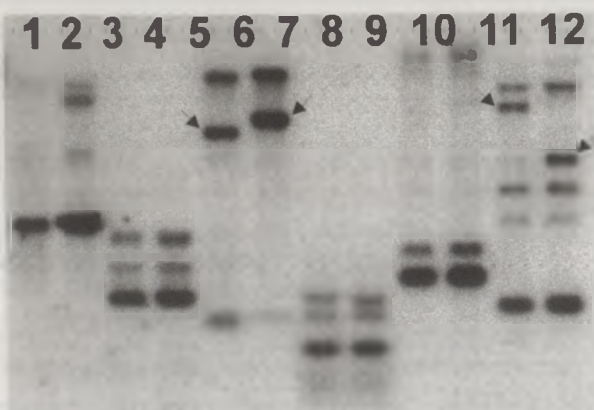


FIGURA 8. Uso de marcador molecular denominado RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), que codifica a nodulina aldolase, para determinação de polimorfismo entre dois parentais de feijoeiro. Através da restrição de DNA com seis enzimas das variedades BAT-93 (cana-letas 1, 3, 5, 7, 9 e 11) e Jalo EEP558 (cana-letas 2, 4, 6, 8, 10 e 12), o DNA é transferido à membrana de nylon e fixado. Após hibridização da membrana com a sonda radioativa ^{32}P e revelação do filme rai X, foi possível detectar polimorfismo com as enzimas C e F (Tsai, dados não publicados).

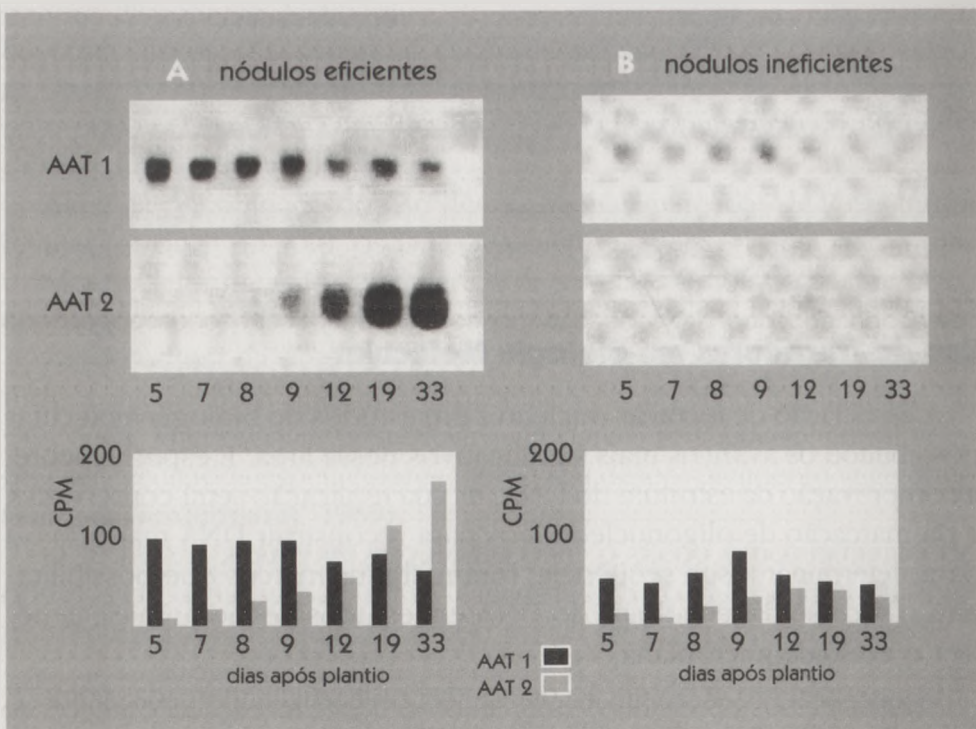


FIGURA 9. Análise de RNA em blot de gel da expressão de AAT1 e AAT2 (aspartato aminotransferase), em nódulos eficientes (A) e ineficientes (B). Dez mg de RNA total de raízes (dia 5) ou nódulos (dias 7, 8, 9, 12, 19 e 33) foram aplicados em cada canaleta, e submetidos à eletroforese em gel de agarose, transferidos em membrana de nylon, e hibridizados com sondas de genes *aat 1* (esquemas superiores na figura acima) ou *aat 2* (esquemas intermediários). Os esquemas inferiores indicam a contagem em dpm (^{32}P) em cada uma das bandas hibridizadas e determinadas por contagem direta. A – RNA extraídos de raízes e nódulos em plantas eficientes em fixação de N_2 . B – RNA extraídos de raízes e nódulos em plantas ineficientes em fixação de N_2 . (Gregerson *et al.*, 1994)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAKER, D.D.; FRIED, M.; PARROTTA, J.A. Theoretical implications for the estimation of dinitrogen fixation by large perennial plant species using isotope dilution. In: **Nuclear techniques in soil-plant studies for sustainable agriculture and environment preservation**. Vienna: IAEA/FAO, 1994. p.225-236. (IAEA/FAO-SM-334/9).
- BALESDENT, J.; MARIOTTI, A. Measurement of soil organic matter turnover using ^{13}C natural abundance. In: BOUTTON, T.W.; YAMASAKI, S. (Ed.). **Mass spectrometry of soils**, New York: Marcel Dekker, 1996. p.83-111.
- BALESDENT, J.; MARIOTTI, A.; GUILLET, B. Natural ^{13}C abundance as a tracer for soil organic matter dynamics studies. **Soil Biology and Biochemistry**, v.19, p.25-30, 1987.
- BALESDENT, J.; WAGNER, G.H.; MARIOTTI, A. Soil organic matter turnover in long-term field experiments as revealed by the carbon-13 natural abundance. **Soil Science Society of America Journal**, v.52, p.118-123, 1988.
- BASTOS, A.E.R.; FURLAN, G.R.; TORNISIELO, V.L.; TSAI, S.M.; MOON, D.H. A comparison of two radiometric methods to investigate the biodegradation of phenol by *Candida nitritovorans*. **Journal of Microbiological Methods**, v.29, p.177-183, 1997.
- BODDEY, R.M.; CHALK, P.M.; VICTORIA, R.L.; MATSUI, E. The ^{15}N -isotope dilution technique applied to the estimation of biological nitrogen fixation associated with *Paspalum notatum* cv. Batatais in the field. **Soil Biology and Biochemistry**, v.15, p.25-32, 1983.
- BODDEY, R.M.; CHALK, P.M.; VICTORIA, R.L.; MATSUI, E. Nitrogen fixation by nodulated soybean under tropical field conditions estimated by ^{15}N isotope dilution technique. **Soil Biology and Biochemistry**, v.16, p.585-555, 1984.
- BODDEY, R.M.; URQUIAGUA, S.; REIS, V.; DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. **Plant and Soil**, v.137, p.111-117, 1991.
- BODDEY, R.M.; VICTORIA, R.L. Estimation of biological nitrogen fixation associated with *Brachiaria* and *Paspalum* grasses using ^{15}N labelled organic matter and fertilizer. **Plant and Soil**, v.90, p.265-292, 1986.
- BOUTTON, T.W. Stable carbon isotope ratios of natural materials: II. Atmospheric, terrestrial, marine, and freshwater environments. In: COLEMAN, D.C.; FRY, B., ed.. **Carbon isotope techniques**. New York: Academic Press, 1991. p.173-185.
- BURRIS, R.H.; MILLER, C.E. Application of ^{15}N to the study of biological nitrogen fixation. **Science**, v.93, p.114-115, 1941.
- CERRI, C.C.; FELLER, J.; BALESDENT, J.; VICTORIA, R.L.; PLENECASSAGNE, A. Application du traçage isotopique naturel en ^{13}C à l'étude de la dynamique de la matière organique dans les sols. **Compte Rendu à l'Académie des Sciences de Paris**, T.300 (série II, v. 9), p.423-426, 1985.
- CHANDRASENA, N.R.; SAGAR, G.R. Uptake and translocation of ^{14}C -[^{14}C] phenol in secondary sewage and landfill leachate measured by double-vial radiorespirometry. **Applied and Environmental Microbiology**, v.49, p.867-869, 1986.
- COLLETA FILHO, H. Avaliação da fixação biológica de N_2 em genótipos de feijoeiro. Piracicaba: CENA-USP, 1993. 72p. Dissertação Mestrado.
- DePOLL, H.; MATSUI, E.; DÖBEREINER, J.; SALATI, E. Confirmation of nitrogen fixation in two tropical grasses by $^{15}\text{N}_2$ incorporation. **Soil Biology and Biochemistry**, v.9, p.119-123, 1977.
- DUQUE, F.F.; NEVES, M.C.P.; FRANCO, A.A.; VICTORIA, R.L.; BODDEY, R.M. The response of field grown *Phaseolus vulgaris* to *Rhizobium* inoculation and the quantification of N_2 fixation using ^{15}N . **Plant and Soil**, v.88, p.333-343, 1985.
- FIEDLER, R.; PROKSCH, G. The determination of nitrogen-15 by emission and mass spectrometry in biochemical analysis: a review. **Analytica Chimica Acta**, v.78, p.1-62, 1975.
- FRIED, M.; BROESHART, H. An independent measurement of the amount of nitrogen fixed by a legume crop. **Plant and Soil**, v.43, p.707-711, 1975.
- FRIED, M.; BROESHART, H. A further extension of the method for independently measuring the amount of nitrogen fixed by a legume crop. **Plant and Soil**, v.62, p.331-336, 1981.
- FRIED, M.; MIDDELBOE, V. Measurement of amount of nitrogen fixed by a legume crop. **Plant and Soil**, v.47, p.713-715, 1977.

- GRAY, L.E.; GERDEMANN, J.W. Uptake of phosphorus-32 by vesicular-arbuscular mycorrhizae. **Plant and Soil**. v.30, p.415-422, 1969.
- GREGORSON, R.G.; MILLER, S.S.; PETROWSKI, M.; GANNT, J.S.; VANCE, C.P. Genomic structure, expression and evolution of the alfalfa aspartate aminotransferase genes. **Plant Molecular Biology**. v.25, p.387-399, 1994.
- HARDARSON, G.; DANSO, S.K.A.; ZAPATA, F. Biological nitrogen fixation in field crops. In: CHRISTE, B.R.M., ed. **Handbook of plant science in agriculture** Boca Raton: CRC Press, 1987. p.165-192.
- HSU, T.; DANIEL, S.L.; LUX, M.F.; DRAKE, H.L. Biotransformations of carboxylated aromatic compounds by the acetogen *Clostridium thermoaceticum*. Generation of growth-supportive CO₂ equivalents under CO₂ limited conditions. **Journal of Bacteriology**. v.172, p.212-217, 1990.
- JENKINSON, D.S. Studies on the decomposition of plant material in soil. II. Partial sterilization of soil and the soil biomass. **Journal of Soil Science**. v.17, p.280-302, 1966.
- JENKINSON, D.S.; RAYNER, J.H. The turnover of soil organic matter in some of the Rothamsted classical experiments. **Soil Science**. v.123, p.298-305, 1977.
- KHAN, S.V. Bound (non extractable) pesticide degradation products in soils. Bioavailability to plants. In: SOMASUNDARAM, L.; COATS, J.R., ed. **Pesticide transformation products: fate and significance in the environment**. Washington: American Chemical Society, 1991. (ACS. Symposium Series, 459).
- KNAEBEL, D.B.; VESTAL, J.R. A comparison of double vial to serum bottle radiorespirometry to measure microbial mineralization in soils. **Journal of Microbiological Methods**. v.7, p.309-317, 1988.
- KOHL, D.H.; SHEARER, G.S. Isotopic fractionation associated with symbiotic N₂ fixation and uptake of NO₃ by plants. **Plant Physiology**. v.66, p.51-56, 1980.
- LEDGARD, S.F.; GILLER, K.E. Atmospheric N₂ fixation as an alternative N source. In: BACON, P.E., ed. **Nitrogen fertilization in the environment** New York: Marcel Dekker, 1995. p.443-486.
- PARTON, W.J.; SCHIMEL, D.S.; COLE, C.V.; OJIMA, D.S. Analysis of factors controlling soil organic matter levels in Great Plains Grasslands. **Soil Science Society of America Journal**. v.51, p.1173-1179, 1987.
- PAUL, E.A.; CLARK, F.E. Phosphorus transformation in soil. In: **Soil microbiology and biochemistry**. New York: Academic Press, 1989. p.222-232.
- RUSCHEL, A.P.; VOSE, P.B.; VICTORIA, R.L.; SALATI, E. Comparison of isotope techniques on nodulating and non-nodulating isolines to study the effect of ammonium fertilization on dinitrogen fixation in soybean. *Glycine max* (L.) Merrill. **Plant and Soil**. v.53, p.513-515, 1979.
- RUSCHEL, A.P.; VOSE, P.B.; MATSUI, E.; VICTORIA, R.L.; SAITO, S.M.T. Field evaluation of N utilization by *Phaseolus* bean varieties determined by ¹⁵N isotope dilution. **Plant and Soil**. v.65, p.397-407, 1982.
- SHEARER, G.; KOHL, D.H.; CHIEN, S.H. The nitrogen-15 abundance in a wide variety of soils. **Soil Science Society of America Journal**. v.42, p.899-902, 1978.
- SHEARER, G.; KOHL, D.H. N₂-fixation in field setting: Estimation based on natural ¹⁵N abundance. **Australian Journal of Plant Physiology**. v.13, p.699-756, 1986.
- SILVA, P.M. DA; TSAI, S.M.; BONETTI, R. Response to inoculation and N fertilization for increased yield and biological nitrogen fixation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant and Soil**. v.152, p.123-130, 1993.
- SOULAS, G.; FOURNIER, J.C. Radiorespirometry measurements of microbial response. In: SOMERVILLE, L.; GREAVES, M.P., ed. **Pesticide effects on soil microflora**. London: Taylor & Francis, 1987. p.171-181.
- STEBER, J.; WIERICH, P. The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with ¹⁴C-labeled model surfactants. **Water Resources Research**. v.21, p.661-667, 1978.
- TSAI, S.M.; BONETTI, R.; AGBALA, S.M.; ROSSETO, R. Minimizing the effect of mineral nitrogen on biological nitrogen fixation in common bean by increasing nutrient levels. **Plant and Soil**. v.152, p.131-138, 1993a.
- TSAI, S.M.M.; SILVA, P.M. DA; CABEZAS, W.L.; BONETTI, R. Variability in nitrogen fixation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) intercropped with maize. **Plant and Soil**. v.152, p.93-101, 1993b.
- VORONEY, R.P.; WINTER, J.P.; GREGORICH, E.G. Microbe/Plant/Soil Interactions. In: COLEMAN, D.C.; FRY, B., ed. **Carbon isotope techniques**. New York: Academic Press, 1991. p.77-99.
- VOSE, P.B.; RUSCHEL, A.P.; VICTORIA, R.L.; SAITO, S.M.; MATSUI, E. ¹⁵N as a tool in biological nitrogen fixation in soil. In: GRAHAM, P.H.; HARRIS, S.C., ed. **Biological nitrogen fixation technology for tropical agriculture**. Cali-Colombia: CIAT, 1982. p.575-592.

MICROSCOPIA ELETRÔNICA APLICADA AOS ESTUDOS DE ECOLOGIA MICROBIANA

Neusa de Lima Nogueira

Paulo Augusto Vianna Barroso

Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo
Caixa Postal 96, CEP 13400-970, Piracicaba, SP

INTRODUÇÃO

Os trabalhos relacionados ao estudo da ecologia microbiana mediante a utilização do microscópio eletrônico buscam, basicamente, aumentar ou consolidar conhecimentos a respeito de um processo interativo, no qual pelo menos um dos participantes é um microrganismo. Os estudos geralmente são realizados para localizar e identificar indivíduos e populações envolvidos, e caracterizar a interação e suas etapas quanto aos aspectos citológicos, histológicos, morfológicos, bioquímicos e fisiológicos.

Este capítulo descreve os princípios do microscópio eletrônico, das técnicas utilizadas e suas aplicações na ecologia microbiana.

O MICROSCÓPIO ELETRÔNICO

Quando comparado ao microscópio óptico, o microscópio eletrônico é um equipamento mais caro, de manutenção mais difícil e dispendiosa, de uso mais complicado e exige preparo mais demorado do material a ser observado (espécime). Meek (1976) aponta apenas uma

vantagem do microscópio eletrônico: o maior poder de resolução, isto é, a menor distância entre dois pontos capaz de ser distinguida.

O poder de resolução é variável, de acordo com o tipo de microscópio, porque quanto menor o comprimento de onda da radiação usada para "iluminar" o espécime, maior será a resolução. Assim, como o microscópio eletrônico utiliza um feixe de elétrons com comprimento de onda muito menor que o da luz visível, fornece imagens nítidas de objetos centenas de vezes menores do que as conseguidas com o microscópio óptico.

O feixe de elétrons é formado pela aceleração dos elétrons emitidos termo-ionicamente por um filamento de tungstênio aquecido até a incandescência por uma corrente elétrica. O feixe penetra na coluna do microscópio, atravessa as lentes eletromagnéticas e interage com o espécime, situado entre as lentes condensadora e objetiva, no microscópio eletrônico de transmissão, ou após a última lente, no microscópio eletrônico de varredura (Fig. 1). Para minimizar a dispersão do feixe pelas moléculas gasosas, o microscópio eletrônico trabalha em condições internas de alto vácuo (10^{-3} a 10^{-6} Torr).

A Fig. 1 mostra, esquematicamente, o microscópio eletrônico de transmissão, o microscópio eletrônico de varredura e o microscópio óptico. Os três tipos possuem princípios de funcionamento semelhantes, diferindo basicamente na fonte de iluminação utilizada. As demais diferenças, como a utilização de lentes eletromagnéticas pelos microscópios eletrônicos, são conseqüência das necessidades geradas pelo tipo de radiação usada.

Embora haja outros tipos de microscópios eletrônicos, serão considerados neste capítulo os dois mais utilizados em estudos biológicos: o de transmissão e o de varredura.

O microscópio eletrônico de transmissão permite a observação da ultraestrutura de materiais biológicos, inclusive de algumas macromoléculas. O suporte que leva o espécime ao microscópio eletrônico é uma tela metálica circular de 3 mm de diâmetro, com 50 a 400 mesh (malhas por polegada quadrada), coberta ou não por fina camada plástica, que pode ser reforçada pela deposição, também delgada, de carbono. A tela pode ser de ouro, prata e, mais freqüentemente, cobre ou níquel. A imagem é formada pelo desvio dos elétrons do feixe, causado principalmente pelo núcleo dos átomos do espécime. Os elétrons desviados caem fora da abertura das lentes e a imagem eletrônica é resultado da ausência dos

elétrons desviados, que aparecem na imagem como regiões escuras. Espécimes como os biológicos, compostos quase que exclusivamente por átomos "leves" (tais como carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio), produzirão imagens pouco nítidas, pois não desviam o feixe de elétrons. Para contornar esse problema, o espécime é impregnado com sais de metais pesados. A imagem do espécime é visualizada sobre uma tela fluorescente, revestida por compostos como sulfeto de cádmio e sulfeto de zinco, que absorvem o feixe de elétrons, invisível ao olho humano, e emitem luz visível. A imagem formada pelo feixe também pode ser usada para sensibilizar filmes fotográficos.

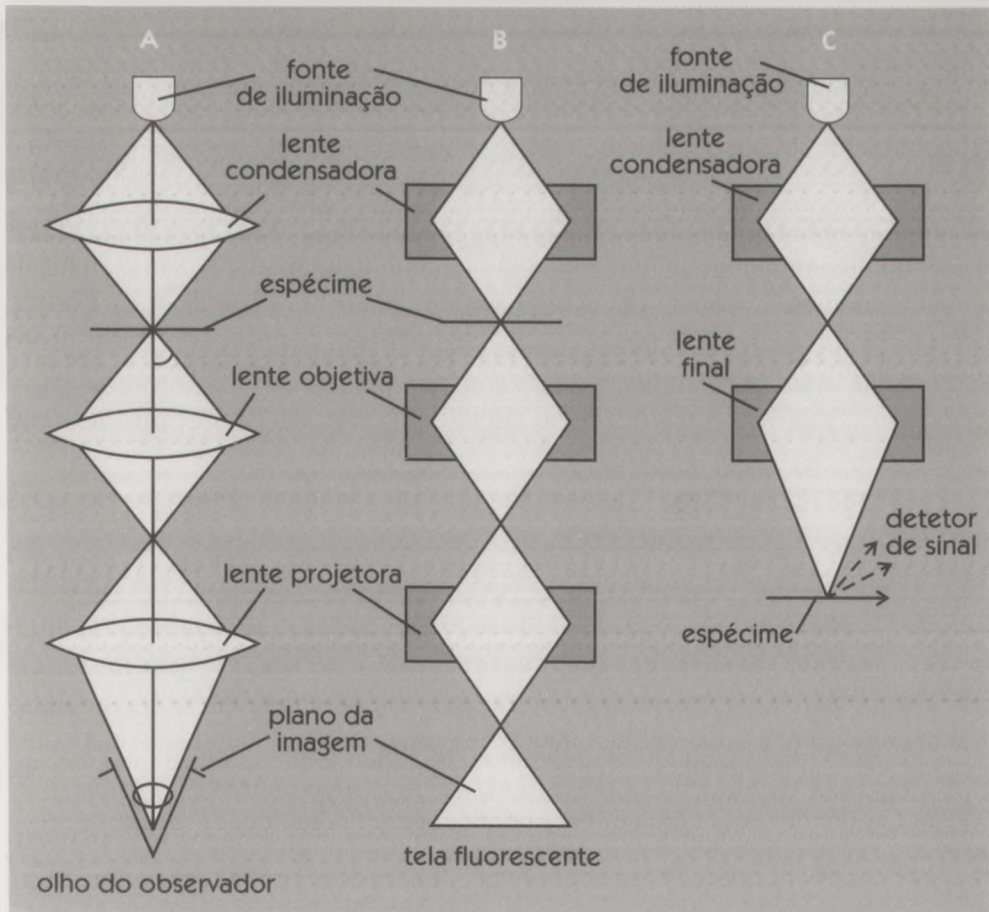


FIGURA 1. Diagrama comparativo do funcionamento de um microscópio óptico comum (A), de um microscópio eletrônico de transmissão (B) e de um microscópio eletrônico de varredura (C). Gentileza de Jaime Maia dos Santos, FCAV/UNESP.

No microscópio eletrônico de varredura, o feixe de elétrons interage com o espécime, induzindo a liberação de elétrons dos átomos de sua superfície. Os elétrons liberados, chamados elétrons secundários, são coletados por um detector e induzem a formação da imagem, com aparência tridimensional e com grande profundidade de foco, em um monitor de televisão. O poder de resolução do microscópio eletrônico de varredura é inferior ao de transmissão, respectivamente entre 3 e 5 nm e 0,1 nm.

Técnicas de Microscopia Eletrônica

Diversas técnicas de microscopia eletrônica são utilizadas no estudo dos microrganismos, cada uma produzindo um tipo de informação.

Os reagentes utilizados em microscopia eletrônica são, quase sempre, muito tóxicos, exigindo cuidado durante seu manuseio. A Tabela 1 associa os reagentes mais usados com sua ação tóxica. A obediência a algumas regras básicas reduz a possibilidade de ocorrerem danos à saúde: preparar e utilizar os reagentes em uma capela; vestir roupas que não deixem partes do corpo expostas; utilizar luvas; não comer, beber ou fumar no laboratório; não armazenar comida e bebida junto com reagentes; lavar braços e mãos antes de deixar o laboratório conhecido e ter por escrito, em local de fácil acesso, os procedimentos em caso de acidente.

Três cuidados básicos devem ser tomados para a obtenção de boas micrografias e para a interpretação correta dos resultados:

1. Preparar o espécime com métodos adequados às suas peculiaridades, utilizando reagentes de qualidade que melhor se adaptem e ajustando, quando preciso, a concentração, pH e tempo de permanência nas soluções. Caso contrário, surgirão artefatos, isto é, alterações causadas nas células e tecidos durante o preparo.

2. Realizar repetições e empregar tratamentos-controle.

3. Conhecer a estrutura das células e tecidos. É preciso que o usuário do microscópio eletrônico esteja familiarizado com as características dos tecidos, células e seus componentes, tanto para identificar e localizar as estruturas desejadas, quanto para determinar se as condições de preparo foram adequadas.

TABELA 1. Reagentes utilizados em microscopia eletrônica e sua ação tóxica.

REAGENTE	AÇÃO TÓXICA
Tetróxido de ósmio	muito tóxico, volátil e altamente irritante das membranas mucosas
Glutaraldeído	possivelmente carcinogênico, pode produzir reações alérgicas
Formaldeído	carcinogênico, pode produzir reações alérgicas
Cacodilato de sódio	contém 50% de arsênio; muito tóxico; provavelmente carcinogênico; pode provocar reações alérgicas; é rapidamente absorvido pela pele
Acetona e etanol	inflamáveis e tóxicos; facilitam a penetração pela pele de substâncias neles dissolvidas
Óxido de propileno	altamente inflamável e carcinogênico
Resinas epóxicas	carcinogênicas; podem provocar reações alérgicas
Resinas acrílicas	podem provocar reações alérgicas
Citrato de chumbo	altamente tóxico
Acetato de uranila	altamente tóxico; emissor de partículas radioativas e, por isso, carcinogênico

Técnicas Básicas de Microscopia Eletrônica de Varredura

O preparo mais freqüente do espécime inclui a fixação em aldeídos (glutaraldeído e/ou paraformaldeído), lavagem, pós-fixação em tetróxido de ósmio seguida de nova lavagem e desidratação em acetona ou etanol, com procedimentos semelhantes aos descritos para a técnica citológica de microscopia de transmissão (II.2.C). O espécime desidratado é seco ao ponto crítico, montado no suporte (*stub*) e coberto com uma camada delgada de ouro ou outro metal. A Fig. 2 mostra um conídio de *Beauveria bassiana* penetrando na base de um pêlo de *Heterotermes tenuis*.

Em outro procedimento comum, o espécime fixado é liofilizado e, a seguir, montado e coberto. Alguns materiais permitem a secagem ao ar, diretamente ou após tratamento com substâncias apropriadas. Espécimes



FIGURA 2. Infecção de *Beauveria bassiana* em *Heterotermes tenuis*. Detalhe de conídio penetrando na base do pêlo (seta). P – pêlo. Gentileza de Rogério Biaggioni Lopes, Departamento de Entomologia, ESALQ.

frágeis, que, quando preparados em soluções líquidas têm suas estruturas danificadas, podem ser fixados em vapor de tetróxido de ósmio e liofilizados ou secos ao ar.

Materiais em suspensão devem ser aglutinados ou fixados a um suporte sólido antes do início da preparação; caso contrário, serão perdidos durante as etapas de preparo. Alguns procedimentos foram desenvolvidos para esse fim: retenção do material em filtros com poros de diâmetro adequados; precipitação com formação de *pellet* por centrifugação; e a deposição do material em superfícies (como lamínulas de vidro) cobertas com poli-L-lisina ou Alcian blue (Bozzola & Russel, 1992).

Técnicas Básicas de Microscopia Eletrônica de Transmissão

Contrastação negativa

A contrastação negativa possibilita a visualização de estruturas biológicas inteiras e em suspensão, tais como vírus, bactérias, esporos de fungo e organelas celulares. É uma técnica simples, rápida, que exige pouca experiência e não necessita de nenhum equipamento especial para sua realização.

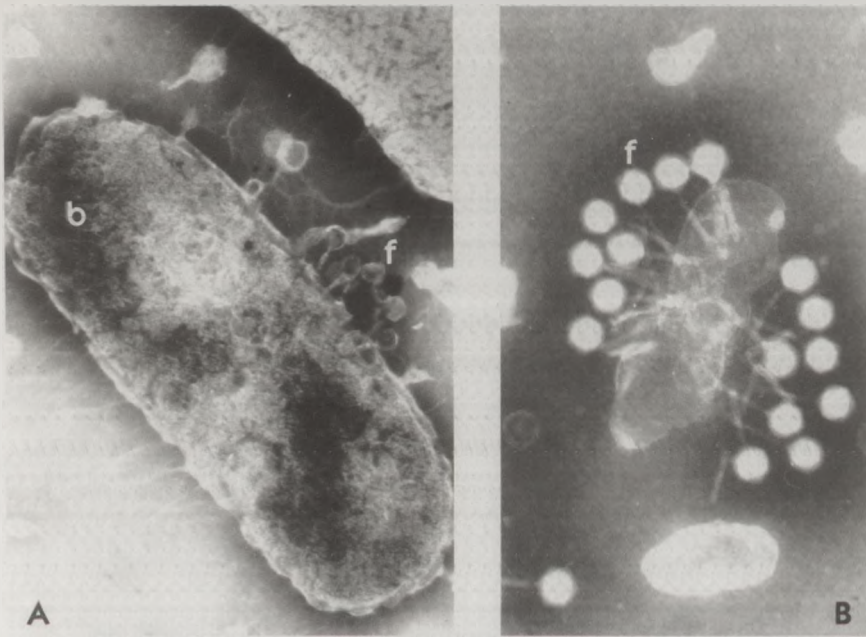


FIGURA 3. Contrastação negativa, utilizando acetato de uranila 2% pH 7,0, da bactéria *Xanthomonas campestris* infectada por um bacteriófago. A – *Xanthomonas campestris* com fagos aderidos externamente. B – Fragmento de *Xanthomonas campestris* lisada com fagos aderidos. b - bactéria; f - bacteriófago. Gentileza de Ilza Maria Sittolin.

Uma gota da suspensão contendo o espécime é deixada por alguns instantes sobre a tela suporte, coberta e seca com papel de filtro. A tela é corada rapidamente com acetato de uranila, ácido fosfotungstíco ou outro corante adequado. Ao final do processo, o espécime ficará envolvido pelo corante mais denso ao feixe de elétrons, aparecendo mais claro sobre o fundo escuro no microscópio (Fig. 3).

A contração negativa permite a observação do formato do espécime e de sua estrutura externa, revelando pouco a respeito de seu interior. É também muito utilizada para a realização de diagnoses rápidas, principalmente de vírus.

Metalização ou sombreamento

Da mesma maneira que a contração negativa, a metalização permite observar pequenas estruturas biológicas em suspensão, revelando seu formato e a estrutura externa do espécime. A metalização é muito utilizada para contrastar ácidos nucléicos e outras macromoléculas.

A técnica consiste em depositar a vácuo uma fina camada de metal pesado (ouro, cromo ou platina) sob determinado ângulo. Devido à angulação e à trajetória retilínea do vapor do metal, a deposição será maior na face voltada para a fonte, produzindo uma imagem semelhante a um negativo de objeto sombreado. A face com maior espessura de deposição aparecerá mais escura, enquanto a sombra, formada por uma área com pouca ou nenhuma deposição, será clara. É prática comum reverter o negativo das micrografias para que a sombra se torne escura e o objeto claro (Fig. 4).

Caso se conheça o ângulo de deposição, pode-se ter informações precisas a respeito da estrutura tridimensional do espécime.

O método apresenta duas desvantagens em relação à contrastação negativa: não revela nada a respeito da estrutura interna do material e necessita de equipamento especial para metalizar a amostra.

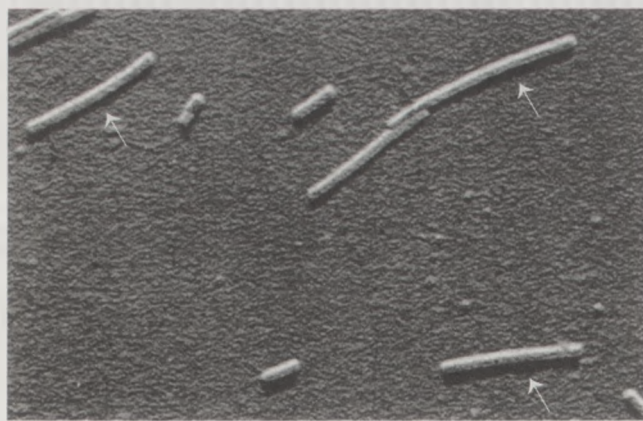


FIGURA 4. Metalização com platina a 30° do vírus do mosaico do fumo. Notar sombra formada pela deposição diferencial do vapor do metal (setas) (arquivo do Laboratório de Microscopia Eletrônica do CENA/USP).

Técnica citológica

A técnica citológica permite observar a ultraestrutura das células e tecidos cortados em seções ultrafinas. Através da ultraestrutura é possível localizar microrganismos dentro ou na superfície de células e tecidos, verificar as alterações induzidas nas células devido a um estímulo (tal como a variação do ambiente, a ação de um organismo antagônico ou a associação com outros indivíduos), determinar a seqüência dos eventos desencadeados por um estímulo ou gerados em função de um processo de interação.

Antes da observação ao microscópio, o espécime deve passar por etapas de preparo com finalidades específicas:

1. Pré-preparo: adaptação do espécime às necessidades do preparo propriamente dito. Materiais em suspensão podem ser precipitados por centrifugação ou aderidos a um filtro, conforme descrito para a microscopia de varredura. O espécime precipitado pode ser envolvido por um bloco de ágar ou agarose antes da desidratação, facilitando o manuseio. Devido à baixa capacidade de penetração dos fixadores, o espécime deve ser reduzido a pequenas dimensões. Cubos de 1 mm de aresta e tiras com 1x3 mm são dimensões recomendáveis. As etapas de preparo devem ser realizadas, sempre que possível, sob agitação suave.

2. Fixação: promove a morte e estabilização das células e tecidos do espécime, conservando suas estruturas com o mínimo possível de alterações em relação ao organismo vivo. É realizada, geralmente, tratando o espécime com solução de aldeído (glutaraldeído 1 ou 2% e paraformaldeído 2 a 4%) por 1 hora a 4°C, lavando em solução tampão e pós-fixando com uma solução de tetróxido de ósmio 1% por 1 hora. A maioria dos protocolos utiliza uma solução de acetato de uranila a 4°C para melhorar a fixação e aumentar o contraste do espécime. A concentração e o pH da solução tampão devem ser próximos aos das células, sendo mais usados o tampão fosfato (0,1 M; pH 7,2) e o tampão cacodilato (0,05 M; pH 7,2) com cloreto de cálcio (0,001 M). Caso não seja possível dar continuidade imediata ao preparo, o espécime pode ser mantido em aldeído por semanas, sem alterações substanciais (Fig. 5).

3. Desidratação: realizada porque as resinas, em sua maioria, não são miscíveis em água. Geralmente é feita em soluções aquosas com concentrações crescentes do agente desidratante, geralmente acetona ou etanol. Um último tratamento em óxido de propileno é facultativo quando a desidratação é realizada com acetona, e obrigatório quando em etanol. A desidratação deve ser rápida e eficiente: rápida para evitar a extração de substâncias celulares e eficiente para substituir toda a água das células pelo agente desidratante. Se a desidratação não for bem realizada, a resina não penetrará convenientemente no espécime, comprometendo a ultramicrotomia e a qualidade dos cortes. Caso haja necessidade, pode-se interromper o preparo do espécime por um período não muito prolongado (como uma noite) em acetona 70%.

4. Inclusão: substituição do solvente celular por uma resina que, depois de polimerizada, fornecerá suporte para a realização dos cortes sem danificar o espécime. As resinas podem ser epóxicas, como Spurr, Epon e Araldite, ou acrílicas, como London Resin White e London Resin Gold.

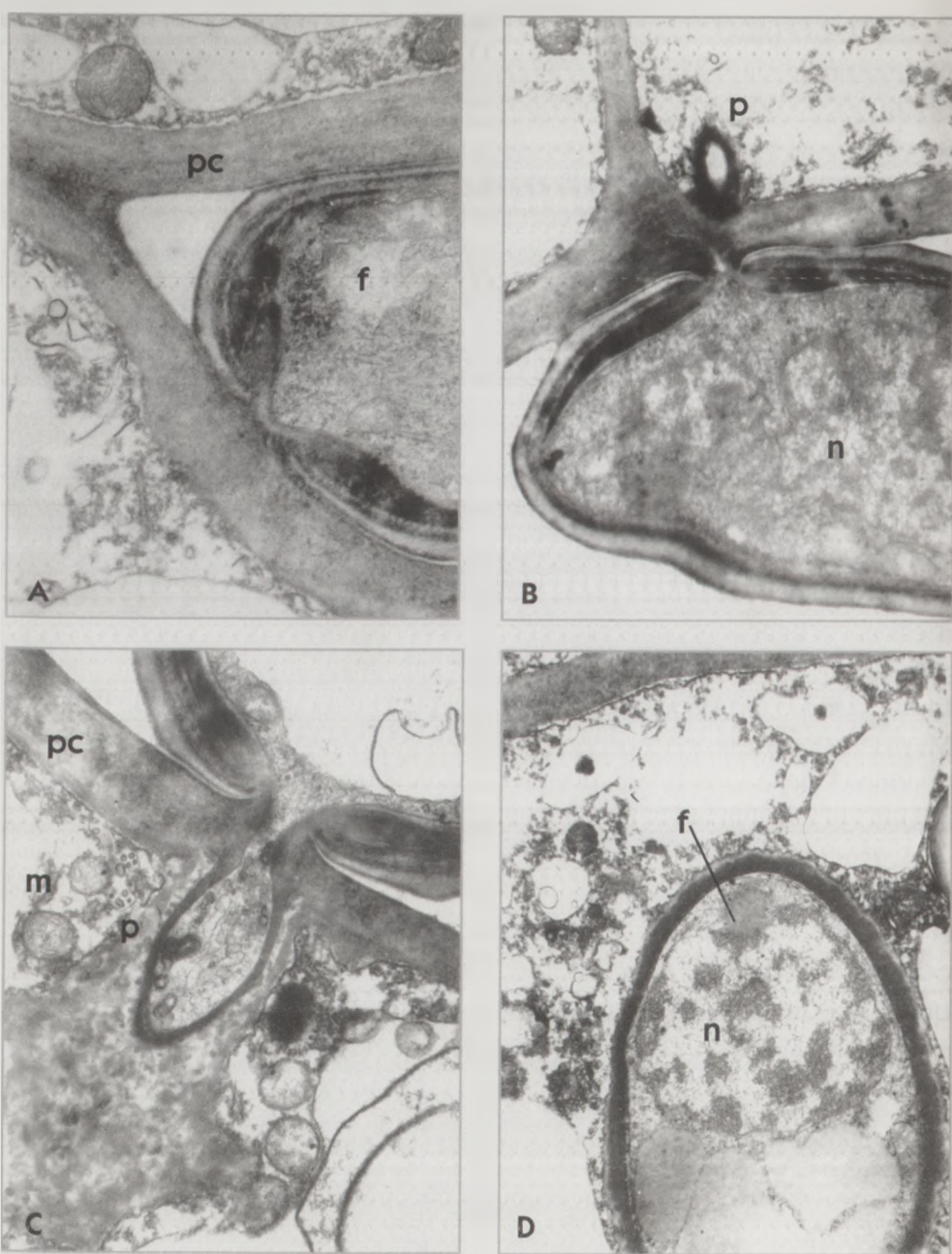


FIGURA 5. Técnica citológica que mostra a seqüência da invasão de célula do cafeeiro pelo fungo *Hemileia vastatrix*, visualizado no microscópio de transmissão. A – Inicial. B – Penetração do “peg”. C – Penetração do “peg” em um estágio mais avançado. D – Fungo no interior da célula do cafeeiro. p - peg; f - fungo; pc - parede celular; n - núcleo; m - mitocôndria (arquivo do Laboratório de Microscopia Eletrônica do CENA/USP).

5. Emblocagem: os espécimes são colocados em fôrmas apropriadas, que são preenchidas com a mesma resina usada na inclusão. Os blocos obtidos após a polimerização da resina facilitam o manuseio do espécime.

6. Trimagem: desbaste do excesso de resina e redução da superfície do espécime à área que se deseja cortar.

7. Ultramicrotomia: obtenção de cortes ultrafinos do espécime, com espessura menor ou igual a 90 nm, necessários por causa da baixa penetrabilidade dos feixes de elétrons. Realizados em ultramicrótomos com auxílio de navalhas de vidro ou diamante.

8. Contrastação: realizada com sais de metais pesados, normalmente acetato de uranila e citrato de chumbo, para intensificar o contraste.

Técnicas Especiais de Microscopia Eletrônica de Transmissão

Criofratura, criodecapagem ou *freeze-etching*

O espécime é infiltrado com substâncias crioprotetoras (como glicérol a 20%), congelado rapidamente com freon e imediatamente transferido para nitrogênio líquido. A fratura é realizada em equipamento especial e sobre ela é depositada uma camada de platina, seguida de outra de carbono. O espécime é digerido e a réplica coletada em uma tela.

A técnica de criofratura produz imagens com aparência tridimensional e é utilizada principalmente no estudo de membranas (Fig. 6).

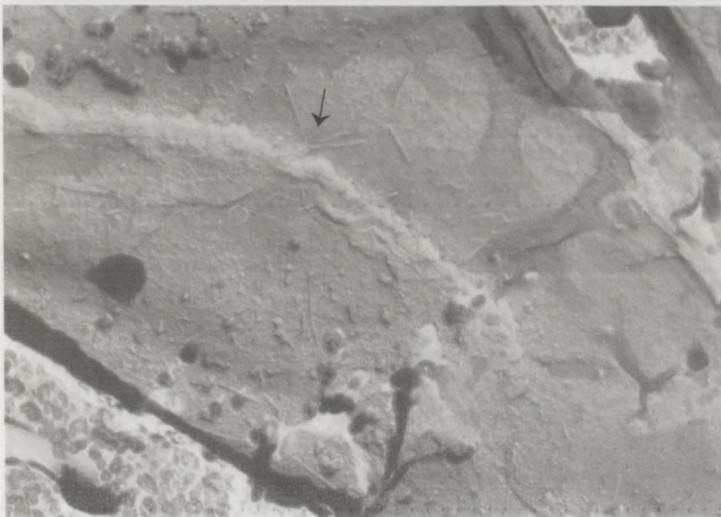


FIGURA 6. Tecido foliar de *Nicotiana tabacum* infectado com o vírus do mosaico-do-fumo preparado por criofratura, mostrando partículas do vírus (seta) (arquivo do Laboratório de Microscopia Eletrônica do CENA/USP).

Replicação

A replicação produz imagens semelhantes às obtidas no microscópio eletrônico de varredura e pode ser utilizada quando o equipamento não é disponível ou quando o espécime ou detalhe que se deseja observar exige limite de resolução não-compatível com o microscópio de varredura.

A réplica pode ser feita em uma só fase, com procedimento semelhante ao utilizado na criofratura, mas o material é fixado e desidratado em vez de congelado. Outro procedimento é realizado em duas fases, produzindo um molde a partir do espécime e a réplica a partir do molde (Fig. 7).

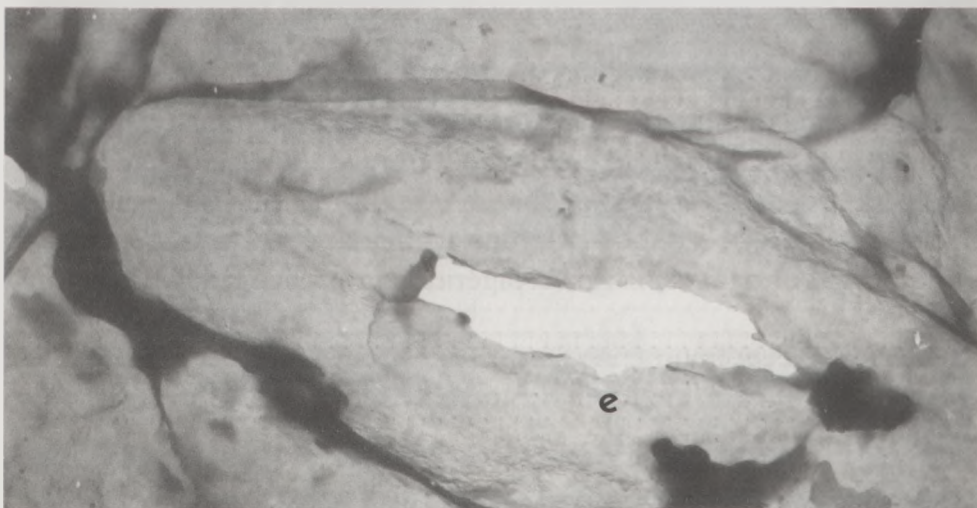


FIGURA 7. Réplica da face inferior da folha de café, mostrando um estômato (e) (arquivo do Laboratório de Microscopia Eletrônica do CENA/USP).

Radioautografia ou auto-radiografia

Consiste em ministrar a organismos vivos um isótopo radioativo (^3H , ^{14}C , ^{131}I), na forma de sais ou precursores de macromoléculas celulares (como aminoácidos e nucleotídeos). Após um período predeterminado, suficiente para a metabolização ou incorporação do isótopo, o espécime é processado de modo semelhante à técnica citológica. Sobre os cortes é colocada uma monocamada de emulsão fotográfica (halogenato de prata). As telas com os cortes devem ser armazenadas em caixas à prova de luz, durante o período de exposição da emulsão à radiação.

Os isótopos incorporados são focos de emissão de partículas radioativas que, sensibilizando a emulsão fotográfica praticamente sobre a estrutura que os contém, produzem grãos de prata metálica, após a revelação. A visualização simultânea dos cortes e dos grãos de prata permite identificar as estruturas que incorporaram o composto radioativo (Figs. 8 e 9).



FIGURA 8. Esquema de auto-radiografia de uma secção do espécime. O isótopo radioativo incorporado no espécime emite partículas radioativas, dando origem a grãos de prata.

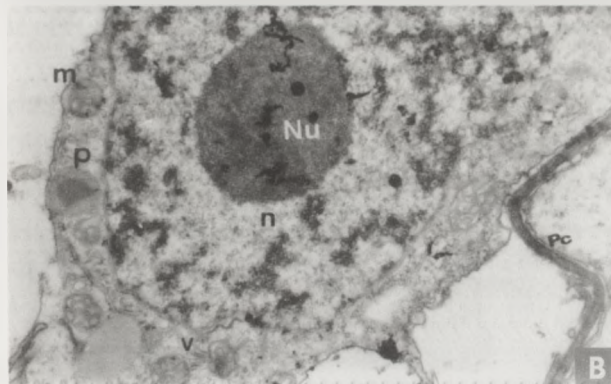
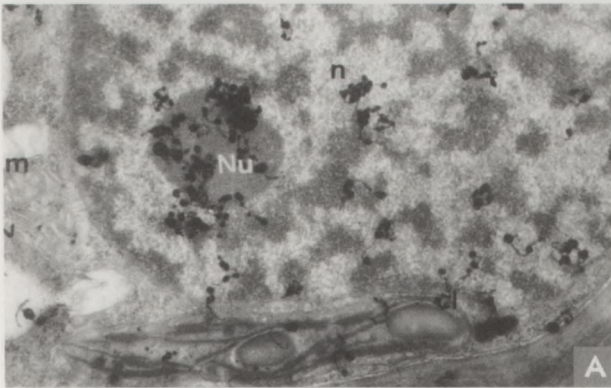


FIGURA 9. Auto-radiografia de célula de fumo infectada com o vírus do anel-do-pimentão e tratada com uridina tritiada. A – Célula controle. B – Célula tratada com actinomicina D para bloquear a transcrição de RNA celular. m - mitocôndria; c - cloroplasto; v - vírus; pc - parede celular; p - peroxissomo; nu - nucléolo (arquivo do Laboratório de Microscopia Eletrônica do CENA/USP).

Dentre outras possibilidades, a auto-radiografia permite a identificação química de estruturas celulares, o estudo dinâmico dos componentes do ser vivo, a determinação dos sítios de síntese de produtos celulares e o acompanhamento do deslocamento até as regiões de armazenamento e utilização.

Citoquímica

As técnicas citoquímicas permitem a localização de substâncias celulares específicas. Podem ser utilizadas em associação com praticamente todas as demais técnicas de microscopia eletrônica de transmissão e varredura, sendo mais comum a associação com o microscópio de transmissão.

As técnicas citoquímicas baseiam-se na afinidade diferencial de substâncias celulares por reagentes, que direta ou indiretamente permitirão a detecção *in situ* no microscópio eletrônico. Um dos pré-requisitos para a realização de estudos citoquímicos é a preservação da afinidade entre a substância celular e o reagente que permitirá sua detecção, sendo necessários, na maioria das vezes, ajustes nas metodologias de preparo, principalmente na fixação e escolha da resina.

Por meio das técnicas citoquímicas é possível determinar a localização *in situ* de praticamente todas as classes de componentes químicos das células, tais como lipídeos, carboidratos, ácidos nucleicos, íons e proteínas. Diversos métodos foram desenvolvidos para a realização de estudos citoquímicos ao microscópio eletrônico. Alguns exemplos são descritos a seguir.

As lecitinas apresentam certa especificidade por mono ou dissacarídeos. Tal característica permite a localização desses açúcares através do tratamento do espécime com lecitinas marcadas, mais freqüentemente, com ouro coloidal. O tratamento pode ser realizado antes ou após a fixação em aldeído ou após a realização dos cortes (Souza, 1989)

O RNA pode ser distinguido do DNA corando os cortes em acetato de uranila 0,5%, tratando-os, a seguir, com EDTA 0,2 M e pós-corando com citrato de chumbo. O acetato de uranila ligado à desoxirribonucleoproteína é removido pelo EDTA, enquanto a ribonucleoproteína não é afetada (Bernhard, 1969). O mesmo efeito é conseguido pelo tratamento com sulfito de sódio 14% (Fig. 10), segundo a técnica descrita por Edger & Bienz, 1975.

O uso de oxalato de amônio, após a fixação do espécime em aldeído, permite localizar íons cálcio. O oxalato reagirá com o cálcio, formando oxalato de cálcio, produto insolúvel. O acetato de uranila pode dissolver os cristais do oxalato de cálcio, e por isso não deve ser utilizado (Benchimol, 1989).

Proteínas básicas podem ser detectadas através do tratamento com ácido fosfotungstístico após a desidratação em etanol. Os cortes não devem ser corados.

Devido à grande utilização, os princípios da imunocitoquímica estão descritos no próximo item.

Imunocitoquímica

A localização de macromoléculas antigênicas pode ser realizada *in situ* pela utilização de anticorpos (imunoglobulinas G), marcados com substâncias que permitirão visualizá-los sobre os cortes, como ouro coloidal, ferritina e enzimas.

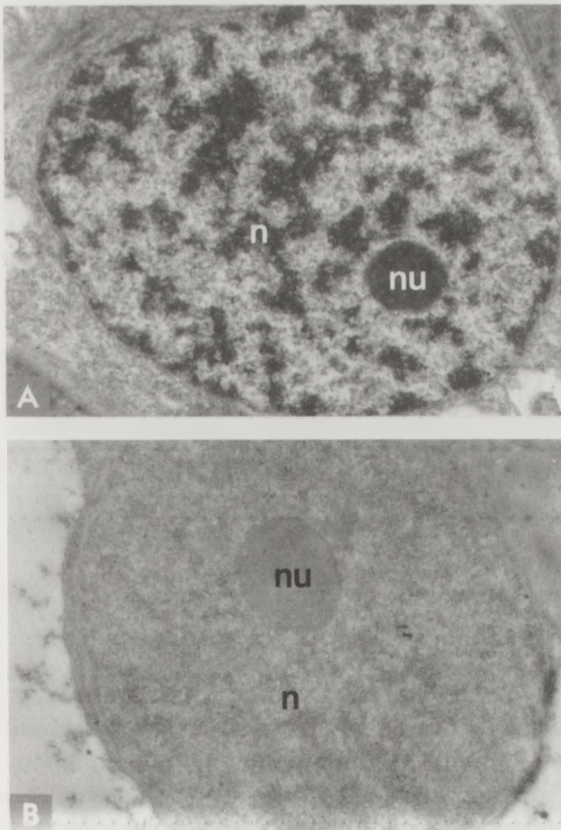


FIGURA 10. Células de fumo infectadas pelo vírus do mosaico-dourado do tomateiro. A – célula corada, segundo procedimento normal; B – célula tratada com sulfito de sódio 14%. n - núcleo; nu - nucléolo (arquivo do Laboratório de Microscopia Eletrônica do CENA/USP).

Pequenas esferas de ouro coloidal são os marcadores mais freqüentes nos trabalhos de imunocitoquímica. A conjugação das partículas de ouro pode ser realizada por diferentes métodos, que definirão o diâmetro da esfera. Anticorpos já conjugados podem ser adquiridos comercialmente.

Dois métodos podem ser utilizados para a localização:

1. método direto: o marcador está ligado diretamente ao anticorpo com afinidade pela macromolécula celular (Fig. 11);

2. método indireto: o marcador está ligado a um anticorpo secundário com afinidade pelo anticorpo primário ou conjugado à proteína A. O anticorpo secundário é produzido especificamente contra a imunoglobulina do animal no qual o anticorpo primário foi produzido, como por exemplo, anticorpos de cabra específicos contra anticorpos de coelho (Fig. 12).

Como a obtenção do anticorpo primário é mais difícil que a do secundário, e a conjugação do anticorpo com o marcador pode reduzir a eficiência da ligação do anticorpo ao antígeno, o método indireto é mais freqüentemente utilizado.

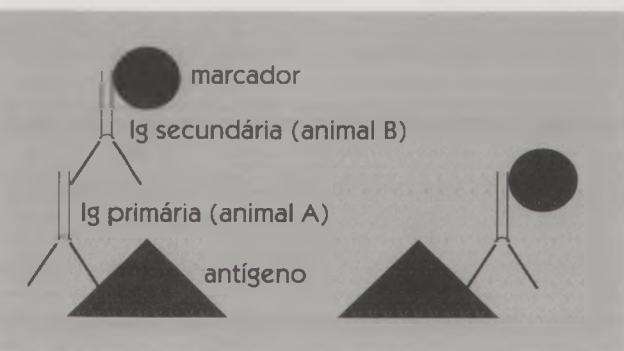


FIGURA 11 Esquema dos métodos de imunocitoquímica indireta (A) e direta (B). Anticorpo (imunoglobulina) específico reconhece antígeno e permite sua localização direta, caso esteja conjugado ao marcador, ou indireta, através de um anticorpo secundário conjugado ao marcador. Ig- imunoglobulina.

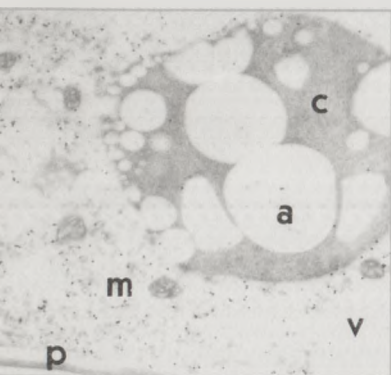


FIGURA 12. Célula vegetal infectada com vírus, tratada com antissoro de coelho contra a proteína do capsídeo do vírus e com antissoro de cabra, marcado com ouro coloidal, contra antissoro de coelho. Pequenos círculos pretos são partículas de ouro conjugadas a anticorpos, com distribuição ampla pelo citoplasma. c - cloroplasto; m - mitocôndria; a - grãos de amido; v - vacúolo; p - parede celular.

Microscopia eletrônica de imunoadsorção

A microscopia eletrônica de imunoadsorção é utilizada para detectar e identificar vírus e micoplasmas presentes em suspensões. É uma técnica simples, rápida e bastante sensível, que utiliza pouca quantidade de antissoro e produz resultados confiáveis.

Consiste em tratar uma tela coberta por camada plástica, preferencialmente reforçada por uma camada de carvão, com antissoro específico para o organismo por alguns instantes, lavar, colocar a tela sobre uma suspensão que contenha o organismo (por minutos a algumas horas), lavar novamente e contrastar a tela com acetato de uranila, ácido fosfotungstístico ou outro corante, conforme descrito para a contração negativa.

Os anticorpos aderidos à cobertura plástica da tela adsorvem especificamente o organismo com afinidade serológica, permitindo detectar e identificar o organismo presente na suspensão (Fig. 13).

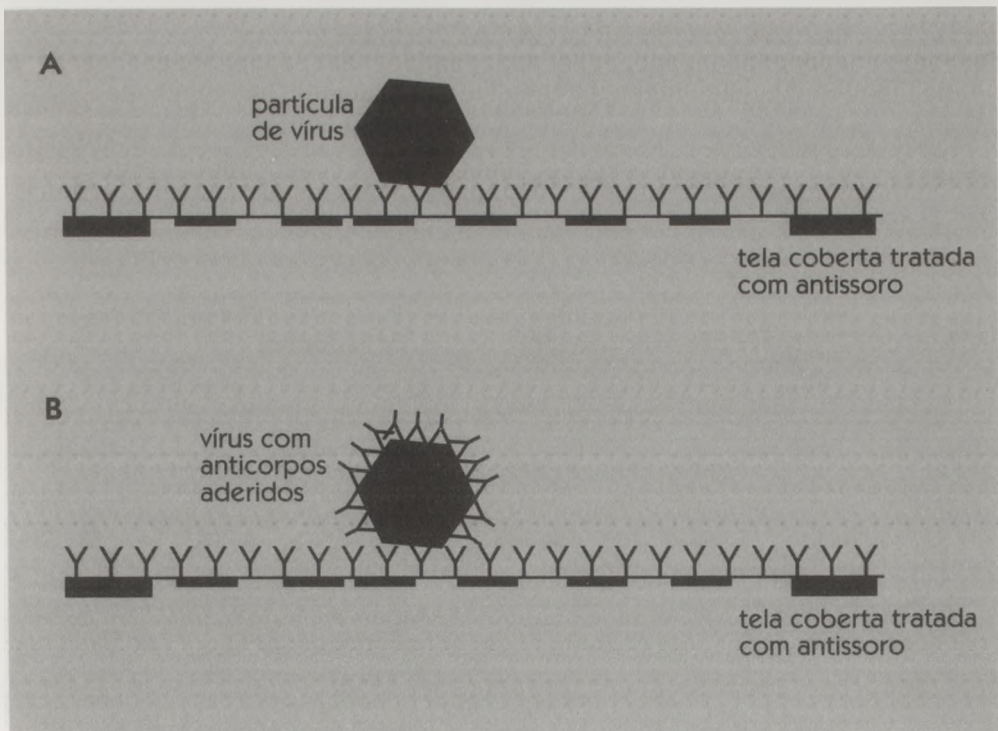


FIGURA 13. Esquema de microscopia eletrônica de imunoadsorção e decoração. A – Microscopia de imunoadsorção sem decoração. B – Microscopia de imunoadsorção com decoração.

Decoração

Consiste em tratar um organismo, geralmente vírus, com um antissoro específico, de modo que ele fique recoberto por uma camada de anticorpos.

A decoração pode ser realizada em associação à contrastação negativa ou à microscopia eletrônica de imunoadsorção (Fig. 14), com tratamento do organismo com o antissoro antes da coloração. O organismo decorado aparece como que envolto por um névoa.

A decoração permite identificar o organismo e também é utilizada em estudos quantitativos, na titulação de antissoros e na determinação de relações serológicas entre diferentes isolados.

Pode-se associar partículas de ouro coloidal à técnica de decoração, possibilitando trabalhos com organismos mais complexos que os vírus de modo semelhante à imunocitoquímica; a esfera de ouro pode estar diretamente ligada ao anticorpo primário, secundário ou à proteína A.

UTILIZAÇÃO DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA NA ECOLOGIA MICROBIANA

Embora a dinâmica de qualquer processo envolva grande gama de fatores, neste capítulo, para fins didáticos, as interrelações estão divididas em três classes, de acordo com o principal parceiro do microrganismo.

Interações entre Microrganismos e o Ambiente

A variação das condições físicas e químicas do meio em que está inserido o microrganismo pode ocasionar mudanças em sua morfologia e ultraestrutura. As mudanças se referem ao tamanho das células (Mary *et al.*, 1994) ou sua à forma (Wartmann *et al.*, 1995; Mittag, 1994), resultando, em alguns casos, em um completo dimorfismo. As alterações podem ocorrer nas organelas (Fuhrmann *et al.*, 1993), na cápsula externa (Rojas *et al.*, 1995; Jacques *et al.*, 1994), nas membranas (Bolanos *et al.*, 1994) e na parede celular (Serraj *et al.*, 1995). O aumento ou diminuição de substâncias de reserva, de enzimas (Turnau & Dexheimer, 1995; Daniel *et al.*, 1994) e de outros componentes químicos (Nicole *et al.*, 1995) são outras alterações frequentes (Fig.15).

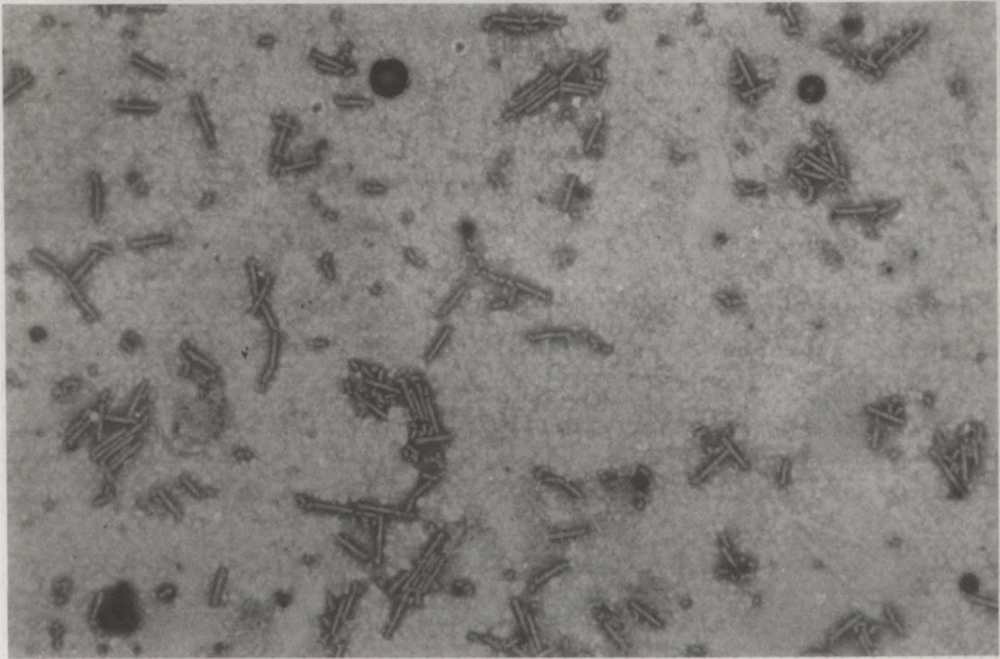


FIGURA 14. Microscopia eletrônica de imunoadsorção mostrando partículas grandes e pequenas do vírus do anel-do-pimentão, coradas com acetato de uranila (arquivo do Laboratório de Microscopia Eletrônica do CENA/USP).

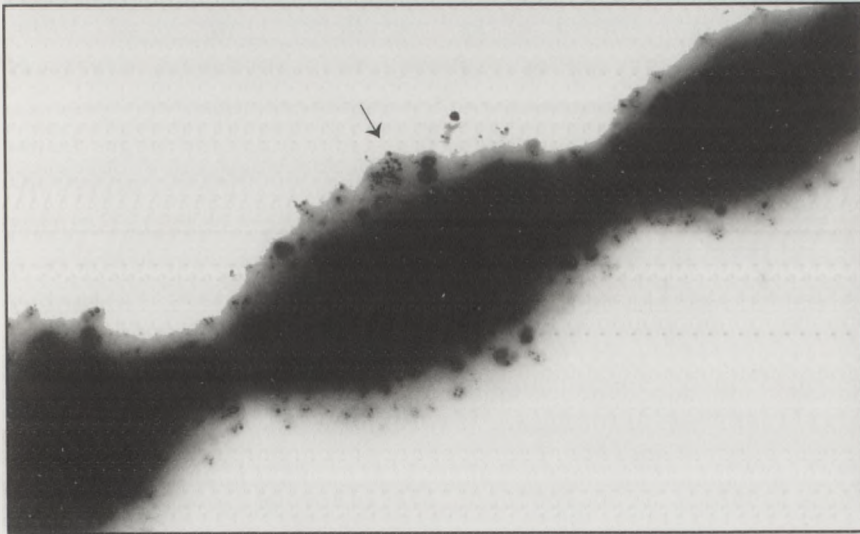


FIGURA 15. Células não coradas da cianobactéria *Nostoc* spp., crescida em meio contendo nitrato de prata. Precipitados de prata aderidos à superfície podem ser visualizados (seta). Gentileza de Marli de Fátima Fiore, CENA/USP.

Microrganismos adaptados a ambientes específicos como diferentes profundidades marítimas (Ekendahl *et al.*, 1994), solos da Antártica (Davey & Clarke, 1991), resíduos industriais (Zellner *et al.*, 1994; Petrovic *et al.*, 1989) e solventes orgânicos (Lalitha & Krishnan, 1991) têm sido caracterizados. Também têm sido caracterizados os microrganismos e sua ação em processos que alteram o ambiente, tais como modificação da estrutura dos solos (Degens *et al.*, 1994; Belnap & Gardner, 1993), degradação de substâncias tóxicas (Ramos *et al.*, 1995, Lopez-Llorca *et al.*, 1993), decomposição de matéria orgânica (Barrasa *et al.*, 1995; Green *et al.*, 1992), fixação de nitrogênio atmosférico (De Boer *et al.*, 1991) e oxidação de metais (Coutinho *et al.*, 1994).

Sucessões de microrganismos em microambientes também têm sido estudadas ao microscópio eletrônico (Marcellino & Benson, 1992).

Interações entre Microrganismos e Organismos Superiores

Estudos das interações entre microrganismos e organismos superiores têm sido conduzidos ao microscópio eletrônico. O equipamento permite localizar (Ravoahangimalala *et al.*, 1993; Fermaud & Menn, 1992), identificar (Milne *et al.*, 1995) e caracterizar (Mirza *et al.*, 1994; Vasse *et al.*, 1990) o microrganismo dentro do organismo superior ou aderido externamente. O modo de penetração ou adesão (Mateos *et al.*, 1995; Ammar *et al.*, 1994), a colonização do hospedeiro (Hurek *et al.*, 1994; Gantar *et al.*, 1991) e as alterações mutuamente induzidas (Andreeva *et al.*, 1995; Mims, 1991) são outros aspectos caracterizados.

O microscópio eletrônico tem também auxiliado na definição da interação predominante (Nehili *et al.*, 1994; Costa *et al.*, 1993) e no entendimento das fases do processo (Hassan & Charnley, 1989). Estudos citoquímicos têm auxiliado na elucidação dos aspectos bioquímicos e fisiológicos das interações (Grandmaison & Ibrahim, 1995; Goettel *et al.*, 1989).

O parasitismo de microrganismos em plantas, animais e insetos, a digestão microbiana de alimentos em ruminantes, a associação entre insetos vetores e microrganismos, a fixação biológica de nitrogênio atmosférico em vegetais pelas bactérias *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (Fig. 16) e a relação vegetais-micorrizas estão entre os processos com grande volume de informações gerado com o auxílio do microscópio eletrônico.

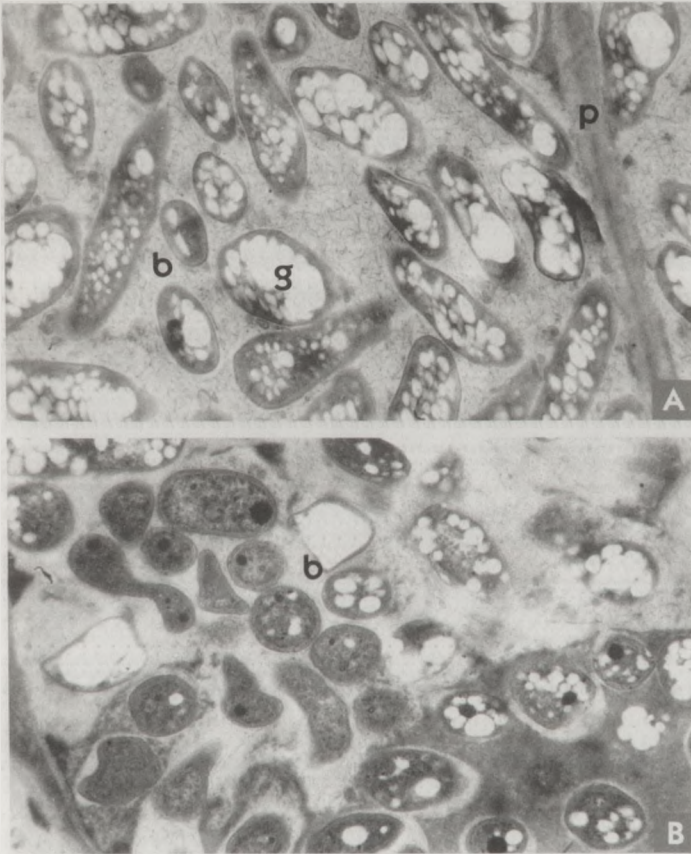


FIGURA 16. Nódulos de feijoeiro inoculado com *Rhizobium phaseoli*. A – Nódulo em solo com fósforo. Notam-se bacterióides com grande quantidade de glóbulos de ácido polibeta hidroxi-butírico (substância de reserva). B – Nódulo em solo sem fósforo. b - bacterióide; p - parede celular; g - grânulos de reserva (arquivo do Laboratório de Microscopia Eletrônica do CENA/USP).

A penetração do fungo *Metarhizium anisopliae* (Fig. 17) na cutícula dos insetos tem sido bem estudada ao microscópio eletrônico e será descrita sucintamente. Após a adesão à superfície do inseto, os conídios de *M. anisopliae* germinam e formam estruturas de penetração, apressórios, que rompem a epicutícula com o auxílio de enzimas proteolíticas (Hajek & St. Leger, 1994). A topografia e a textura da superfície têm efeito na formação do apressório (St. Leger *et al.*, 1991).

Ao romper a epicutícula, o progresso da penetração pode ser mais ou menos direto, através de uma hifa penetrante ou pela formação de expansões laterais dentro da procutícula. Essas estruturas laterais podem causar fraturas que favorecem a penetração do fungo e facilitam a dispersão de enzimas degradadoras da cutícula (Goettel *et al.*, 1989).

As enzimas proteolíticas estão presentes em baixo nível no esporo dormente do fungo e sua concentração aumenta após a diferenciação

do apressório, continuando em altos níveis. A enzima é secretada do citoplasma em pacotes (Goettel *et al.*, 1989).

A degradação da procutícula é realizada por meio de processos mecânicos e enzimáticos. A ação mecânica pode ser identificada pela alteração da estrutura física das lamelas e, indiretamente, pelo grande aumento da penetração do fungo em insetos com a cutícula tratada com Dimilin (Hassam & Charnley, 1989), um inibidor da produção de quitina.

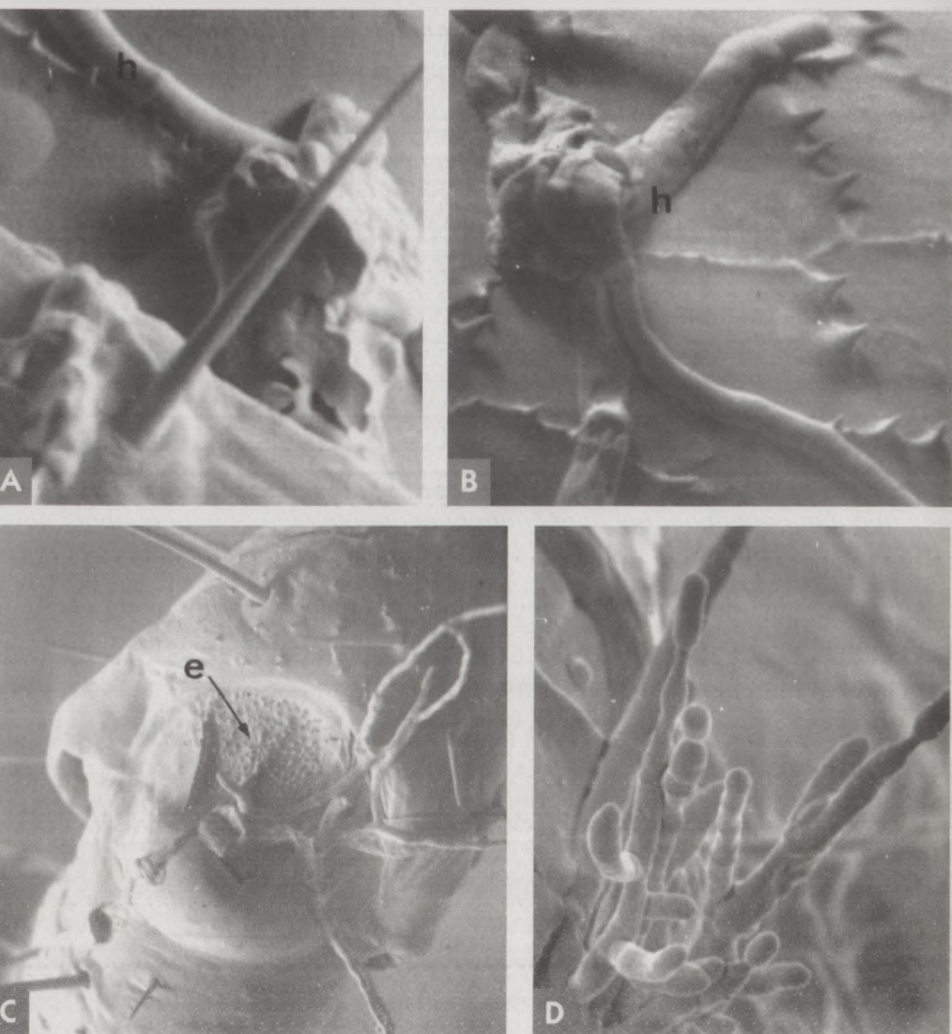


FIGURA 17. Ciclo de desenvolvimento de *Metarhizium anisopliae* em *Heterotermes tenuis*. A – germinação; B – penetração; C e D – conidiogênese. e - esporos, h - hifas.

Inteligência de Rogério Biaggioni Lopes, Departamento de Entomologia, ESALQ.

Interações entre Microrganismos

O estudo ao microscópio eletrônico das interações entre microrganismos de mesma espécie ou de espécies diferentes, à semelhança dos sub-itens anteriores, permite detectar (Hennes & Simon, 1995; Schussler *et al.*, 1994) e identificar (Rothmund *et al.*, 1994; Luck *et al.*, 1990) os microrganismos envolvidos, e caracterizar as etapas de suas interações (Dijksterhuis *et al.*, 1994; Fukui *et al.*, 1994). Alterações morfológicas (Smith *et al.*, 1994; Wolf *et al.*, 1993) e citológicas, a nível de membranas (Kempf *et al.*, 1994; Boland *et al.*, 1993), citoplasma (Gulya *et al.*, 1992; Gijzen *et al.*, 1991) e parede celular (Nierzwicki-Bauer & Aulfinger, 1991; Farquhar & Peterson, 1990), induzidas durante a interação, podem ser caracterizadas. É possível ainda elucidar aspectos fisiológicos e bioquímicos, através da localização *in situ* de íons (Coutinho *et al.*, 1994), enzimas (Lindblad *et al.*, 1991) e outras moléculas envolvidas (Macleod *et al.*, 1995; Benhamou & Chet, 1993). Esses estudos são empregados em praticamente todas as formas de interação entre microrganismos (Fig. 18).

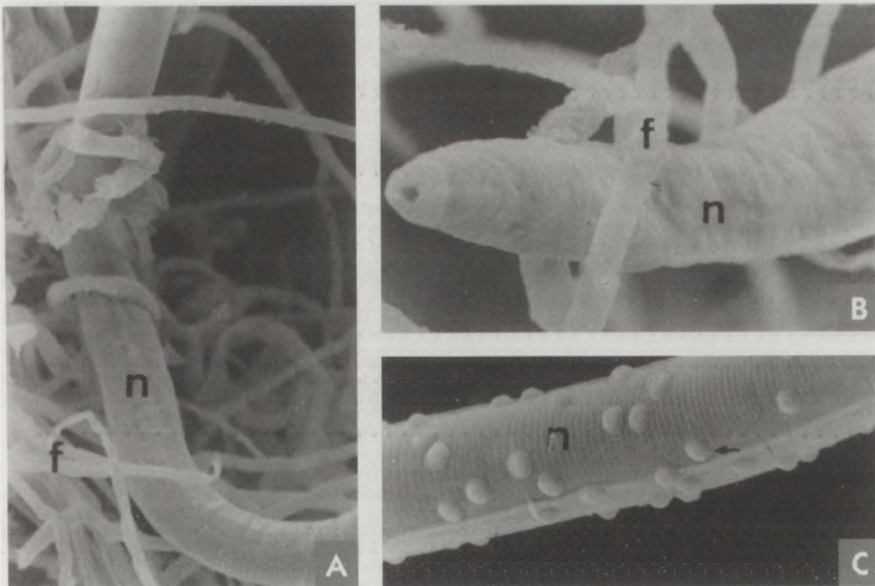


FIGURA 18. Elétron-micrografias de varredura de nematóides capturados por fungos nematófagos (A e B) ou com esporângios da bactéria *Pasteuria penetrans* aderidos à região mediana do corpo de fêmea de *Pratylenchus coffea* (C). n - nematóide, f - fungo nematófago, seta - esporângio de *P. penetrans*. Gentileza de Jaime Maia dos Santos, FCAV/UNESP.

Alguns processos têm sido estudados com maior frequência ao microscópio eletrônico, como o hiperparasitismo de fungos em fungos fitopatogênicos do solo (Benhamou & Chet, 1993; Micheref *et al.*, 1993; Chérif & Benhamou, 1990). O hiperparasitismo de *Trichoderma* em fungos fitopatogênicos será utilizado como modelo de utilização do microscópio eletrônico no estudo das interações entre microrganismos.

Observadas ao microscópio eletrônico de varredura (Fig. 19), as hifas de *Trichoderma* são mais finas do que as do hospedeiro, nas quais se fixam através de ganchos, apressórios e, mais comumente, enrolando-se em espiral. No estágio inicial da infecção, ocorre contato entre as hifas, mas o hospedeiro não aparenta nenhuma alteração morfológica. No período intermediário, o hospedeiro apresenta gradativo enrugamento da superfície das células e perda de turgor, que, ocasionalmente, podem ser acompanhados de quebra da parede celular e desintegração da hifa hospedeira. A remoção do *Trichoderma* permite visualizar a digestão parcial do hospedeiro ao longo da zona de contato entre as hifas (Elad *et al.*, 1983).

A ultraestrutura, observada ao microscópio eletrônico de transmissão, mostrou que as alterações se iniciam com uma pequena retração da membrana plasmática e redução na eletrodensidade das camadas mais externas da parede celular.

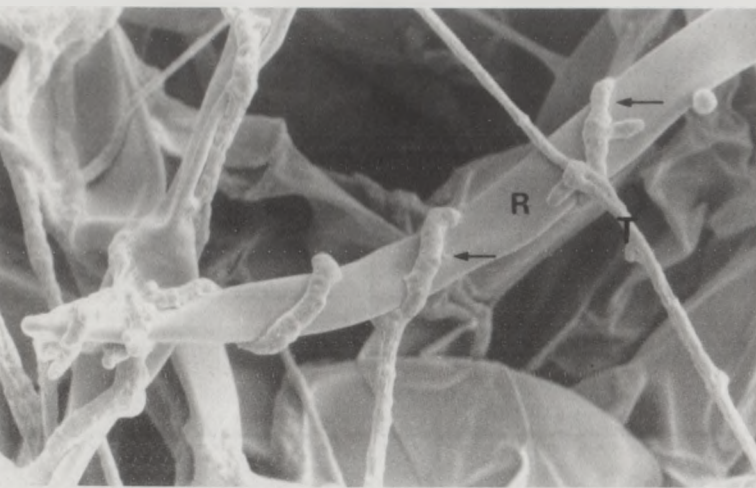


FIGURA 19. Micrografia obtida ao microscópio eletrônico de varredura, mostrando o hiperparasitismo de *Trichoderma harzianum* (T) em *Rhizoctonia solani* (R). Notar digestão parcial da hifa de *R. solani* nos pontos de contato com o parasita (seta). Gentileza de Tamar Soares de Melo, EMBRAPA Meio Ambiente.

Com o passar do tempo, as alterações evoluem. Ocorre grande retração da membrana, com freqüente ruptura, as organelas desaparecem, a parede celular vai se tornando mais fina até se parecer com uma fita. No final do processo, grande número de células do hospedeiro se desintegram completamente e só podem ser identificadas pela visualização de *débris* (Benhamou & Chet, 1993; Chérif & Benhamou, 1990).

A ação de quitinases foi verificada indiretamente, através da detecção *in situ* de resíduos de N-acetilglucosamina (Benhamou & Chet, 1993; Chérif & Benhamou, 1990). A alteração das macromoléculas de quitina do micélio do hospedeiro se inicia logo após o contato com o antagonista, restrita à camada mais externa da parede celular na região de contato. Posteriormente ocorre generalização da ação da enzima, indicando aumento da secreção de quitinases pelo *Trichoderma*.

Evidências indiretas indicam que o estabelecimento e a manutenção do contato entre *Rhizoctonia solani* e *Trichoderma* são mediados por uma fina matriz polissacarídea externa do hospedeiro. A quantidade significativa de galactose, presente na matriz, sugere a presença de receptores galactose específicos na superfície das células de *Trichoderma*, possivelmente uma lecitina (Benhamou & Chet, 1993).

AGRADECIMENTOS

À Comissão Editorial do Centro de Energia Nuclear na Agricultura/USP, Piracicaba.

Ao Dr. Oslei Paes de Almeida, professor da Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, pela revisão dos originais.

LITERATURA RECOMENDADA

Maiores detalhes sobre o microscópio eletrônico e as técnicas de preparo podem ser obtidos nas publicações relacionadas a seguir.

BOZZOLA, J.J.; RUSSELL, L.D. **Electron Microscopy: Principles and techniques for biologists**. Boston: Jones and Bartlett, 1992. 542p.

DYSTRA, M.J. **A Manual of Applied Techniques for Biological Electron Microscopy**. New York: Plenum, 1993. 257p.

GLAUERT, A.M. **Fixation, Dehydration and Embedding of Biological Specimens**. Amsterdam: North Holland, 1980. (Practical methods in electron microscopy, v.3).

- HAYAT, M.A. **Principles and Techniques of Electron Microscopy: Biological Applications**. Boca Raton: CRC Press, 1989. 469p.
- HUNTER, E. **Practical Electron Microscopy: a Beginner's Illustrated Guide**. Cambridge: Cambridge University Press, 1993. 173p.
- MURPHY, J.; ROOMANS, G.M. **Preparation of Biological Specimens for Scanning Electron Microscopy**. O'Hare: Scanning Electron Microscopy, 1984. 344p.
- SOUZA, W. **Manual sobre Técnicas Básicas em Microscopia Eletrônica**. v.1. Técnicas básicas. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1989. 105p.
- SOUZA, W. **Manual sobre Técnicas Básicas em Microscopia Eletrônica**. v.2. Citoquímica estrutural. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1989. 136p.
- SOUZA, W. **Manual sobre Técnicas Básicas em Microscopia Eletrônica**. v.3. Imunocitoquímica. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1993. 83p.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREEVA, I.N.; KOZHARINOVA, G.M.; IZMAILOV, S.F. Ultrastructure of mitochondria in legume root nodules. **Russian Journal of Plant Physiology**. New York, v.42, n.2, p.191-198, 1995.
- AMMAR, E.D.; JÄRLFORS, V.; PIRONE, T.P. Association of potyvirus helper component protein with virions and the cuticle lining the maxillary food canal and foregut of an aphid vector. **Phytopathology**. Lancaster, v.84, n.10, p.1054-1060, 1994.
- BARRASA, J.M.; CAMARERO, S.; MARTÍNEZ, A.T.; RUEL, K. Ultrastructural aspects of wheat straw degradation by *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. Berlin, v.43, n.4, p.766-770, 1995.
- BELNAP, J.; GARDNER, J.S. Soil microstructure in soils of the Colorado Plateau: the role of the cyanobacterium *Microcoleus vaginatus*. **Great Basin Naturalist**. Provo, v.53, n.1, p.40-47, 1993.
- BENCHIMOL, M. Localização de cálcio. In: SOUZA, W. **Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica: citoquímica estrutural**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1989 v.2, p.65-74.
- BENHAMOU, N.; CHET, I. Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia sclari*: ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process. **Phytopathology**. Lancaster, v.83, n.10, p.1062-1071, 1993.
- BENHARD, W. A new staining procedure for electron microscopy cytology. **Journal of Ultrastructure Research**. New York, v.27, p.259-265, 1969.
- BOLAND, G.J.; MOULD, M.J.R.; ROBB, J. Ultrastructure of a hypovirulent isolate of *Sclerotinia sclerotiorum* containing double-stranded RNA. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. London, v.43, n.1, p.21-32, 1993.
- BOLANOS, L.; ESTEBAN, E.; LORENZO, C.; FERNANDEZ-PASCUAL, M.; FELIPE, M.R.; GARATE, A.; BONILIA, I.; LORENZO, C.; FELIPE, M.R. Essentially of boron for symbiotic dinitrogen fixation in pea (*Pisum sativum*) rhizobium nodules. **Plant Physiology**. Rockville, v.104, n.1, p.85-90, 1994.
- BOZZOLA, J.J.; RUSSELL, L.D. **Electron Microscopy: Principles and techniques for biologists**. Boston: Jones and Bartlett, 1992. 542p.
- CHÉRIF, M.; BENHAMOU, N. Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f.sp. *redicis-licopersici*. **Phytopathology**. Lancaster, v.80, n.12, p.1406-1414, 1990.
- COSTA, H.S.; WESTCOT, D.M.; ULLMAN, D.E.; JOHNSON, M.W. Ultrastructure of the endosymbionts of the whitefly, *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum*. **Protoplasma**. Leipzig, v.176, n.3-4, p.106-115, 1993.
- COUTINHO, C.M.L.M.; MAGALHAES, F.C.; ARAUJO JORGE, T.C. Ultrastructure of sulphidogenic biofilms rich in sulphate-reducing bacteria causing corrosion in the offshore oil extraction platforms off Brazil's Atlantic coast. **Journal of General and Applied Microbiology**. Tokyo, v.40, n.3, p.227-241, 1994.
- DANIEL, G.; VOLC, J.; KUBATOVA, E. Pyranose oxidase, a major source of H₂O₂ during wood degradation by *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* and *Oudemansiella mucida*. **Applied and Environmental Microbiology**. Baltimore, v.60, n.7, p.2524-2532, 1994.

- DAVEY, M.C.; CLARKE, K.J. The spatial distribution of microalgae on Antarctic fellfield soils. **Antarctic Science**, Oxford, v.3, n.3, p.257-263, 1991.
- DE BOER, W.; GUNNEWIEK, P.J.A.K.; VEENHUIS, M.; BOCK, E.; LAANBROEK, H.J.; BOER, W.D. Nitrification at low pH by aggregated chemolithotrophic bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.57, n.12, p.3600-3604, 1991.
- DEGENS, B.P.; SPARLING, G.P.; ABBOTT, L.K. The contribution from hyphae, roots and organic carbon constituents to the aggregation of a sandy loam under long-term clover-based and grass pastures. **European Journal of Soil Science**, London, v.45, n.4, p.459-468, 1994.
- DIJKSTERHUIS, J.; SJOLLEMA, K.A.; VEENHUIS, M.; HARDER, W. Competitive interactions between two nematophagous fungi during infection and digestion of the nematode *Panagrellus redivivus*. **Mycological Research**, Cambridge, v.98, n.12, p.1458-1462, 1994.
- EDGER, D.; BIENZ, K. A method for distinction between RNA and DNA in aldehyde and osmiumtetroxide-fixed electron microscopy autoradiographs. **Experientia**, Basel, v.31, n.11, p.1371-1373, 1975.
- EKENDAHL, S.; ARLINGER, J.; STAHL, F.; PEDERSEN, K. Characterization of attached bacterial populations in deep granitic groundwater from the stripa research mine by 16S rRNA gene sequencing and scanning electron microscope. **Microbiology**, New York, v.140, n.7, p.1575-1583, 1994.
- ELAD, Y.; CHET, I.; HENIS, Y. Parasitism of *Trichoderma* spp on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* - Scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. **Phytopathology**, Lancaster, v.73, n.1, p.85-88, 1983.
- FARQUHAR, M.L.; PETERSON, R.L. Induction of protoplast formation in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* by the root rot pathogen *Fusarium oxysporum*. **New Phytologist**, London, v.116, n.1, p.107-113, 1990.
- FERMAUD, M.; MENN, R. Transmission of *Botrytis cinerae* to grape berry moth larvae. **Phytopathology**, Lancaster, v.82, n.12, p.1393-1398, 1992.
- FUHRMANN, S.; OVERMANN, J.; PFENNIG, N.; FISCHER, U. Influence of vitamin B₁₂ and light on the formation of chlorosomes in green- and brown-colored *Chlorobium* species. **Archives of Microbiology**, Berlin, v.160, p.193-198, 1993.
- FUKUI, R.; POINAR, E.I.; BAUER, P.H.; SCHROTH, M.N.; HENDSON, M.; WANG, X.L.; HANCOCK, J.G. Spatial colonization patterns and interaction of bacteria on inoculated sugar beet seed. **Phytopathology**, Lancaster, v.84, n.11, p.1338-1345, 1994.
- GANTAR, M.; KERBY, N.W.; POWELL, P. Colonization of wheat (*Triticum vulgare* L.) by N₂-fixing cyanobacteria: II. An ultrastructural study. **New Phytologist**, London, v.118, n.3, p.485-492, 1991.
- GIJZEN, H.J.; BROERS, C.A.M.; BARUGHARE, M.; STUMM, C.K. Methanogenic bacteria as endosymbionts of the ciliate *Nyctotherus ovalis* in the cockroach hindgut. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.57, n.6, 1630-1634, 1991.
- GOETTEL, M.S.; LEGER, R.J.; RIZZO, N.W.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D.W. Ultrastructural localization of a cuticle-degrading protease produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* during penetration of host (*Manduca sexta*) cuticle. **Journal of General Microbiology**, Reading, v.135, n.8, p.2233-2239, 1989.
- GRANDMAISON, J.; IBRAHIM, R. Ultrastructural localization of a diprenylated isoflavone in *Rhizobium lupini-Lupinus albus* symbiotic association. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.46, n.283, p.231-237, 1995.
- GREEN, F.; CLAUSEN, C.A.; LARSEN, M.J.; HIGHLEY, T.L. Immuno-scanning electron microscopic localization of extracellular wood-degrading enzymes within the fibrillar sheath of the brown-rot fungus *Postia placenta*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.38, n.9, p.898-904, 1992.
- GULYA, T.J.; FREEMAN, T.P.; MAYHEW, D.E. Ultrastructure of virus-like particles in *Plasmopara halstedii*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.70, n.2, p.334-339, 1992.
- HAJEK, A.E.; ST. LEGER, J.R. Interactions between fungal pathogens and insect host. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.39, p.293-322, 1994.
- HASSAN, A.E.M.; CHARNLEY, A.K. Ultrastructural study of the penetration by *Metarhizium anisopliae* through Dimilin- affected cuticle of *Manduca sexta*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v.54, n.1, p.117-124, 1989.
- HENNES, K.P.; SIMON, M. Significance of bacteriophages for controlling bacterial plankton growth in a mesotrophic lake. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.61, n.1, p.333-340, 1995.

- HUREK, T.; REINHOLD HUREK, B.; MONTAGU, M.; KELLENBERGER, E.; VAN-MONTAGU, M. Root coonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.176, n.7, p.1913-1923, 1994.
- JACQUES, M.; BÉLANGER, M.; DIARRA, M.S.; DARGIS, M.S.; MALOUIN, F. Nodulation of *Pasteurella multocida* capsular polysaccharide during growth under iron-restricted conditions and *in vivo*. **Microbiology**, New York, v.140, n.2, p.263-270, 1994.
- KEMPF, H.J.; EBRAHIM-NESBAT, F.; WOLF, G. Licht und elektronenmikroskopische Untersuchungen zu Wirkung eines Kulturfiltrates von *Erwinia herbicola* B 247 und von Herbicidin A auf *Fusarium culmorum*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.141, n.4, p.347-354, 1994.
- LALITHA, K.; KRISHNAN, S. Isolation of a novel rod shaped methanogen growing on methanol and 2- i.4 p.402-408, 1991.
- LINDBLAD, P.; BERGMAN, B.; NIERZWICKI-BAUER, S.A. propanol **Archives of Microbiology**, Berlin v.155, Immunocytochemical localization of nitrogenase in bacteria symbiotically associated with *Azolla* spp **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.57, n.12, p.3637-3640, 1991.
- LOPEZ-LORCA, L.V.; VALIENTE, M.F.C.; GASCON, A. A study of biodegradation of poly-beta-hydroxybutanoate (PHA) films in soil using scanning electron microscopy. **Micron**, v.24, n.1, p.23-29, 1993.
- LUCK, B.T.; BREUIL, C.; BROWN, D.L. Immunological discrimination between a sap-staining fungus and a biological control fungus **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.68, n.7, p.1578-1588, 1990.
- MACLEOD, F.A.; GUIOT, S.R.; COSTERTON, J.W. Electron microscopy examination of the extracellular polymeric substances in anaerobic granular biofilms. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.11, n.5, p.481-485, 1995.
- MARCELLINO, N.; BENSON, D.R. Scanning electron and light microscopic study of microbial succession on Bethlehem St. Nectaire cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.58, n.1, p.3448-3454, 1992.
- MARY, P.; DUPUY, N.; BIREMON, C.D.; DEFIVES, C.; TAILLIEZ, R. Differences among *Rhizobium meliloti* and *Bradyrhizobium japonicum* strains in tolerance to desiccation and storage at different relative humidities. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.26, n.9, p.1125-1132, 1994.
- MATEOS, P.F.; BAKER, D.L.; PHILIP-HOLLINGSWORTH, S.; SQUARTINI, A.; PERUFFO, A.D.B.; NUTI, M.P. DAZZO, F.B. Direct *in situ* identification of cellulose microfibrils associated with *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii attached to the root epidermis of white clover **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa v.41, n.2, p.202-207, 1995.
- MEEK, G.A. **Practical Electron Microscopy for Biologists**. 2.ed. New York: John Wiley, 1976. 528p.
- MICHEREF, S.J.; MARIANO, R.L.R.; PADOVAN, I.; MENEZES, M. Observações ultraestruturais das interações entre *Colletotrichum gramimicola* e agentes biocontroladores no filoplano de sorgo. **Summa Phytopatologica**, Jaguariuna, v.19, n.2, p.99-101, 1993.
- MILNE, R.G.; RAMASSO, E.; LENZI, R.; MASENGA, V.; SARINDU, N.; CLARK, M.F. Pre- and post-entending immunogold labeling and electron microscopy in plant host tissues of three antigenically unrelated MLOs: primula yellow, tomato big bud and bermudagrass white leaf. **European Journal of Plant Pathology** v.101, n.1, p.57-67, 1995.
- MIMS, C.W. Using electron microscopy to study plant pathogenic fungi. **Mycologia**, New York, v.83, n.1 p.1-19, 1991
- MIRZA, M.S.; PAWLOWSKI, K.; HAFEEZ, F.Y.; CHAUDHARY, A.H.; AKKERMANS, A.D.L. Ultrastructure of the endophyte and localization of nifH transcripts in root nodules of *Coriaria nepalensis* Wall. by *in situ* hybridization. **New Phytologist**, London, v.126, n.1, p.131-136, 1994.
- MITTAG, H. Structural alterations in *Candida albicans* by caffeine and caffeine salts. **Mycoses**, Berlin, v.37, n.9-10, p.337-341, 1994.
- NEHILI, M.; ILK, C.; MEHLHORN, H.; RUHNAU, K.; DICK, W.; NJAYOU, M. Experiments on the possible role of leeches as vectors of animal and human pathogens: a light and electron microscopy study **Parastology Research**, Berlin, v.80, n.4, p.277-290, 1994.
- NICOLE, M.; CHAMBERLANO, H.; RIOUX, D.; XIXUAN, X.; BLANCHETTE, R.A.; GEIGER, J.P.; OUELLETTE, G.B. Wood degradation by *Phellinus noxius*: ultrastructure and cytochemistry **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.41, n.3, p.253-265, 1995.

- NIERZWICKI-BAUER, S.A.; AULFINGER, H. Occurrence and ultrastructural characterization of bacteria in association with and isolated from *Azolla caroliniana*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.57, n.12, p.3629-3636, 1991.
- PETROVIC, O.; GANTAR, M.; BOKOROV, M. Scanning electron microscope investigation of activated sludge and activated carbon from a wastewater purification process. **Biological Wastes**, Barking, v.30, n.2, p.81-88, 1989.
- RAMOS, J.L.; DUQUE, E.; HUERTAS, M.J.; HAÏDOUR, A. Isolation and expansion of the catabolic potential of a *Pseudomonas putida* strain able to grow in the presence of high concentrations of aromatic hydrocarbons. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.177, n.14, p.3911-3916, 1995.
- RAVOAHANGIMALALA, O.; CHARLES, J.F.; SCHOELLER-RACCAUD, J. Immunological localization of *Bacillus thuringiensis* serovar israelensis toxins in midgut cells of intoxicated *Anopheles gambiae* larvae (Diptera: Culicidae). **Research in Microbiology**, New York, v.144, n.4, p.271-278, 1993.
- ROJAS, J.; GIERSIG, M.; TRIBUTSCH, H. Sulfur colloids as temporary energy reservoirs for *Thiobacillus ferrooxidans* during pyrite oxidation. **Archives of Microbiology**, Berlin, v.163, p.352-356, 1995.
- ROTHERMUND, C.; CAMPER, A.; WILDERER, P.A. Biofilms growing on gas permeable membranes. **Water Science and Technology**, New York, v.29, n.10-11, p.447-454, 1994.
- SCHUSSLER, A.; MOLLENHAUER, D.; SCHNEPF, E.; KLUGE, M. Geosiphon pyriforme, an endosymbiotic association of fungus and cyanobacteria: the spore structure resembles that of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. **Botanica Acta**, Stuttgart, v.107, n.1, p.36-45, 1994.
- SERRAJ, R.; FLEURAT, L.P.; JAILLARD, B.; DREVON, J.J. Structural changes in the inner-cortex cells of soybean root nodules are induced by short-term exposure to high salt or oxygen concentrations. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.18, n.4, p.455-462, 1995.
- SMITH, A.R.W.; ZAMZE, S.E.; HIGNETT, R.C. Morphology and hydrolytic activity of A7, a typing phage of *Pseudomonas syringae* pv. morsprunorum. **Microbiology**, New York, v.140, n.4, p.905-913, 1994.
- SOUZA, W. Citoquímica de carboidratos. In: SOUZA, W. **Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica: citoquímica estrutural**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1989. v.2, p.21-48.
- ST. LEGER, R.J.; GOEITEL, M.; ROBERTS, D.W.; STAPLES, R.C. Prepenetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisoplae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.58, n.2, p.168-179, 1991.
- TURNAU, K.; DEXHEIMER, J. Acid phosphatase activity in *Pisolithus arbutus* mycelium treated with cadmium dust. **Mycorrhiza**, v.5, n.3, p.205-211, 1995.
- VASSE, J.; DE BILLY, F.; CAMUT, S.; TRUCHET, G.; DE BILLY, F. Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.172, n.8, p.4295-4306, 1990.
- WARTMANN, T.; KRÜGER, A.; ADLER, K.; DUC, B.M.; KUNZE, I. Temperature-dependent dimorphism of the yeast *Arxula adenivorans* Ls3. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.68, n.3, p.215-223, 1995.
- WOLF, V.; LANGE, R.; WECKE, J. Development of quasi-multicellular bodies of *Treponema denticola*. **Archives of Microbiology**, v.160, n.3, p.206-213, 1993.
- ZELLNER, G.; DIEKMANN, H.; AUSTERMANN-HAUN, U.; SEYFRIED, C.F. Scanning electron microscopy of biofilm development in anaerobic fixed-bed reactors: influence of the inoculum. **Biotechnology Letters**, v.16, n.3, p.315-320, 1994.



PARTE III

BIOLOGIA MOLECULAR



BASE MOLECULAR DA INTERAÇÃO *RHIZOBIUM-LEGUMINOSA*

Maria José Valarini

Instituto de Zootecnia

Rua Heitor Penteado 56, CEP 13460-000, Nova Odessa, SP

INTRODUÇÃO

Um grande número de plantas dicotiledôneas, incluindo diferentes Famílias, estabelece associações simbióticas específicas com bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico (N_2). As associações melhor compreendidas incluem aquelas entre plantas da tribo Fabaceae e bactérias Gram-negativas da família Rhizobiaceae.

Tais bactérias, dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* (aqui referidas como *Rhizobium* ou rizóbios), são capazes de induzir a formação de estruturas típicas (nódulos) em raízes e caules de plantas da Família Leguminosae. Para estabelecer essa simbiose, são produzidos sinais anteriores à interação entre a planta e o rizóbio, provocando respostas discretas pelos dois simbiossiontes. Citam-se mais de 40 genes bacterianos (*nod*) envolvidos em nodulação nas diferentes espécies de rizóbios, cuja transcrição é ativada por sinais específicos da planta (flavonóides). Em retorno, transcritos dos genes *nod*, envolvidos na síntese de lipooligossacarídeos, induzem especificamente a organogênese dos nódulos em plantas.

A simbiose *Rhizobium*-leguminosa é, portanto, um atrativo sistema para entendimento da base molecular da especificidade hospedeira. Em biologia desenvolvimental, a formação do nódulo radicular oferece

também uma alternativa para a compreensão de paradigmas como florescimento, embriogênese e/ou formação do meristema vegetativo, bem como interações célula-célula e de diferentes vias de transcrição de sinais no desencadeamento morfogênico.

Este capítulo trata mais detalhadamente da base molecular gerética e biológica do reconhecimento, infecção e nodulação por *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* em leguminosas, como auxiliares no melhor entendimento dessa interação.

GENES BACTERIANOS DA NODULAÇÃO (*NOD*)

Análises genéticas de rizóbios possibilitaram a identificação de um conjunto de genes essenciais associados à nodulação, envolvidos com infecção, formação do nódulo e controle da especificidade hospedeira. Tais genes podem ser divididos em duas classes, a primeira incluindo aqueles envolvidos na formação de componentes da superfície celular da bactéria, como os genes determinantes da síntese de exopolissacarídeos (genes *lps*), polissacarídeos capsulares ou antígenos K e β -1,2-glucans (genes *ndv*) (Breedveld & Miller, 1994; Reuhs *et al.*, 1993; Becker *et al.*, 1993; Leigh & Coplin, 1992). Assim, é possível que os genes *exo* e *lps* estejam envolvidos na determinação da especificidade hospedeira, porém, não há evidência genética de que os constituintes de superfície da célula rizobiana sejam os principais determinantes dessa relação.

A segunda classe consiste de genes da nodulação (*nod* ou *nol*), alguns dos quais denominados *nod* comuns, por restituírem, quando transferidos, funções de nodulação entre diferentes espécies e biovares de rizóbios. Por outro lado, outros genes *nod* estão envolvidos na nodulação de um particular hospedeiro e por isso são chamados de genes da especificidade hospedeira (genes *hsn*) (Kondorosi *et al.*, 1984). Os genes *hsn* não são funcionalmente conservados entre as várias espécies de rizóbios.

Na maioria das espécies de *Rhizobium* estudadas, os genes *nod* estão localizados em grandes plasmídeos simbióticos (pSym), que carregam os genes da fixação de N_2 , *nif* e *fix*. Em *Rhizobium loti*, *Bradyrhizobium* spp. e *Azorhizobium* spp., os genes relacionados à simbiose estão localizados no cromossomo. Em geral, os genes *nod* são induzidos na presença da planta hospedeira, através de flavonóides secretados pela mesma, requerendo ainda participação de uma proteína ativadora transcricional, expressa pelo gene regulatório *nod D*.

O desenvolvimento do nódulo é, portanto, produto de uma troca de sinais entre os dois parceiros simbióticos, codificados pelos genes *nod*. Possíveis eventos de sinalização entre os rizóbios e seus hospedeiros estão sumarizados na Fig. 1.

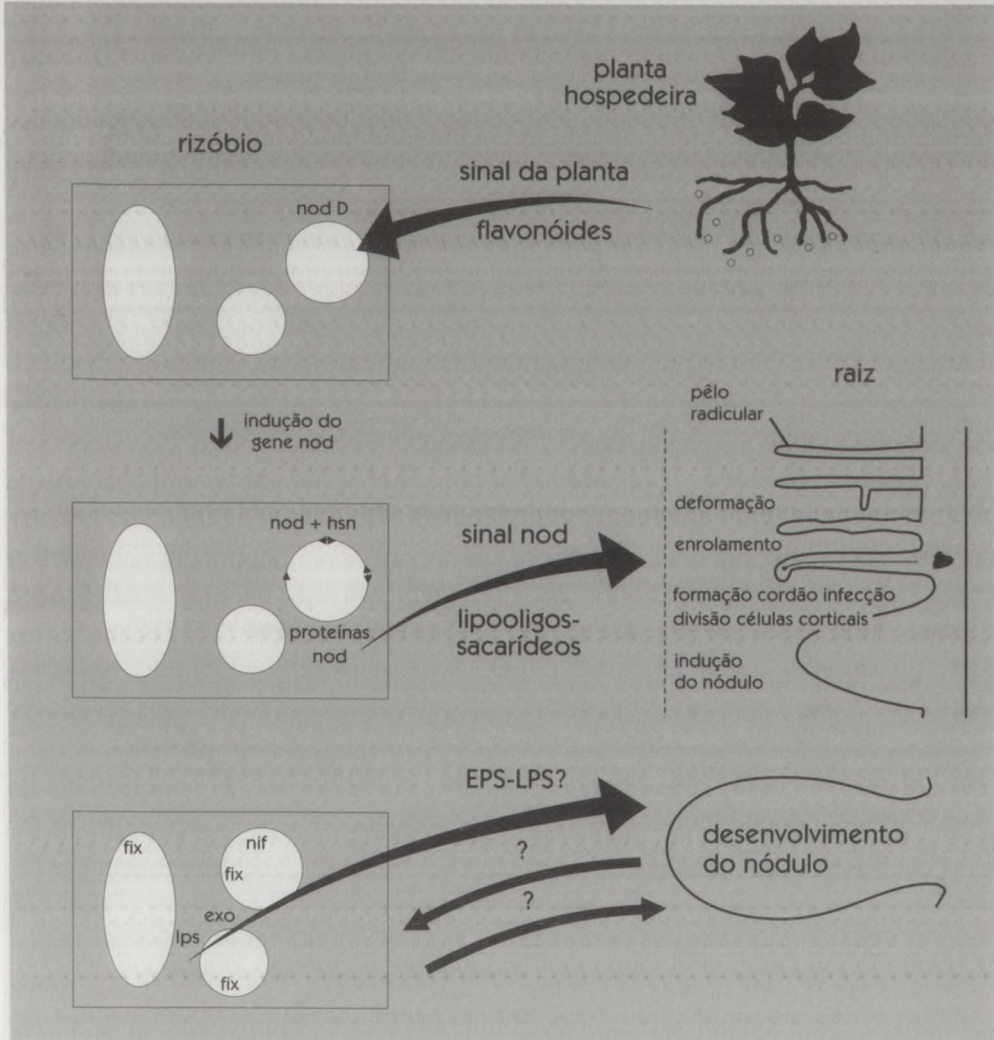


FIGURA 1. Possíveis eventos de sinalização entre rizóbios e planta. O sinal inicial da planta induz a expressão dos genes *nod* na bactéria, conjuntamente com a proteína ativadora Nod D, produzida constitutivamente. Tais moléculas são produtos do metabolismo fenilpropanoídico (flavonas e isoflavonas) vegetal. No rizóbio, os genes *nod* ativados produzem sinais identificados como lipooligosacarídeos, os quais provocam enrolamento do pêlo radicular e divisões das células meristemáticas. O nódulo é, então, desenvolvido e estabelecida a fixação de N_2 (adaptado de Kondorosi *et al.*, 1993).

GENES *NOD* ESTRUTURAIS

Genes *nod* Comuns

Os genes *nod* comuns (*nod* ABC) são assim denominados por terem sido encontrados em todos os isolados de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* até então estudados. Tais genes são estruturalmente conservados e funcionalmente transferíveis entre as espécies dos gêneros acima referidos, sem alteração do reconhecimento do hospedeiro original (Long, 1992; Kondorosi *et al.*, 1991). Para a maioria das espécies de *Rhizobium*, os genes *nod* ABC são parte de um único *operon* (Fig. 2). A inativação de um desses genes elimina a capacidade da bactéria induzir reações simbióticas na planta, incluindo enrolamento do pêlo radicular, formação do cordão de infecção, divisões celulares corticais (mitogênese) e formação do nódulo, independentemente do hospedeiro, da forma de infecção e do tipo e local de desenvolvimento do nódulo (Dénarié *et al.*, 1992; Hirsch, 1992).

Os genes *nod* IJ são, algumas vezes, incluídos como *nod* comuns por terem sido detectados em *R. leguminosarum* bv. *viceae* e bv. *trifolii*, *B. japonicum*, *R. etli* e *A. caulinodans*, e provavelmente em *R. meliloti* (Vasquez *et al.*, 1993, Jacobs *et al.*, 1985). Mutações em *nod* IJ nem sempre resultaram em efeitos detectáveis na nodulação das espécies citadas. Vasquez *et al.* (1993) propuseram que as proteínas expressas pelos genes *nod* I e *nod* J pertenceriam a um sistema de transporte de pequenas moléculas, através da membrana bacteriana interna.

Aos genes comuns *nod* ABC é atribuída a síntese do esqueleto da molécula, Fator Nod constituído de oligossacarídeos de N-acetilglucosaminas (Fig. 3). As proteínas Nod A, Nod B e Nod C, expressas pelo referido *operon*, constituem provavelmente as enzimas oligoquitina GLcN *N*-aciltransferase, oligoquitina GLcNAc de *N*-acilase e UDP-GLcNAc transferase, respectivamente (John *et al.*, 1994; Geremia *et al.*, 1994). A proteína Nod C, por exemplo, cuja seqüência de DNA é homóloga a regiões de várias quitina sintetases e celulose sintetases (Atkinson & Long, 1992; Debelle *et al.*, 1992), está envolvida na ligação de unidades de glucosamina para formar o esqueleto oligossacarídico. A hipótese de polimerização de N-acetil-glucosaminas é sustentada pelo fato da proteína Nod M apresentar seqüência homóloga à da glucosamina sintetase, expressa pelo gene *gln* e, portanto, envolvido na síntese de glucosaminas (Baev *et al.*, 1992), um óbvio precursor da estrutura básica do Fator Nod.

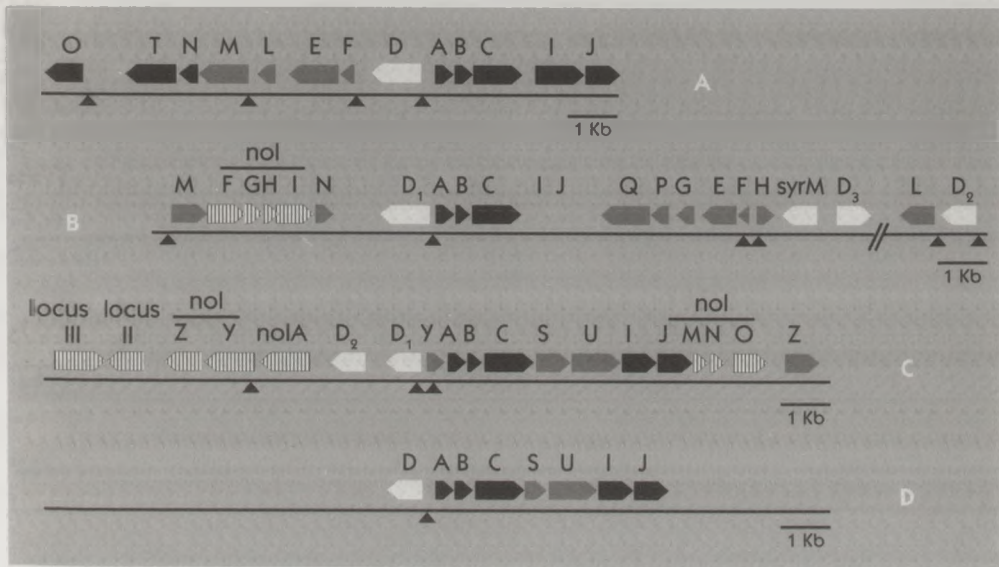


FIGURA 2. Organização genética dos genes *nod* em: A – *R. leguminosarum* bv. *viciae*; B – *R. meliloti*; C – *Bradyrhizobium japonicum*; D – *Azorhizobium caulinodans*. Os genes são apresentados como setas apontadas na direção da transcrição. Os genes *nod* comuns estão representados por setas pretas, os genes *nod* específicos por setas hachuradas e os genes *nod* D, por setas brancas. Os genes *nol* e outros loci *nod* não conhecidos estão indicados por setas pontilhadas. Os triângulos pretos mostram a posição das caixas *nod* (adaptado de van Rhijn & Vanderleyden, 1995 e Geelen *et al.*, 1993 para *A. caulinodans*).

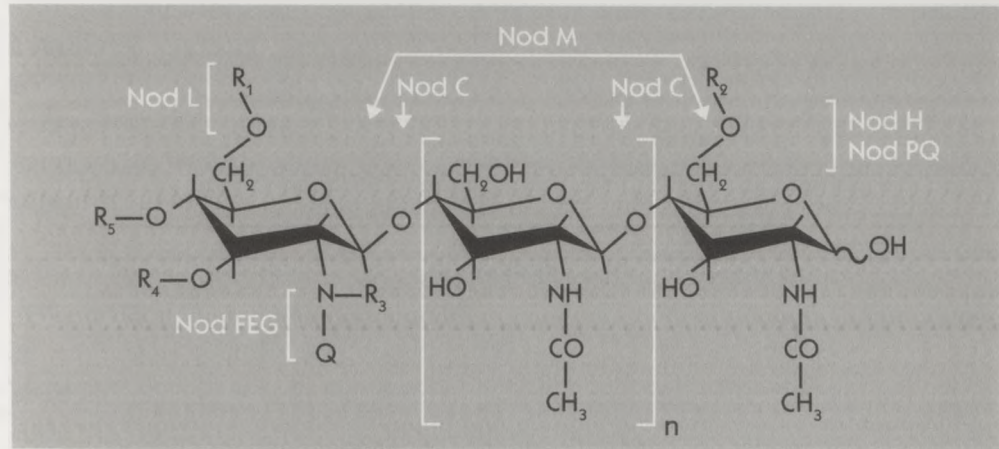


FIGURA 3. Estrutura generalizada do Fator Nod. O oligômero de quitina e a porção acil (Q) estão presentes em todos os metabólitos Nod. O número (n) de N-acetilglucosaminas pode variar. Q varia em comprimento e no número de ligações insaturadas. Diferentes substituições no esqueleto de açúcar (R₁ a R₅) podem ocorrer em função da espécie ou linhagem de *Rhizobium*. As possíveis funções dos produtos dos genes *nod* na síntese do Fator Nod são indicadas pelas setas.

No concernente à acilação do esqueleto de quitina, John *et al.* (1993) mostraram que, em *R. meliloti*, a proteína Nod B deacetila o resíduo não-redutor da molécula, permitindo N-acilação, etapa final da formação da referida estrutura básica, por ação do *nod A* (Atkinson *et al.*, 1994). É razoável assumir que, antes da ligação da correta cadeia acil-graxa ao final não-redutor da quitina, o grupo amino-N-acetil deve ser deacetilado.

A proteína Nod I apresenta seqüência homóloga a uma família de ATPases de transporte possivelmente envolvidas na secreção de lipooligosacarídeos, como foi também demonstrado para o "gene" *J*. Os genes *nod M* e *nod N* do *operon* descrito são requeridos, ainda, para a otimização da nodulação em alfafa (Baev *et al.*, 1992).

Genes *nod* Específicos

O reconhecimento dos parceiros simbióticos é um dos primeiros passos para a iniciação da associação *Rhizobium*-leguminosa. Os genes *nod* associados à especificidade hospedeira (*bsn*) são aqueles *loci* necessários para nodulação de uma planta em particular, nos diferentes gêneros de leguminosas. Tais genes não são funcional ou estruturalmente conservados entre as espécies de rizóbios e, portanto, suas mutações não podem ser totalmente complementadas por genes correspondentes de outros rizóbios. Em *R. meliloti*, mutantes *nod H⁺* infectam e nodulam ervilhaca mas falham em nodular alfafa, seu hospedeiro original. Mutantes *nod G⁻*, por outro lado, nodulam ambos, alfafa e ervilhaca (Faucher *et al.*, 1989). Em *R. leguminosarum* bv. *viceae* e bv. *trifolii*, os produtos de *nod EF* são os principais fatores de distinção da especificidade de nodulação; mutações nos referidos genes podem proporcionar capacidade de infecção em hospedeiros diversos em detrimento dos originais (Spaink *et al.*, 1989).

Similarmente, têm sido identificados diversos outros *loci* envolvidos com especificidade de nodulação, incluindo *nod SU*, *nod VW*, *nod Z*, *nol A*, *nol B*, *nol C*, entre outros (Stacey *et al.*, 1994; Krishmann & Pueppke, 1992; Götterfert *et al.*, 1990). Mutações em genes da bactéria envolvidos com reconhecimento da planta hospedeira resultam em alteração ou extensão de sua amplitude a nível de cultivares, sendo que tais genes são controlados de forma positiva ou negativa (van Rhijn & Vanderleyden, 1995).

A conversão do fator Nod comum para específico é promovida pela adição de vários substituintes na cadeia básica por ação de diversos

genes. Tais modificações ocorrem no resíduo terminal não-redutor GLcNAc, incluindo acetilação, carbamilação, N-metilação, N-acilação ou adição de grupos sulfato, principalmente (John *et al.*, 1994). Os principais genes envolvidos na determinação da especificidade de nodulação incluem os genes *nod G*, *nod H*, *nod E* e *nod L* (Ardourel *et al.*, 1994, Schultze *et al.*, 1992). O gene *nod O* teria uma função complementar, no que diz respeito ao crescimento do cordão de infecção, através do fluxo específico de íons na membrana (Sutton *et al.*, 1994).

GENES *NOD* REGULATÓRIOS

Genes *nod D*

A expressão dos genes *nod* estruturais dos rizóbios requer as presenças de um sinal da planta, geralmente flavonóides, e de uma proteína regulatória codificada pelo gene *nod D*. A proteína Nod D, constitutivamente expressa, liga-se a uma seqüência de DNA conservada à direita do *operon nod* induzível, denominada caixa *nod*. Na presença do sinal da planta (luteolina flavona, por exemplo), a proteína Nod D atua como um ativador transcricional. O sistema de regulação, através do gene *nod D*, está presente em todas as linhagens de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* analisadas até o momento, o que leva a considerá-lo como um gene *nod* comum. Entretanto, o número de cópias do referido gene presente nas células pode variar entre as espécies (van Rhijn *et al.*, 1993).

Os diferentes genes *nod D* são conservados ao nível nucleotídico e as proteínas expressas classificadas como membros da família de ativadores transcricionais, contendo resíduos de lisina (LysR). Tais proteínas requerem uma substância indutora para ativação e possuem uma suposta dobra da hélice na região amino, característica de DNA ligante (van Rhijn & Vanderleyden, 1995). A proteína Nod D provavelmente liga-se à região promotora da caixa *nod* na presença ou ausência de um indutor. Tal caixa *nod* foi originalmente definida em *R. meliloti* como uma seqüência de 47 pb, necessária para a indução do gene *nod*, cujo grau de conservação é menor em espécies geneticamente mais distantes como *A. caulinodans*. A presença de seqüências repetidas e invertidas em todas as caixas *nod* estudadas favorece a hipótese, algumas vezes questionada (Fisher & Long, 1993), de que a proteína Nod D liga-

se a esta na condição de multímero (Goethals *et al.*, 1992). A especificidade por flavonóides das diferentes proteínas Nod D ocorre ao nível da seqüência de aminoácidos, dependendo, assim, da estrutura terciária da proteína (McIver *et al.*, 1989). O sítio de interação entre Nod D e flavonóide possivelmente ocorre na membrana interna da célula bacteriana.

A ativação do gene *nod* para síntese de proteínas Nod D requer, com algumas exceções, a presença de compostos flavonóides ou derivados do metabolismo fenilpropanoídico existentes em exudatos da planta. Tal metabolismo é também conhecido por fornecer moléculas envolvidas na defesa da planta. Os flavonóides são liberados como agliconas ou glicosídicos conjugados (Van Rhijn & Vanderleyden, 1995). A natureza e quantidade de compostos exsudados dependem da planta e de seu estágio de desenvolvimento, sendo que, para algumas leguminosas, o espectro de flavonóides presentes em exudatos de sementes é diferente daquele presente em exudatos de raízes. Evidências genéticas mostram que diferentes proteínas Nod D apresentaram diferentes especificidades indutivas e, em conseqüência, influenciam a amplitude hospedeira de nodulação (McIver *et al.*, 1989; Spaink *et al.*, 1987)

Regulação pelo *nod D*

O número de genes *nod D* varia entre as espécies de rizóbios. Foi identificado um único gene em biovars de *R. leguminosarum* e em espécies de *Azorhizobium* e acima de cinco cópias em *R. tropici*, entre outras variações. Conseqüentemente, a inativação de um único gene *nod D* pode conferir fenótipo Nod⁻, dependendo da espécie ou do biovar. A significação dessas reiterações do *nod D*, em termos de controle de especificidade, não é clara, uma vez que não há correlação entre o número de cópias e a extensão da amplitude hospedeira, sugerindo que a proteína Nod D possa desempenhar outras funções, além da indução de tais genes. Os vários genes *nod D* também diferem em suas formas de regulação: em *R. leguminosarum* bv. *trifolii* e bv. *viceae*, o único gene *nod D* pode regular negativamente sua própria transcrição (Spaink *et al.*, 1987); em *B. japonicum*, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* e *R. fredii*, o gene *nod D1* é precedido pela seqüência da caixa *nod*. Para as duas primeiras espécies, o nível de transcrição de *nod D1* é aumentado na presença da proteína expressa e por certos flavonóides, independentemente de outros genes *nod* (Davis & Johnston, 1990;

Appelbaum *et al.*, 1988). Em *R. meliloti*, a expressão de *nod* D3 se processa de forma interativa e complexa.

Outro papel da proteína Nod D possivelmente associa-se com a regulação dos genes *nod* como uma função da concentração de nitrogênio combinado. Em diversas linhagens de *R. meliloti* tem sido identificado um repressor da expressão do gene *nod*, Nod R, porém, nenhuma função foi atribuída a essa proteína na espécie (Cren *et al.*, 1993). Em *A. caulinodans*, pelo menos três outras proteínas, menores que Nod D, ligam-se ao DNA da caixa *nod*, mas sem conhecimento de sua função (Goethals *et al.*, 1992).

Os genes *nod* induzíveis apresentam reduzida transcrição no estágio do bacteróide. Assim, suas expressões diminuem consideravelmente depois da liberação da bactéria, através do cordão de infecção, provavelmente devido a uma proteína repressora específica do bacteróide (Schlaman *et al.*, 1992).

Outros genes *nod* D regulatórios, tais como *nod* VW, *nol* A e *nol* C, entre outros, foram encontrados em espécies de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (Krishnan & Pueppke, 1991; Sadowsky *et al.*, 1991; Gottfert *et al.*, 1990). Estes autores verificaram, por análises histológicas da planta, que esses genes são expressos continuamente desde a pré-infecção até o estágio funcional de nódulo. Os referidos genes provavelmente respondem a estímulos químicos extracelulares e, após a transdução, podem regular positiva ou negativamente a transcrição de um ou mais genes *nod*.

FATORES NOD

Os rizóbios produzem e secretam fatores solúveis, em resposta aos flavonóides indutores excretados pelas plantas. Os genes *nod* são essenciais para este processo. A estrutura química de tais fatores de nodulação, também denominados Fatores Nod, tem sido freqüentemente estudada (John *et al.*, 1994; Price *et al.*, 1992; Lerouge *et al.*, 1990). Generalizadamente, esses fatores consistem de um esqueleto oligossacarídico de N-acetil-D-glucosaminas unidas por ligações β -1,4, com uma extensão de 3 a 5 unidades de açúcar. Um grupo de ácidos graxos estruturalmente variado é ligado ao grupo nitrogenado da extremidade não-redutora do açúcar aminado. A presença de outras substituições depende da linhagem ou espécie da bactéria.

ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS FATORES NOD

Os metabólitos Nod são considerados como as principais moléculas sinais de nodulação em *Rhizobium*, e capazes de induzir respostas iniciais da simbiose em planta. Tais lipooligossacarídeos atuam provocando deformações nos pêlos radiculares (Fig. 4) e indução de divisões das células corticais, como etapas iniciais da organogênese do nódulo de forma hospedeiro-específica (Relic *et al.*, 1993; Hirsch, 1992). Fatores Nod isolados induzem enrolamento do pêlo radicular mesmo na ausência da bactéria e, apesar de não promoverem formação de verdadeiros cordões de infecção, certos efeitos da presença dos lipooligossacarídeos (pré-cordão de infecção) sugerem envolvimento dos mesmos no processo de infecção.

A atividade dos Fatores Nod também pode ser determinada pela presença de enzimas de plantas envolvidas no metabolismo dos mesmos. Demonstra-se sua importância na determinação da especificidade hospedeira porque os Fatores Nod constituem substratos para quitinases de plantas e são inativados por elas em taxa dependente de suas modificações estruturais (Bulawa & Wasco, 1991).

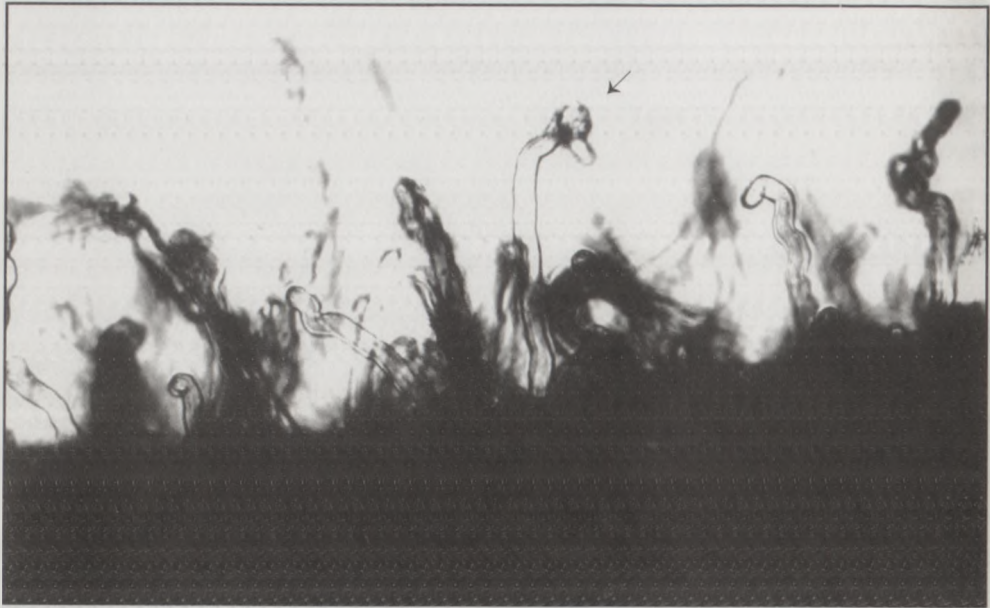


FIGURA 4. Deformações, por ação do Fator Nod, em pêlos absorventes de raiz de *Centrosema pubescens* inoculada com *Bradyrhizobium* sp. A seta indica ocorrência de enrolamento típico do pêlo para captura das células do rizóbio (Valarini & Fellay, 1995).

GENES ENVOLVIDOS NA FIXAÇÃO DE N₂ (NIF)

A nitrogenase, complexo enzimático responsável pela fixação de nitrogênio elementar (N₂), é constituída por duas subunidades protéicas: uma contendo ferro e molibdênio e outra somente ferro. Tais componentes são apresentados como subunidades I e II, respectivamente, e constituem a parte estrutural do referido complexo enzimático. Devido à similaridade estrutural e de regulação da bactéria diazotrófica *Klebsiella pneumoniae*, esta tem sido utilizada como sistema modelo para descrição dos genes da fixação de N₂ (*nif*).

Genes *nif* referem-se, então, às seqüências genéticas especificamente envolvidas no processo da fixação de N₂. Inúmeros deles já foram descritos, sendo que os produtos dos genes *nif A* e *nif L* atuam controlando os *operons* de todos os outros genes *nif* (Roberts *et al.*, 1978). Enquanto os produtos de *nif A* são ativadores positivos da transcrição dos *operons nif*, o produto do *nif L* está envolvido no controle negativo.

As subunidades MoFe-protéicas da nitrogenase são agrupadas aos produtos dos genes *nif K* e *nif D*. Um cofator FeMo requerido para ativação da MoFe-proteína está associado aos genes *nif B*, *V*, *N* e *E*. A subunidade Fe-protéica é expressa pelo gene *nif H* (Ugalde *et al.*, 1985).

Em *K. pneumoniae* e outros diazotróficos de vida livre, a presença de NH₃ induz ação negativa do produto do gene *nif L*, inibindo a função ativadora do *nif A*. Este constitui-se de um mecanismo útil de controle, através do qual tais bactérias poupam energia para fixação de N₂ quando NH₃ está em abundância. O controle pelo nitrogênio deve regular a ação de diversas enzimas capazes de produzir amônia e outras como glutamino sintetase. Três genes (*ntr*) devem estar envolvidos na repressão pela amônia: *ntr A*, *ntr B* e *ntr C* (Kennedy, 1989). O produto de *ntr C*, juntamente com o produto de *ntr A*, constitui um ativador geral de todos os *operons* sob controle do nitrogênio. Juntos, eles ativam o promotor do gene da glutamino sintetase (*gln A*), *nif A* e *nif L*. Estes dois últimos genes ativam os promotores dos genes *nif*. Na presença de amônia, o produto de *ntr B* impede a ativação por outros genes controlados pelo nitrogênio (McCardel *et al.*, 1993). O controle pelo nitrogênio e ação do *nif L* não deve atuar dessa mesma forma em espécies de rizóbios que fixam N₂ para fornecer ao hospedeiro antes que para seu próprio consumo (Ditta, 1989).

Os genes *fix* devem também envolver-se na fixação de N₂ atmosférico, não apresentando, contudo, homologia com os genes de *K. pneumoniae*. Especula-se que estejam envolvidos no desenvolvimento e/ou manutenção da função do bacteróide.

DISCUSSÃO

O estabelecimento da simbiose entre *Rhizobium* e planta é o resultado de uma variedade de comunicações entre os simbiontes por meio de sinais bioquímicos. Estudos genéticos e citológicos vêm propondo um modelo para a função dos genes *nod*: os comuns, *nod* ABC, determinam a produção de precursores dos Fatores Nod, e os *nod* específicos modificam esses metabólitos, transformando-os em sinais extracelulares específicos. Essas modificações constituem, então, a estratégia molecular da especificidade, e através delas *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* reconhecem seus hospedeiros.

Se a base molecular bacteriana da especificidade hospedeira começa a ser compreendida, os mecanismos pelos quais a planta reconhece esses sinais são desconhecidos. Provavelmente, receptores estão envolvidos no reconhecimento e amplificação desses sinais em ambas as extremidades substituintes da molécula. Contudo, os resultados das pesquisas sugerem que o reconhecimento pelo Fator Nod é um processo complexo de respostas ao nível de membrana nos pêlos radiculares com o envolvimento de hormônios endógenos da planta. A biologia molecular vegetal vem se constituindo como nova ferramenta para o estudo dos genes especificamente expressos no estágio nodular, o que auxiliará na melhor compreensão da simbiose *Rhizobium*-leguminosa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APPELBAUM, E.R.; THOMPSON, D.V.; IDLER, K.; CHARTRAIN, N. *Bradyrhizobium japonicum* USDA 151 has two *nod D* genes that differ in primary structure and function. **Journal of Bacteriology**. Baltimore, v.170, p.12-20. 1988.
- ARDOUREL, M.; DEMONT, N.; DEBELLÉ, F.; MAILLET, F.; BILLY, F. DE; PROMÉ, J.C.; DÉNARIÉ, J.; TRUCHET, G. *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide nodulation factors: different structural requirements for bacterial entry into target root hair cells and induction of plant symbiotic developmental responses. **The Plant Cell**. Rockville, v.6, p.1357-1374, 1994.
- ATKINSON, E.M.; LONG, S.R. Homology of *Rhizobium meliloti* *Nod C* to polysaccharide polymerizing enzymes. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. St. Paul, v.5, p.439-442, 1992.

- ATKINSON, E.M.; PALCIC, M.M.; HINDSGAUL, O.; LONG, S.R. Biosynthesis of *Rhizobium meliloti* lipopolysaccharide Nod factors: Nod A is required for an N-acyltransferase. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**. Washington, v.91, p.8418-8422, 1994.
- BAEV, N.; SCHULTZE, M.; BARLIER, I.; HA, D.C.; VIRELIZIER, H.; KONDOROSI, E.; KONDOROSI, A. *Rhizobium nod M* and *nod N* genes are common *nod* genes: *nod M* encodes functions for efficiency of Nod signal production and bacteroid maturation. **Journal of Bacteriology**. Baltimore, v.174, p.7555-7565, 1992.
- BECKER, A.; KLEICKMANN, A.; KELLER, M.; ARNOLD, W.; PÜHLER, A. Identification and analysis of the *Rhizobium meliloti* "exo" AMONP genes involved in exopolysaccharide biosynthesis and mapping of promoters located on the "exo" HKLamonp fragment. **Molecular General Genetics**. Berlin, v.241, p.367-379, 1993.
- BREDVELD, M.W.; MILLER, K.J. Cyclic β -glucans of members of the family of Rhizobiaceae. **Microbiological Reviews**. Washington, v.58, p.145-161, 1994.
- BULAWA, C.E.; WASCO, C. Chitin and nodulation. **Nature**. London, v.353, p.710, 1991.
- CREN, M.; KONDOROSI, A.; KONDOROSI, E. An insertional point mutation inactivates Nod R repressor in *Rhizobium meliloti* 1021. **Journal of Bacteriology**. Baltimore, v.176, p.518-519, 1993.
- DAVIS, E.O.; JOHNSTON, A.W.B. Regulatory functions of the 3 *nod D* genes of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. **Molecular Microbiology**. Oxford, v.4, p.933-941, 1990.
- DEBELLÉ, F.C.; ROSENBERG, C.; DÉNARIÉ, J. The *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* Nod C proteins are homologous to yeast chitin synthases. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. St. Paul, v.5, p.443-446, 1992.
- DÉNARIÉ, J.; DEBELLÉ, F.; ROSENBERG, C. Signalling and host range variation in nodulation. **Annual Review Microbiology**. Palo Alto, v.46, p.497-531, 1992.
- DITTA, G. Regulation of *nif* genes in *Rhizobium*. In: KOSUGE, T.; NESTER, E.W., ed **Plant-microbe interactions**. New York: McGraw-Hill, 1989. v.3, p.11-24.
- FAUCHER, C.; CAMUT, H.; DÉNARIÉ, J.; TRUCHET, G. The *nod H* and *nod G* host range genes of *Rhizobium meliloti* behave as avirulence genes in *R. leguminosarum* bv. *viceae* and determine changes in the production of plant-specific extracellular signals. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. St. Paul, v.2, p.291-300, 1989.
- FISHER, R.F.; LONG, S.R. Interactions of Nod D at the *nod* box: Nod D binds to two distinct sites on the same face of the helix and induces a bend in the DNA. **Journal of Molecular Biology**. London, v.233, p.336-348, 1993.
- GELEN, D.; MERGAERT, P.; GEREMIA, R.A.; GOORMACHTING, S.; VAN MONTAGU, M.; HOLSTERS, M. Identification of *nod SUJ* genes on Nod locus I of *Azorhizobium caulinodans*: evidence that *nod S* encodes a methyltransferase involved in Nod factor modifications. **Molecular Microbiology**. Oxford, v.9, p.145-154, 1993.
- GEREMIA, R.A.; MERGAERT, P.; GELEN, D.; VAN MONTAGU, M.; HOLSTERS, M. The Nod C protein of *Azorhizobium caulinodans* is an N-acetylglucosaminyltransferase. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**. Washington, v.91, p.2669-2673, 1994.
- GOETHALS, K.; VAN MONTAGU, M.; HOLSTERS, M. Conserved motifs in a divergent *nod* box of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 reveal a common structure in promoters regulated by LysR-type proteins. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**. Washington, v.89, p.1646-1650, 1992.
- GÖTTFERT, M.; HITZ, S.; HENNECKE, H. Identification of *nod S* and *nod U*, two inducible genes inserted between the *Bradyrhizobium japonicum nod ABC* and *nod IJ* genes. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. St. Paul, v.5, p.308-316, 1990.
- HIRSCH, A.M. Tansley review n.40: developmental biology of legume nodulation. **New Phytologist**. Cambridge, v.122, p.211-237, 1992.
- JACOBS, T.W.; EGELHOFF, T.T.; LONG, S.R. Physical and genetic map of a *Rhizobium meliloti* gene region and nucleotide sequence of *nod C*. **Journal of Bacteriology**. Baltimore, v.162, p.469-476, 1985.
- JOHN, M.; RÖHRIG, H.; SCHMIDT, J.; WIENEKE, U.; SCHELL, J. *Rhizobium* Nod B protein involved in nodulation signal synthesis is a chitoooligosaccharide de acetylase. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**. Washington, v.90, p.625-629, 1993.
- KENNEDY, C. The genetics of nitrogen fixation. In: HOPWOOD, D.A.; CHATER, K.E., ed. **Genetics of bacterial diversity**. New York: Academic Press, 1989. p.107-127.
- KONDOROSI, E.; BANFALVI, Z.; KONDOROSI, A. Physical and genetic analysis of a symbiotic region of *Rhizobium meliloti*: identification of nodulation genes. **Molecular General Genetics**. Berlin, v.193, p.445-452, 1984.
- KONDOROSI, A.; KONDOROSI, E.; JOHN, M.; SCHMIDT, J.; SCHELL, J. The role of nodulation genes in bacterium-plant communication. In: SETLOW, J.K., ed **Genetic engineering**. New York: Plenum Press, 1991. v.13, p.115-136.

- KONDOROSI, A.; SCHULTZE, M.; HOFFMANN, B.; KONCZ, C.; BÖGRE, L.; CREN, M.; DUSHA, I.; DUDITS, D.; KONDOROSI, E. Molecular basis of legume-*Rhizobium* interactions: potentials for improving symbiotic nitrogen fixation. In: BAKER, M.J., ed. **Grasslands for our world**. Wellington: SIR Publishing, 1993. p.381-384.
- KRISHMAN, H.B.; PUEPPKE, S.G. *Nol C* a *Rhizobium fredii* gene involved in cultivar specific nodulation of soybean, shares homology with a heat-shock gene. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.5, p.737-745, 1991.
- KRISHMAN, H.B.; PUEPPKE, S.G. Inactivation of *nol C* conditions developmental abnormalities in nodulation of Peking soybean by *Rhizobium fredii* USDA257. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v.5, p.14-21, 1992.
- LEIGH, J.A.; COPLIN, D.L. Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. **Annual Review Microbiology**, Palo Alto, v.46, p.307-346, 1992.
- LEROUGE, P.; ROCHE, P.; FAUCHER, C.; MAILLET, F.; TRUCHET, G.; PROMÉ, J.C.; DÉNARIÉ, J. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by sulphated and acylatedglucosamine oligosaccharide. **Nature**, London, v.344, p.781-784, 1990.
- LONG, S.R. Genetic analysis of *Rhizobium* nodulation. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J. ed. **Biological nitrogen fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992. p.560-597.
- McCARDELL, A.; SADOWSKY, M.J.; CREGAN, P.B. Genetics and improvement of biological nitrogen fixation. In: METTING JR., F.B., ed. **Soil microbial ecology**: applications in agricultural and environmental management. New York: Marcel Dekker, 1993. p.151-175.
- MCLVER, J.; DJORDJEVIC, M.A.; WEINMAN, J.J.; BENDER, G.L.; ROLFE, B.G. Extension of host range of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* caused by point mutations in *nod D* that result in alterations in regulatory function and recognition of inducer molecules. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v.2, p.97-106, 1989.
- PRICE, N.P.; RELIC, B.; TALMONT, F.; LEWIN, A.; PROMÉ, D.; PUEPPKE, S.G.; MAILLET, F.; DÉNARIÉ, J.; PROMÉ, J.C.; BROUGHTON, W.J. Broad-host-range *Rhizobium* species strain NGR 234 secretes a family of carbamoylated, and fucosylated, nodulation signals that are O-acetylated or sulphated. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.6, p.3575-3584, 1992.
- RELIC, B.; FELLAY, R.; LEWIN, A.; PERRET, X.; PRICE, N.P.J.; ROCHEPEAU, P.; BROUGHTON, W.J. *Nod* genes and *Nod* factors of *Rhizobium* species NGR234. In: PALACIOS, R.; MORA, J.; NEWTON, W. E. ed. **New horizons in nitrogen fixation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993. p.183-190.
- REUHS, B.L.; CARLSON, R.W.; KIM, J.S. *Rhizobium fredii* and *Rhizobium meliloti* produce b-deoxy-D-mannose-2-octulosonic acid containing polysaccharides that are structurally analogous to group-II-K-antigens (capsular polysaccharides) found in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.175, p.3570-3580, 1993.
- ROBERTS, G.P.; MACNEIL, T.; MACNEIL, D.; BRILL, W.J. Regulation and characterization of protein products coded by *nif* (nitrogen-fixation) genes of *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.136, p.267-279, 1978.
- SADOWSKY, M.J.; CREGAN, P.B.; GOTTFERT, M.; SHARMA, A.; GERHOLD, D.; RODRIGUEZ-QUINONES, F.; KEYSER, H.H.; HENNECKE, H. STACEY, G. The *Bradyrhizobium japonicum nol A* gene and its involvement in the genotype-specific nodulation of soybean. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**. Washington, v.88, p.637-641, 1991.
- SCHLAMMAN, H.R.M.; OKKER, R.J.H.; LUGTENBERG, B.J.J. Regulation of nodulation genes expression by *Nod D* in rhizobia. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.174, p.5177-5182, 1992.
- SCHULTZE, M.; QUICLET-SIRE, B.; KONDOROSI, E.; VIRELIZIER, H.; GLUSHKA, J.N.; ENDRE, G.; GÉRO, S.D.; KONDOROSI, A. *Rhizobium meliloti* produces a family of sulfated lipo-oligosaccharides exhibiting different degrees of plant host specificity. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v.89, p.192-196, 1992.
- SPAINK, H.P.; WIJFFELMAN, C.A.; PEES, E.; OKKER, R.J.H.; LUGTENBERG, B.I.J. Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.9, p.27-39, 1987.
- SPAINK, H.P.; WEINMAN, J.; DJORDJEVIC, M.A.; WIJFFELMAN, C.A.; OKKER, J.H.; LUGTENBERG, B.J.J. Genetic analysis and cellular localization of the *Rhizobium* host specificity-determining *Nod E* protein. **EMBO Journal**, Oxford, v.8, p.2811-2818, 1989.
- STACEY, G.; LUKA, S.; SANJUAN, J.; BANFALVI, Z.; NIEUWKOOP, A.J.; CHUN, J.Y.; FORSBERG, L.S.; CARLSON, R. *Nod Z*, a unique host-specific nodulation genes, is involved in the fucosylation of the lipo-oligosaccharide signal of *Bradyrhizobium japonicum*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.176, p.620-633, 1994.

- SUTTON, M.J.; LEA, E.J.A.; DOWNIE, J.A. The nodulation signaling protein Nod O from *Rhizobium leguminosarum* biovar *viceae* forms ion channels in membranes. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v.91, p.9990-9994, 1994.
- UGALDE, R.A.; IMPERIAL, J.; SHAH, V.K.; BRILL, W.J. Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor and the molybdenum cofactor in *Klebsiella pneumoniae*. effect of the sulfur source. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.164, p.1081-1087, 1985.
- VALARINI, M.J.; FELLAY, R. *Nod ABC* in *Bradyrhizobium* sp.: detection and *in vivo* expression. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS - The Role of Biological Nitrogen Fixation, Angra dos reis, 1995. **Resumos**. Angra dos Reis, 1995. p.136-137.
- VAN RHIJN, P.J.S.; FEYS, B.; VERRETH, C.; VANDERLEYDEN, J. Multiple copies of *nod D* in *Rhizobium tropici* CIAT 899 and BR816. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.175, p.438-447, 1993.
- VAN RHIJN, P.; VANDERLEYDEN, J. The *Rhizobium*-plant symbiosis. **Microbiological Reviews**, Washington, v.59, p.124-142, 1995.
- VÁSQUEZ, M.; SANTANA, O.; QUINTO, C. The NodI and NodJ proteins from *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* strains are similar to capsular polysaccharide secretion proteins from gram-negative bacteria. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.8, p.369-377, 1993.



13

BIOLOGIA MOLECULAR DE *STREPTOMYCES* E APLICAÇÕES INDUSTRIAIS

Gabriel Padilha

Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo
Cidade Universitária, Caixa Postal 66208, CEP 05508-900, São Paulo, SP

INTRODUÇÃO

Streptomyces são bactérias do solo, Gram-positivas, aeróbias estritas, com um ciclo de vida complexo, alternando a formação de esporos e micélio. O ciclo inicia-se com a germinação do esporo, dando origem a um micélio, formado por hifas ramificadas que penetram no substrato, metabolizando fontes orgânicas pela ação de enzimas extracelulares como polissacarídeos (amido, pectina, quitina, celulose), proteínas (queratina, elastina), lipídeos e compostos aromáticos. A partir deste micélio vegetativo (hifas primárias), desenvolve-se o micélio aéreo (hifas aéreas) no centro da colônia. As hifas podem apresentar-se multinucleadas ou em compartimentos mononucleados, que darão origem a cadeias de esporos (Fig. 1). Nesta fase, ativa-se o metabolismo secundário, em que são produzidos principalmente antibióticos e pigmentos (Chater, 1993).

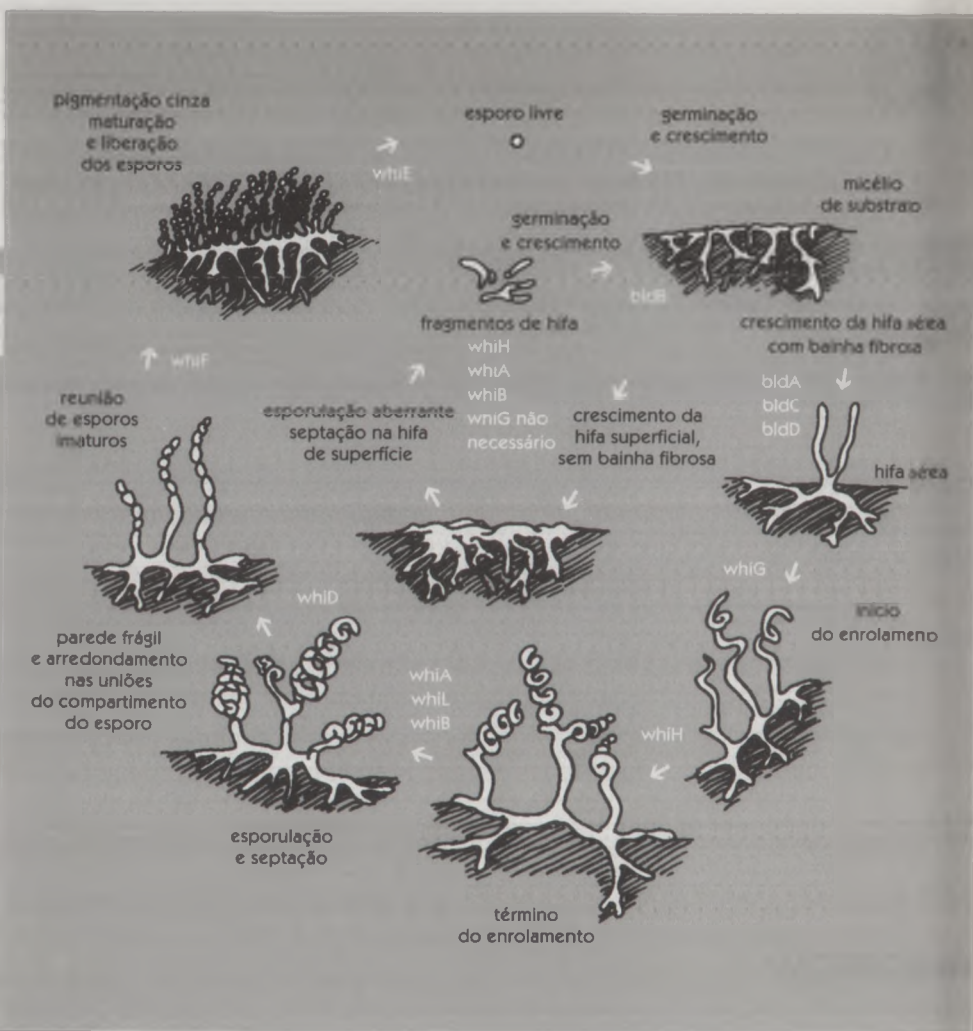


FIGURA 1. Ciclo biológico de *Streptomyces* (Chater, 1993).

Streptomyces possuem um alto conteúdo de G+C no genoma, entre 68 e 73%, observado também em seus plasmídeos e actinofagos (Glalek & Zakrsewska, 1984; Hutter & Eckhardt, 1988). Seu genoma pode variar de 6.500 a 8.200 kb (Leblond *et al.*, 1990; Kieser *et al.*, 1992), ou seja, é cerca de 2 vezes maior que o genoma de *Escherichia coli*. Foi descoberto que o cromossomo de muitas espécies de *Streptomyces* são moléculas de DNA lineares, com extremos terminais invertidos repetidos e proteínas aderidas covalentemente ao extremo terminal 5' do cromossomo, onde podem atuar como "primers" da replicação (Lin *et al.*, 1993).

Têm sido detectados plasmídeos naturais, circulares e lineares, com tamanhos entre 2 e 500 kb, responsáveis por funções como conjugação, resistência e biossíntese de alguns antibióticos (Kinashi *et al.*, 1987; Gravius *et al.*, 1994).

O gênero *Streptomyces* tem grande importância industrial, pela variada produção de metabólitos secundários, respondendo por 70% dos antibióticos conhecidos (Tabela 1). A produção de antibióticos está diretamente relacionada ao ciclo celular, que sofre influência de fatores, como variações nutricionais e fatores de regulação (substâncias de baixo peso molecular, que desempenham um papel direto na diferenciação). Entre estas moléculas, a mais estudada tem sido o fator A, que é um fator auto-regulador ou "hormônio microbiano", que controla o metabolismo secundário e a diferenciação celular em *S. griseus*. Sua ação é exercida pela união a um receptor específico, que regula a diferenciação morfológica e fisiológica (Horinouchi & Beppu, 1994). A produção de antibióticos é cepa específica e não espécie específica.

Os processos de diferenciação e produção de antibióticos têm sido amplamente estudados em *S. coelicolor* A3(2) (Kieser & Hopwood, 1991; Hodgson, 1991). Informações sobre linhagens industriais, embora muito investigadas, permanecem como segredo industrial. Um fenômeno frequente no gênero é a instabilidade genética, que pode levar à degeneração de cepas produtoras. Além disso, características como formação de micélio aéreo, esporulação, produção e resistência a antibióticos, biossíntese de aminoácidos e secreção, podem também ser afetadas. A taxa de mutação pode variar de 0,1% a 25% por esporo, sendo esta devida à ocorrência de rearranjos no DNA, como ampliações ou deleções no genoma que atingem várias centenas de cópias chamadas "unidades de amplificação do DNA" (AUD = *amplifiable units of DNA*) com dimensões de 3 a 100 kb (Cullum *et al.*, 1991; Fishman & Hersberg, 1983). Existem dois tipos de AUD: Tipo I – são cópias simples, delimitadas por repetições curtas e ampliações não reproduzíveis; Tipo II – são delimitadas por longas repetições diretas, ou encontram-se duplicadas no cromossomo e suas ampliações são reproduzíveis (Hutter & Eckhardt, 1988). Essas ampliações podem ser acompanhadas de uma alta frequência de perdas ou deleções cromossômicas. As deleções no cromossomo podem atingir até 2.000 kb. Esses fenômenos são induzidos pelo tratamento com brometo de etídio, exposição ao UV, choque térmico ou simples espontaneidade. A instabilidade genética em *S. lividans* pode seguir este mo-

TABELA 1. Alguns dos principais antibióticos produzidos por *Streptomyces*.

PRODUTOR	ANTIBIÓTICO
<i>S. alboniger</i>	Puromicina
<i>S. ambofaciens</i>	Espiramicina
<i>S. aureofaciens</i>	Tetraciclina
<i>S. avermitilis</i>	Avermictina
<i>S. azureus</i>	Tiostrepton
<i>S. clavuligerus</i>	Cefamicina C
<i>S. coelicolor</i>	Actinorodina
<i>S. fradiae</i>	Tilosina
<i>S. galileus</i>	Aclacinomicina A
<i>S. glaucescens</i>	Tetracenomicina
<i>S. griseus</i>	Estreptomina
<i>S. hygrosopicus</i>	Bialafos
<i>S. peuceticus</i>	Daunorubicina
<i>S. rimosus</i>	Oxitetraciclina
<i>S. thermotolerans</i>	Carbomicina
<i>S. venezuelae</i>	Cloranfenicol
<i>S. violaceoruber</i>	Granacitina
<i>S. viridochromogenes</i>	Bialafos

delo: um evento inicial pode desestabilizar um ou ambos os extremos do cromossomo linear; essa desestabilização é precedida por deleções progressivas em direção a regiões essenciais do cromossomo. Os efeitos destruidores das deleções, que chegam a atingir até 25% do genoma, podem ser contornados pela célula, seja por uma amplificação, que atuaria como um tampão contra a deleção, ou pela circularização do cromossomo que, dessa forma, evitaria que regiões essenciais do cromossomo fossem atingidas (Redenbach *et al.*, 1994).

As vias metabólicas afetadas pela instabilidade genética são, em geral, comuns a todos os mutantes, o que significa que regiões específicas do cromossomo são alvos preferenciais do fenômeno de instabilidade. Foi observado que regiões instáveis encontram-se em ambos os extremos terminais do cromossomo em *S. lividans* e *S. coelicolor* A3(2) (Lin

et al., 1993; Kieser *et al.*, 1992; Redenbach *et al.*, 1993). Alguns caracteres são controlados por genes reguladores pleiotrópicos, como o gene *afs* A, que afeta a produção e resistência à estreptomicina, assim como a produção de esporos. Várias hipóteses tentam explicar o fenômeno, como, por exemplo, a estabilidade do complexo DNA-replisoma pode ser atingida pelas condições de crescimento, que afetam o ritmo replicativo (tratamento com agentes intercalantes, germinação do esporo, crescimento após descongelamento), resultando em erros na replicação do DNA. Isso pode acontecer em regiões palindrômicas ou em curtas seqüências repetidas, freqüentes num genoma com alto G+C (Leblond *et al.*, 1990).

SISTEMAS DE MANIPULAÇÃO GENÉTICA DE *STREPTOMYCES*

Um número bastante grande de plasmídeos endógenos e fagos está presente em muitas linhagens de *Streptomyces*. Vários plasmídeos de alto e baixo número de cópias, assim como plasmídeos de alto e baixo peso molecular, têm sido caracterizados. Plasmídeos conjugativos (plasmídeos sexuais), tais como pIJ101, pSA1.1, pSAM2 e pSN22, são fenotipicamente detectados pela formação de zonas de inibição de crescimento (*pocks*), quando as linhagens portadoras destes são crescidas em meio sólido junto com linhagens livres de plasmídeo. A transferência de plasmídeo é associada com a formação do *pock*.

Micélio ou esporos de *S. azureus* ATCC 14921, hospedeiro do plasmídeo pSA1.1, produz *pocks* em micélio livre de esporos com uma freqüência de 100%. Este plasmídeo também inibe a esporulação do micélio do hospedeiro. Análise por deleção de plasmídeos derivados de pSA1.1 indicou que a região inibitória da esporulação está situada num fragmento AatI-SmaI de 1.5 kb, onde foi localizado o gene da inibição da esporulação (*spi*) (Miyoshi *et al.*, 1986; Doi *et al.*, 1995).

Os primeiros vetores de clonagem construídos combinaram fragmentos dos plasmídeos pIJ101 (Kieser *et al.*, 1982), ou SLP1.2 (Bibb *et al.*, 1981) ou SCP2* (Bibb *et al.*, 1982) com genes de resistência a antibióticos isolados de estreptomicetes produtores de antibióticos (Bibb *et al.*, 1980; Thompson *et al.*, 1980; 1982a,b). Desta forma, os genes para neomicina fosfotransferase de *S. fradiae* (*aphI*), viomicina fosfotransferase de *S. vinaceus* (*vph*) e a metilase ribossomal 23S rRNA, que determina a

resistência a tiostrepton de *S. azureus*, foram amplamente utilizados com sucesso. Posteriormente, foi incluída uma marca de grande utilidade: o gene da tirosinase (*mel*), que gera colônias marrons (Katz *et al.*, 1983). Além dos marcadores de *Streptomyces*, vários marcadores de *E. coli* têm sido usados como os genes de resistência de Tn5 à neomicina (*aphII*), bleomicina (*ble*), gene de resistência de Tn1696 à gentamicina (*aacC1*) (Hopwood *et al.*, 1985a; Wohlleben *et al.*, 1989).

Muitos genes de *Streptomyces* foram clonados no vetor pIJ702 (Fig. 2). Transformantes são selecionados em meio com tiostrepton. O fragmento clonado inativa o operon *mel*, tornando brancas as colônias que podem ser facilmente identificadas entre as colônias marrons com o vetor original. Devido ao fenômeno de restrição presente em *Streptomyces*, o DNA de plasmídeos heterólogos apresenta dificuldades para ser introduzido e expresso em *Streptomyces*. Mutantes deficientes em restrição de *S. fradiae* foram obtidos, e além disso, DNA isolado de um mutante de *E. coli*, deficiente à modificação, foi usado para transformar com sucesso *S. avermitilis* (MacNeil, 1988). Plasmídeos podem integrar-se em sítios específicos do cromossomo. Vetores de grande utilidade têm sido desenvolvidos a partir de SLP1 de *S. coelicolor* A3(2) (Bbb *et al.*, 1981) e pSAM2 de *S. ambofaciens* (Pernodet *et al.*, 1984). A integração acontece via recombinação entre o sítio *att P* no plasmídeo e o sítio *att B* no cromossomo. Os sítios *att B* estão localizados no gene *tRNA^{tyr}*, no caso de SLP1 (Omer & Cohen, 1984) e *tRNA^{pro}*, no caso de pSAM2 (Mazodier *et al.*, 1990), que funciona também em *Mycobacteria* (Martin *et al.*, 1991). Vetores de integração e mobilizáveis *E. coli-Streptomyces* têm sido construídos a partir de pSAM2 (Kuhstoss *et al.*, 1989; Smokvina *et al.*, 1990). *S. lividans* tem sido usado como hospedeiro, tanto para clonagem e expressão de genes homólogos como heterólogos de proteínas e de genes de resistência, já que apresenta uma fraca barreira de restrição e é um bom secretor (Tabela 2).

Vetores contendo o gene da catecol dioxigenase (*xylE*), como fragmento de expressão (promotor negativo), têm sido usados nos estudos da biossíntese de actinorodina de *S. coelicolor* (Bruton *et al.*, 1991). Plasmídeos híbridos contendo o replicon de *Streptomyces* e os extremos coesivos (*cos*-site) dos actinofagos R4 ou fC31, ou a região que inclui a origem do empacotamento da capsídeo de FP43 (*pac*-site), têm sido construídos (Hahn *et al.*, 1991). Esses plasmídeos foram empacotados eficientemente *in vivo* em partículas de R4, fC31 ou FP43. Podem ser usados como fagos media-

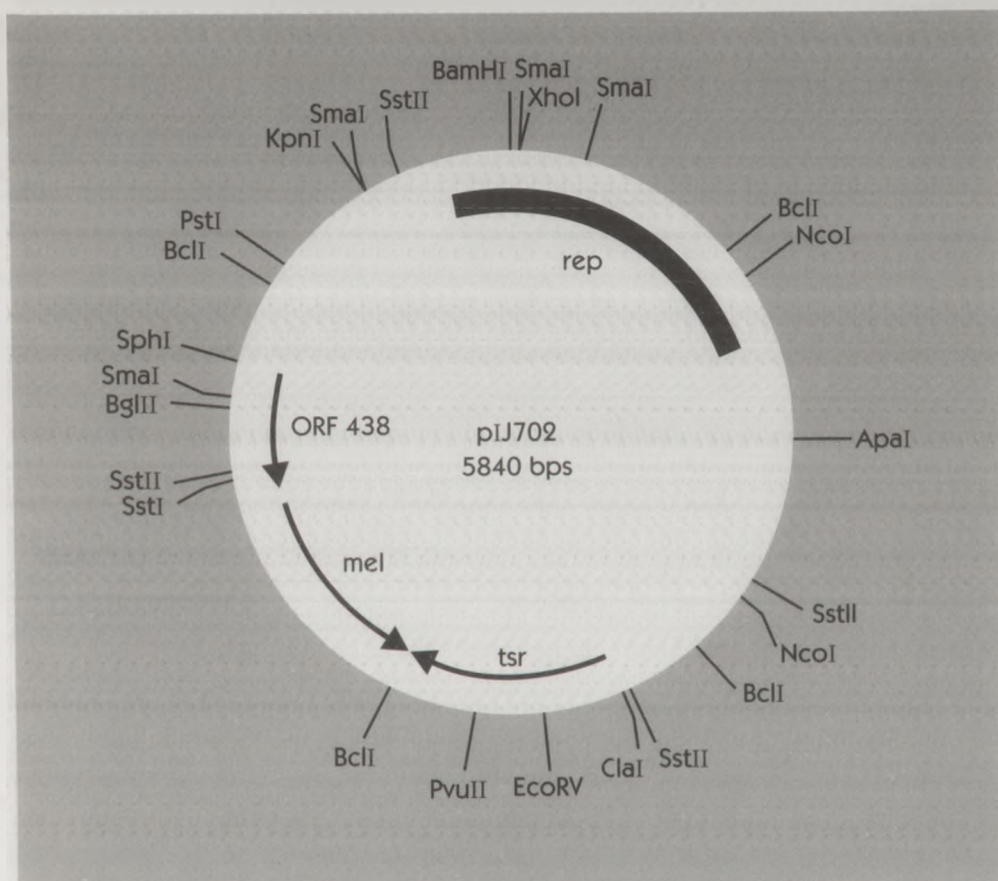


FIGURA 2. Mapa de restrição do vetor de *Streptomyces* pIJ702 (Wohlleben *et al.*, 1993).

dores da transdução de genes (Kobler *et al.*, 1991). Outros plasmídeos multicópia desenvolvidos são os vetores pGM. Estes são derivados do plasmídeo sensível à temperatura pSG5 de *S. ghanaensis*, após inserção de marcadores na região mínima de replicação de 1,6 kb, sendo estáveis à temperatura permissiva e ainda sem pressão seletiva (Muth *et al.*, 1989; Roth *et al.*, 1991). Os vetores são perdidos rapidamente a temperaturas superiores a 34°C, mas se a região de homologia do cromossomo está presente, o plasmídeo integra-se via recombinação homóloga. A seleção à temperatura não permissiva resulta em bactérias com plasmídeos integrados no cromossomo, o que produz disrupção de um gene se o fragmento não contém iniciação transcricional e sinais de parada de tradução. Mutantes por inserção podem ser usados para reisolar o plasmídeo

TABELA 2. Clonagem e expressão de genes em *S. lividans* (Gilbert *et al.*, 1995).

GENES ORIGINADOS EM <i>S. LIVIDANS</i>			
PROTEÍNA	GENE		SUPERPRODUÇÃO
Aminopeptidase	<i>pep P</i>		4,2
α -Arabino- -furanosidase	<i>arf A</i>		50
Quitinase	<i>cht</i>		10
Endoglucanase A	<i>cel A</i>		850
β -Galactosidase	<i>lac</i>		230
Manase	<i>man A</i>		60
Xilanase A	<i>xln A</i>		130
Xilanase B	<i>xln B</i>		60
GENES HOMÓLOGOS DE <i>STREPTOMYCES</i> CLONADOS E EXPRESSOS EM <i>S. LIVIDANS</i>			
PROTEÍNA	GENE	ORIGEM	SUPERPRODUÇÃO
Agarase	<i>dag A</i>	<i>S. coelicolor</i>	500
α -Amilase	<i>amy</i>	<i>S. hygroscopicus</i>	3,4
α -Amilase	<i>amy</i>	<i>Streptomyces</i> sp. WL6	ND
α -Amilase	<i>amy</i>	<i>S. griseus</i>	5
Tendamistat	<i>ai</i>	<i>S. tendae</i>	60
Celulase	<i>cas A</i>	<i>Streptomyces</i> KSM9	19
Quitinase	<i>cht</i>	<i>S. plicatus</i>	ND
Colesterol oxidase	<i>cho</i>	<i>Streptomyces</i> SA-COO	4
β -lactamase	<i>bla</i>	<i>S. albus G</i>	10
β -lactamase	<i>bla</i>	<i>S. cacaoi</i>	30
Tirosinase	<i>mel C</i>	<i>S. antibioticus</i>	36
GENES HETERÓLOGOS DE PROCARIOTOS CLONADOS E EXPRESSOS EM <i>STREPTOMYCES</i>			
PROTEÍNA	GENE	ORIGEM	PRODUÇÃO
Exoglucanase	<i>cex</i>	<i>Cellulomonas fimi</i>	0,06 U/ml
α -amilase	<i>tam</i>	<i>Thermonospora curvata</i>	3,6 U/ml
Celulase E1		<i>T. fusca</i>	1,92 U/ml
Celulase	<i>cel</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	5 U/ml
Fosfatase alcalina	<i>pho A</i>	<i>E. coli</i>	ND
Galactoquinase	<i>gal K</i>	<i>E. coli</i>	ND
Fosfotriesterase	<i>opd</i>	<i>Flavobacterium</i> sp.	0,7 U/ml

integrado junto com os fragmentos adjacentes. Devido à instabilidade apresentada por mutantes, produto da disrupção gênica a temperaturas permissivas, torna-se desejável inserir um fragmento de expressão. Após recombinação dupla, esses eventos de substituição gênica podem ser encontrados em alta frequência, selecionando-se pelo marcador inserido no fragmento de expressão ou pela perda da marca do vetor, que com grande frequência é a resistência a tiosstrepton.

Os actinofagos são uma importante ferramenta no estudo da genética de *Streptomyces*. Aproveitando algumas de suas características biológicas, como a especificidade para infectar diferentes hospedeiros, tem sido possível estudar os mecanismos de prevenção de contaminações em processos de fermentação industrial, estudos de sistemas de modificação-restrição e construção de vetores para análise e intercâmbio de material genético (Schneider *et al.*, 1987; Cullum *et al.*, 1991; Cox & Baltz, 1984; Balan, 1994; Hahn *et al.*, 1991). O principal actinofago usado como vetor de clonagem tem sido o fC31. Este apresenta algumas características similares às do fago λ de *E. coli*, como por exemplo: ambos possuem extremos coesivos, possuem sítio *att* P para integração no cromossomo do hospedeiro e um repressor (*c*) para o controle da lisogenia. Derivados por deleção têm sido amplamente usados para clonagem de DNA até 9kb (Lomovskaya *et al.*, 1980; Chater, 1986). Fagos que carecem do sítio *att*-P podem ser empregados para experimentos de clonagem mutacional.

Sistemas de mutagênese utilizando transposons têm-se mostrado muito úteis em diversas bactérias. Devido à dificuldade para caracterizar as enzimas e os genes de biossíntese de antibióticos que estão agrupados em "clusters", os transposons são uma útil ferramenta de trabalho. Vários sistemas têm sido desenvolvidos, baseados em diversos transposons, como o Tn5096, que é um derivado de IS493 de *S. lividans* e contém o gene de resistência à apramicina. Tn4560 é um derivado de Tn4556, pertence à classe tipo II e contém o gene de resistência à viomicina (Chung, 1987). Já que esses transposons têm mostrado transposição em diferentes posições no genoma, eles são usados para a clássica mutagênese por transposição (Hahn *et al.*, 1991). Transposons "promoter-probe" foram descritos, os quais contêm num extremo um "cassete reporter" sem promotor, o qual é capaz de criar fusões gênicas. Tn5099, transportando o gene *xylE* e TN5331 e TN5353, com o gene da luciferase (*lux*) de *Vibrio harveyi*, são usados para monitorar regulação transcrip-

cional em *Streptomyces*. Estabilidade dos produtos de transposição tem sido atingida pela construção de Tn5424, que contém uma cópia do S466 e não apresenta rearranjos estruturais durante a integração no cromossomo do hospedeiro (Irnich & Cullum, 1994).

MÉTODOS PARA TRANSFORMAÇÃO DE *STREPTOMYCES*

A clássica técnica de transformação de protoplastos é mediada pela ação do polietileno glicol PEG. Transformação de protoplastos de *S. lividans* e outros *Streptomyces* pode ser obtida com uma frequência de 10^5 transformantes/10 ng DNA plasmidial utilizado (Hopwood *et al.*, 1985a). Transformação de *S. rimosus* R6 por eletroporação melhorou a eficiência para 10^5 - 10^6 transformantes/ng DNA plasmidial, além de diminuir o tempo de manipulação do material (Pigac & Schrempf, 1995).

Na conjugação, torna-se necessária a inserção no plasmídeo do stio *mob* de um plasmídeo de bactéria Gram-negativa com ampla faixa de hospedeiros como o RP4 ou RSF1010. Dessa forma, o plasmídeo pode ser mobilizado de *E. coli*, que tem integrado um derivado do RP4 a uma linhagem de *Streptomyces*. O número de transconjugantes obtido é de 10^5 (Mazodier *et al.*, 1989). O DNA pode ser estabelecido de forma extracromossomal, no caso de serem usados plasmídeos bifuncionais. Se o plasmídeo transferido não contém um replicon de *Streptomyces*, a integração é possível via fragmento clonado.

EXPRESSÃO E REGULAÇÃO DOS GENES DA BIOSSÍNTESE DE ANTIBIÓTICOS EM *STREPTOMYCES*

Devido à diferenciação morfológica, os mecanismos de regulação são complexos e apresentam-se organizados em forma de cascata. A síntese de antibióticos, assim como de outros metabólitos secundários, está co-regulada e responde à organização dos genes biossintéticos, que formam grupos ("clusters") no cromossomo. Um tipo de controle é exercido pelo tRNA_{leu} (codon TTA) do gene *bld A*, que controla a esporulação em *S. coelicolor* (Leskiw *et al.*, 1991). Esse tRNA reconhece o codon UUA, que está presente em 13 dos 100 genes seqüenciados. Esses genes são responsáveis pela regulação da biossíntese de antibióticos, resistência e exportação destes produtos.

Quando os genes *afs* B e *afs* C mutam, afetam a produção de antibióticos e a síntese do fator A, produto do gene *afs* A, necessário para esporulação e produção em *S. coelicolor*. Esse fator é essencial em *S. griseus* para produção de estreptomicina. Vários genes reguladores da biossíntese de antibióticos são conhecidos como bialafos/PTT gene *bpr* A (Anzai *et al.*, 1987), actinorodina gene *act* II-*orf*4 (Hopwood *et al.*, 1986), metilnomicina gene *red* D-*orf*1 (Chater & Bruton, 1985), undecilprodigiosin *red* (Narva & Feitelson, 1990), estreptomicina gene *str* R (Distler *et al.*, 1992) daunorubicina gene *dnr* R₂ (Stutzman-Engwall *et al.*, 1992).

Diferentes holoenzimas RNA polimerases exercem regulação na transcrição, reconhecendo diferentes seqüências de promotores. Sete fatores sigma (σ) têm sido identificados (Buttner, 1989). Adiciona-se a essa regulação o mecanismo de controle via ppGpp e GTP (resposta adstringente) (Ochi, 1990). A biossíntese dos metabólitos secundários é regulada negativamente a nível de transcrição pelo fosfato, carbono e nitrogênio do meio (Liras *et al.*, 1990).

CLONAGEM E EXPRESSÃO DE GENES EM *STREPTOMYCES*

Diversas abordagens têm sido desenvolvidas, visando a clonagem de genes individuais. Por exemplo: o uso de promotores constitutivos como P1 e P2 do gene *aph* I aminoacil fosfotransferase (Jansen *et al.*, 1989) e do promotor *mel* C da tirosinase (Bernan *et al.*, 1985); o promotor do gene da resistência à neomicina *aph* II de Tn5, que é reconhecido por *E. coli* e *Streptomyces*; o promotor da mutação do gene da resistência à eritromicina *erm** de *Sacharopolyspora erythraea* (Bibb *et al.*, 1985); promotores de fagos e o promotor induzível *tip* A, após indução com tiostrepton (Wholleben *et al.*, 1993).

Linhagens superprodutoras de antibióticos têm sido obtidas até hoje basicamente por programas de mutagênese clássica, embora os princípios que controlam o processo sejam desconhecidos. Efeitos da luz UV, assim como de diversos agentes genotóxicos, têm sido estudados em profundidade somente no micélio de *S. fradiae* (Baltz *et al.*, 1986) e nos esporos de *S. aureofaciens* (Marins *et al.*, 1993). Para uma manipulação racional, é necessário entender os mecanismos de regulação e a relação entre o metabolismo primário e secundário (Padilla *et al.*, 1991). Técnicas de manipulação gênica devem permitir a detecção de genes

biossintéticos silenciosos, assim como a geração de antibióticos híbridos. A primeira via biossintética clonada foi a da actinorodina, produto de *S. coelicolor* A3(2) por Malpartida & Hopwood 1984. Foi demonstrado que genes do sistema PKS (polyketide synthase) de vários produtores são similares. Dentro desse grupo de antibióticos encontram-se tetraciclinas, antraciclinas, macrolídeos, poliéteres e ansamicina, que compartilham a organização da biossíntese (Sherman *et al.*, 1989; Hopwood & Sherman, 1990). Genes silenciosos foram, por sua vez, detectados por Jones & Hopwood em 1984, durante a análise de genes do fator σ . Um gene de resistência ao bialafos (*bar*) foi descoberto em *S. coelicolor*, que não produz esse antibiótico. Técnicas de manipulação gênica serão importantes ferramentas na obtenção de novas moléculas, por causa da combinação de genes biossintéticos de membros diferentes, capazes de produzir compostos de uma mesma classe química.

Antibióticos híbridos foram produzidos após transferência de genes da actinorodina em produtores de medermicina e granacitina, compostos da mesma classe, o que leva à biossíntese de mederrodin A, B e diidrogranatirodin. Essa molécula foi diferente só na estereoquímica dos prótons num carbono (Hopwood *et al.*, 1985b). Antibióticos híbridos com maior atividade foram obtidos depois que um fragmento de DNA de *S. purpurascens* ATCC 25489, produtor de antraciclinas, foi clonado próximo a uma região, que hibridiza positivamente com uma sonda da enzima policetônico sintase do antibiótico actironodina em *S. galileus* ATCC 31615. As novas moléculas apresentaram atividade citotóxica contra células de leucemia de camundongo L1210 (Niemi *et al.*, 1994).

PROGRAMAS DE MELHORAMENTO DE LINHAGENS PRODUTORAS DE ANTIBIÓTICOS

Após um programa de seleção, as linhagens produtoras de antibióticos são submetidas a processos de melhoramento genético, visando principalmente o aumento da produtividade e a diminuição do custo de produção. Em geral, os antibióticos são sintetizados, formando parte de complexos moleculares com frações que apresentam diferentes atividades biológicas, o que dificulta os processos de purificação. Para eliminar frações "contaminantes", diversas abordagens metodológicas devem ser incrementadas. Em termos de fermentação, pode-se modificar

a composição de meio de cultura para dirigir a via de produção numa fração. Foi observado que meios de fermentação contendo dietilbarbiturato de sódio favorecem a produção de rifamicina B, que é a fração de utilidade clínica produzida por *S. mediterranei*. Os núcleos de barbiturato ativam ou inibem enzimas associadas à produção de rifamicina (Lal *et al.*, 1995). O tempo de incubação de 4 a 7 dias e a temperatura (geralmente 30°C), além de agitação e aeração, são de vital importância. A produção pode variar de poucos mg/l até 15-20 g/l, os meios e condições de fermentação devem ser atualizados periodicamente. Nos meios de produção industrial, ao invés da utilização de fontes de carbono, nitrogênio e fosfatos onerosos, procura-se utilizar componentes baratos e eficientes como farinha de milho, soja, glicerol etc. A regulação dos componentes é fundamental para evitar a inibição catabólica por esses produtos, variações nos componentes do meio, como nas condições de fermentação e processos de purificação final incrementam a produção em 25% (Fig. 3).

A segunda metodologia é o melhoramento por mutagênese. Esse método tem sido usado com muito sucesso para incrementar a produção de antibióticos. Em geral, a cepa produtora é submetida a tratamento com UV ou agentes genotóxicos, como nitrosoguanidina (NTG), metil metano sulfonato (MMS), etil metano sulfonato (EMS); colônias mutantes com produção aumentada são selecionadas. Essa técnica clássica resulta em aumentos da produção de 10 a 100 vezes. Mutantes bloqueados são importantes para estudos da via biossintética. Por ser um evento aleatório, a mutagênese pode afetar outros fenótipos, que após várias gerações podem tornar inviável o mutante.

A terceira metodologia utiliza técnicas de biologia molecular e com elas objetiva-se o melhoramento da produtividade, seja bloqueando uma via biossintética determinada ou alterando a informação genética para obter um novo produto. Para atingir esses objetivos torna-se necessário melhorar o fluxo metabólico nas vias bioquímicas existentes, o que implica no aumento da expressão de proteínas pelo incremento na dosagem de genes ou promotores fortes; a desregulação das vias metabólicas pela supressão dos elementos de controle negativo ou de ativadores da superexpressão e a liberação do sistema feedback de controle, para produzir enzimas desreguladas. Essa metodologia tem sido usada no melhoramento da produção de antibióticos β -lactâmicos em *Cephalosporium acremonium*, *Streptomyces clavuligerus* e *Penicillium chryso-*

genum (Skatrud *et al.*, 1989; Cantwell *et al.*, 1990). Outras estratégias são a combinação de material genético de vias similares para obtenção

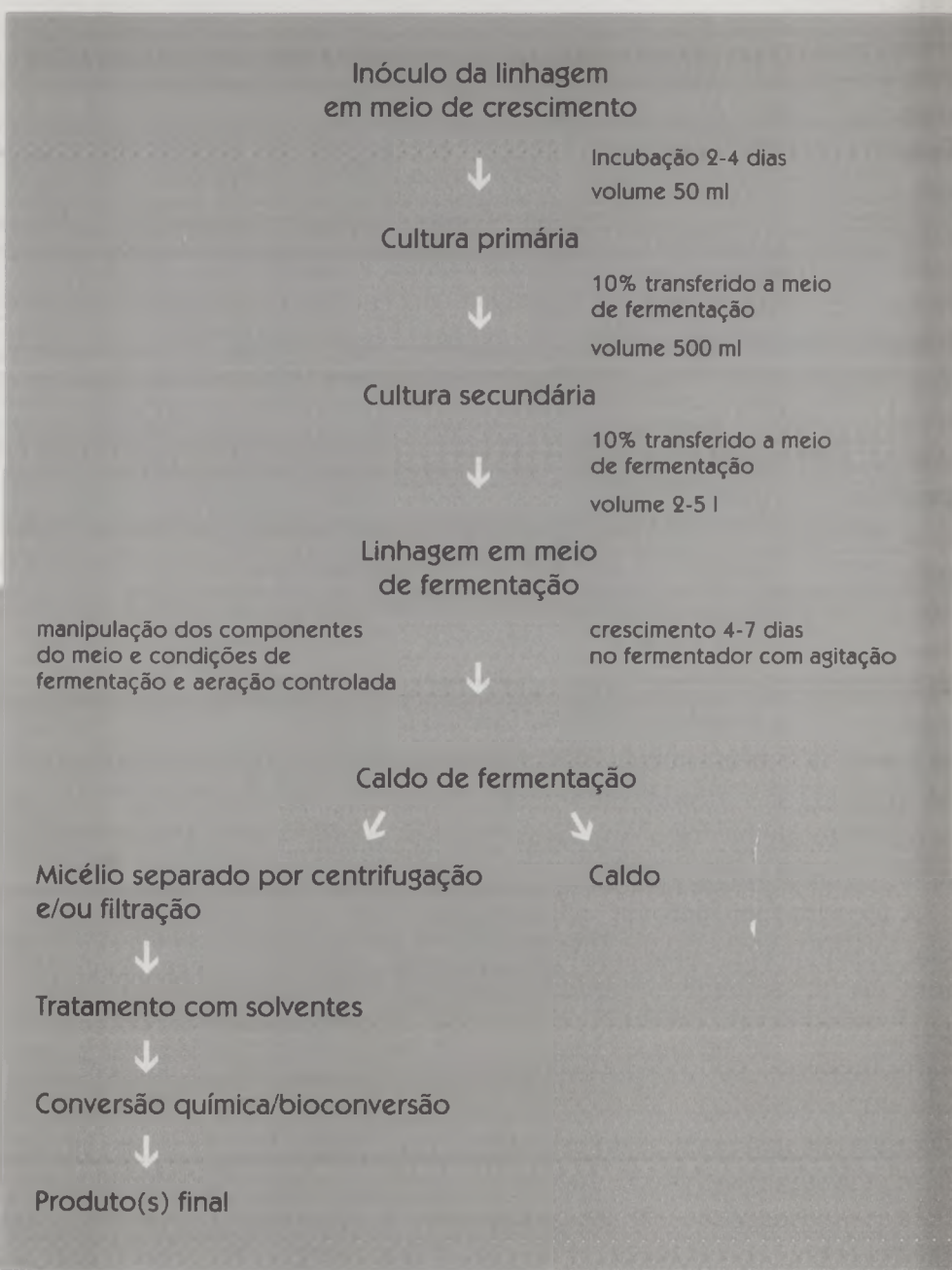


FIGURA 3. Representação básica de um processo fermentativo.

de produtos híbridos; o intercâmbio de genes para modificação específica de passos intermediários e a utilização de recombinação entre vias ramificadas.

EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS POR *STREPTOMYCES*

Os *Streptomyces* têm uma extraordinária capacidade para produzir grandes quantidades de enzimas com variada potencialidade de uso industrial. Os principais grupos de enzimas são: oxidoredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e sintases. Esses microrganismos, como parte da microflora, têm um papel importante na formação do húmus, especialmente pela produção de enzimas extracelulares com a capacidade de degradar compostos celulolíticos. As enzimas que intervêm nesse processo são celulases, hemicelulases e ligninas. Em geral, essas enzimas são totalmente secretadas, já que seus substratos são grandes polímeros, que devem ser degradados para finalmente poderem ser assimilados pelas células. As enzimas que degradam eficientemente compostos lignocelulíticos podem ser usadas para transformar biomassa de bosques e dejetos agrícolas em combustíveis e alimento para animais. Devido à especificidade de seus substratos, enzimas como xilanases podem remover seletivamente componentes hemicelulolíticos da polpa da madeira e têm sido usadas com sucesso como agentes em processos de biobranqueamento na indústria do processamento da polpa de madeira e do papel. Esse fato é de grande importância, já que reduz consideravelmente, durante o processo de branqueamento, a produção de derivados da clorina, que são altamente poluentes (Gilbert *et al.*, 1995). Durante a década passada, a clonagem de um grande número de enzimas e sinais de secreção foram descritos (Tabela 3). O maior desafio, hoje, é o desenvolvimento em *Streptomyces* de vetores de expressão-secreção para proteínas heterólogas eucarióticas (Chen *et al.*, 1995).

A capacidade de produzir grandes quantidades de enzimas lignocelulíticas indica que esse gênero bacteriano possui um sistema eficiente de secreção de proteínas, sendo inclusive superior ao de bactérias Gram-negativas. Para tornar viável a produção industrial é necessário fazer estudos maiores de "screening" na procura de novos produtores

TABELA 3. Genes heterólogos de eucariotos clonados e expressos em *Streptomyces*: (Gilbert *et al.*, 1995).

PROTEÍNA	ORIGEM	PROMOTOR	PEPTÍDEO SINAL	PRODUÇÃO
Apiadecin	<i>Apis mellifera</i>	SSI inibidor subtilisina <i>S. albogriseolus</i>	SSI	200 mg/L
Hor. Crescimento bovino	cDNA glândula pituitária bovina	aph aminoglicosídeo de <i>S. fradiae</i>	—	0.17% proteína total
Hirudin -inibidor da trombina	<i>Hirudo medicinalis</i>	tendamistat -inibidor α -amilase <i>S. tandrae</i>	tendamistat	250-500 ng/ml
Receptor CD4 cél T	Células T humanas	STI-II-inibidor protease <i>S. longisporus</i>	STI-II	300 ng/ml
Interferon α	Camundongo	α -amilase <i>S. venezuelae</i>	α -amilase	—
Interferon α 1	Humano	sak-estafiloquinase do fago 42D <i>Staphylococcus aureus</i>	estafiloquinase	1-2x 10 ⁵ UI/ml
Interleucina 2	Humano	tendamistat -inibidor α -amilase <i>S. fradiae</i>	tendamistat	30 ng/ml
Proinsulina	<i>Macaca fascicularis</i>	gene <i>mel e</i> tendamistat	tendamistat	20-100 mg/ml
Fator necroses tumoral	Humano	gene <i>erm E</i> <i>Sacharopolyspora erythraeus</i>	gene <i>melC1</i>	20 mg/l

e desenvolver vetores apropriados para clonagem e expressão de genes. Os peptídeos sinal de *Streptomyces* apresentam características similares às já descritas para outros grupos, embora tenha sido observada uma região diferente denominada "Arg cluster", localizada entre a região N-terminal e a região hidrofóbica, que, quando deletada, bloqueia a secreção de celulase em *Streptomyces* KSM-9, xilanases A e B, β -galactosidase de *S. lividans* e da endoglicosidase H de *S. plicatus* (Park *et al.*, 1991).

O peptídeo sinal de *Streptomyces* WL6 tem 31 aminoácidos, presentes como um domínio carregado positivamente na região N-terminal, com dois resíduos Arg; uma região central com a.a hidrofóbicos e um resíduo Ala antes do sítio de clivagem (Chen *et al.*, 1995). O tamanho médio dos peptídeos sinal de *Streptomyces* é de 35 a.a, sendo de 29 a 31 a.a para outros Gram-positivos e de 24 a 25 a.a para *E. coli*. Estes a.a extra localizam-se preferencialmente no extremo N-terminal, sugerindo uma adaptação evolutiva para um mecanismo mais eficiente de secreção.

A utilização de *Streptomyces* como sistema de expressão de proteínas heterólogas é atrativo pela eficiente maquinaria de secreção dessas bactérias. Proteínas recombinantes codificadas por genes expressos em *S. lividans* são produzidas em grandes quantidades e totalmente secretadas. As proteínas podem ser mais facilmente separadas das células por filtração ou centrifugação e a superprodução facilita sua purificação. Outra vantagem é que os *Streptomyces* não são patogênicos, e existe um extraordinário conhecimento sobre seus processos de fermentação pela indústria farmacêutica. O principal problema do sistema está na baixa modificação pós-transcricional como glicosilação e formação de pontes dissulfídicas, que são necessárias para a estabilidade de várias proteínas eucarióticas.

A informação apresentada no presente capítulo mostra esquematicamente o conhecimento sobre a biologia de *Streptomyces* e as principais aplicações biotecnológicas a curto prazo. Foi destacada a importância de realizar maiores estudos sobre regulação e ligação entre metabolismo primário e secundário, sobre os sistemas de transporte e sobre função ecológica dessas bactérias. O aperfeiçoamento dos métodos atualmente utilizados permitirá o isolamento e melhoramento na produção de novas linhagens, assim como a biossíntese de novos metabólitos.

AGRADECIMENTOS

O autor agradece o apoio financeiro da FAPESP (processo nº 92/4724-5; 95/4116-3) e do CNPq (processo nº 260049/93-0; 490023/95-9; 453069/95-9).

- LIN, Y.; KIESER, H.M.; HOPWOOD, D.A.; CHEN, C.W. The Chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 6 is linear. **Molecular Microbiology**, v.10, p.923-933, 1993.
- LIRAS, P.; ASTURIAS, J.A.; MARTIN, J.F. Phosphate Control Sequences Involved in Transcriptional Regulation of Antibiotic Biosynthesis. **TIBTECH**, v.6, p.184-189, 1990.
- LOMOVSKAYA, N.D.; CHATER, K.F.; MKRTUMIAN, N.M. Genetics and Molecular Biology of *Streptomyces* Bacteriophages. **Microbiology Reviews**, v.44, p.206-229, 1980.
- MACNEIL, D. Characterization of a Unique Methyl-Specific Restriction System in *Streptomyces avermitilis*. **Journal of Bacteriology**, v.170, p.5607-5612, 1988.
- MALPARTIDA, F.; HOPWOOD, D.A. Molecular cloning of the whole biosynthetic pathway of a *Streptomyces* antibiotic and its expression in a heterologous host. **Nature**, v.309, p.462-464, 1984.
- MARINS, M.; COSTA, S.O.P.; PADILLA, G. Effects of Genotoxic Agents on His^r Revertants and Survival of Spores of *Streptomyces aureofaciens*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.10, p.560-562, 1993.
- MARTIN, C.; MAZODIER, P.; MEDIOLA, M.V.; GICQUEL, B.; SMOKVINA, T.; THOMPSON, C.J.; DAVIES, J. Site Specific Integration of the *Streptomyces* plasmid pSAM2 in *Mycobacterium smegmatis*. **Molecular Microbiology**, v.5, p.2499-2502, 1991.
- MAZODIER, P.; PETIER, R.; THOMPSON, C.J. Intergeneric Conjugation Between *Escherichia coli* and *Streptomyces* species. **Journal of Bacteriology**, v.171, p.3583-3585, 1989.
- MAZODIER, P.; THOMPSON, C.J.; BOCCARD, F. The Chromosomal Integration Site of the *Streptomyces* element pSAM2 overlaps a putative tRNA gene conserved among actinomycetes. **Molecular and General Genetics**, v.222, p.431-434, 1990.
- MIYOSHI, K.Y.; OGATA, S.; HAYASHIDA, S. Multi-copy Derivatives of Pock-Forming Plasmid pSA1 in *Streptomyces azureus*. **Journal of Bacteriology**, v.168, p.452-454, 1986.
- MUTH, G.; NUBAUMER, B.; WOHLLEBEN, W. A Vector System With Temperature-Sensitive Replication for Gene Disruption and Mutational Cloning in Streptomycete. **Molecular and General Genetics**, v.219, p.341-348, 1989.
- NARVA, K.E.; FEITELSON, J.S. Nucleotide Sequence and Transcriptional Analysis of the *redD* locus of *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Journal of Bacteriology**, v.172, p.326-333, 1990.
- NIEMI, J.; YLIHONDO, K.; HAKALA, J.; PARSSINEN, R.; KOPIO, A.; MANTSALA, P. Hybrid Anthracycline Antibiotics: Production of New Anthracycline by Cloned Genes from *Streptomyces purpurascens* in *Streptomyces galieus*. **Microbiology**, v.140, p.1351-1358, 1984.
- OCHI, K. *Streptomyces relC* Mutants with an Altered Ribosomal Protein ST-L11 and Genetic Analysis of a *Streptomyces griseus rel* Mutant. **Journal of Bacteriology**, v.172, p.4008-4016, 1990.
- OMER, C.A.; COHEN, S.N. Plasmid Formation in *Streptomyces*: excision and integration of the SLP1 replicon at a specific chromosomal site. **Molecular and General Genetics**, v.196, p.429-438, 1984.
- PADILLA, G.; HINDLE, Z.; CALLIS, R.; CORNER, A.; LUDOVIC, M.; LIRAS, P.; BAUMBERG, S. The Relationship Between Primary and Secondary Metabolism in *Streptomyces*. In: BAUMBERG, S.; KRUGEL, H.; NOACK D., eds. **Genetics and Product Formation in Streptomyces**. New York: Plenum Press, 1991. p.35-45.
- PARK, J.S.; HORINOCHI, S.; BEPPU, T. Characterization of the leader peptide on an endo-type cellulase produced by an alkalophilic *Streptomyces* strain. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.55, p.1745, 1991.
- PERNODET, J.L.; SIMONET, J.M.; GUERINAU, M. Plasmids in Different Strains of *Streptomyces ambofaciens*: free and integrated form of plasmid pSAM2. **Molecular and General Genetics**, v.198, p.35-41, 1984.
- PIGAC, J.; SCHREMPF, H. A simple and Rapid Method of Transformation of *Streptomyces rimosus* R6 and other Streptomycetes by Electroporation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.352-356, 1995.
- REDENBACH, M.; FLETT, F.; PIENDL, W.; GLOCKER, I.; RAULAND, U.; WAFZIG, O.; KLIEM, R.; LEBLOND P.; CULLUM, J. The *Streptomyces lividans* 66 Chromosome Contains a 1MB Delatogenic Region Flanked by Two Amplifiable Regions. **Molecular and General Genetics**, v.241, p.255-262, 1993.
- REDENBACH, M.; ARNOLD, A.; RAULAND, U.; CULLUM, J. Structural Instability of the *Streptomyces lividans* 66 Chromosome and Related Effects. **Actinomycetology**, v.8, p.97-102, 1994.
- ROTH, M.; MULLER, G.; NEIGENFIND, M.; HOFFMEIR, C.; GEUTHER, R. Partitioning of Plasmids in *Streptomyces*: Segregation in Continuous Culture of a Vector with Temperature-Sensitive. In: BAUMBERG, S.; KRUGEL, H.; NOACK D., eds. **Genetics and Product Formation in Streptomyces**. London: Plenum Press, 1991. p.305-313.

- SCHNEIDER, J.; AGUILERA-GARCIA, I.; KUTZNER, H.J. Characterization of a Family of Temperate Actinophages of *Faenia rectivirgula*. **Journal of General Microbiology**, v.133, p.2263-2268, 1987.
- SHERMAN, D.H.; MALPARTIDA, F.; BIBB, M.J.; KIESER, H.M.; BIBB, M.J.; HOPWOOD, D.A. Structure and Deduced Function of the Granactin-Producing Polyketide Synthase Gene Cluster of *Streptomyces violaceoruber* Tu22. **EMBO Journal**, v.8, p.2717-2725, 1989.
- SKLATRUD, P.L.; TIETZ, A.J.; INGOLIA, T.D.; CANTWELL, D.L.; FISHER, J.L.; CHAPMAN, J.L.; QUEENER, S.W. Use of Recombinant DNA to Improve Production of Cephalosporin C by *Cephalosporium acremonium*. **Biotechnology**, v.7, p.477-485, 1989.
- SMOKVINA, T.; MAZODIER, P.; BOCCARD, F.; THOMPSON, C.J.; GUERINAU, M. Construction of a series of pSAM2-based integrative vectors for use in actinomycetes **Gene**, v.94, p.53-59, 1990.
- STUTZMAN-ENGWALL, K.J.; OTTEN, S.L.; HUTCHINSON, C.R. Regulation of Secondary Metabolism in *Streptomyces* spp. and overproduction of daunorubicin in *Streptomyces peucetius*. **Journal of Bacteriology**, v.174, p.144-154, 1992.
- THOMPSON, C.J.; WARD, J.M.; HOPWOOD, D.A. DNA Cloning in *Streptomyces*: Resistance Genes from Antibiotic-Producing Species. **Nature**, v.286, p.525-527, 1980.
- THOMPSON, C.J.; WARD, J.M.; HOPWOOD, D.A. Cloning of Antibiotic Resistance and Nutritional Genes in *Streptomyces*. **Journal of Bacteriology**, v.151, p.668-677, 1982a.
- THOMPSON, C.J.; KIESER, T.; WARD, J.M.; HOPWOOD, D.A. Physical Analysis of Antibiotic Resistance Genes from *Streptomyces* and their use in vector construction. **Gene**, v.20, p.51-62, 1982b.
- WOHLLEBEN, W.; ARNOLD, W.; BISSONNETTE, L.; PELLETIER, A.; TANGUAY, A.; ROY, P.H.; GAMBOA, G.C.; BARRY, G.F.; AUBERT, E.; DAVIES, J.; KAGAN, S.A. On the Evolution of Tn21-like Multiresistance Transposons: Sequence Analysis of the Gene (*aacC1*), for Gentamycin Acetyltransferase-3-1(AAC(3)-I), another member of the Tn21-based expression cassette **Molecular and General Genetics**, v.217, p.202-208, 1989.
- WOHLLEBEN, W.; MUTH, G.; KALINOVSKI, J. Genetic Engineering of Gram-positive Bacteria. In: PUHLER, A., ed. Genetic Engineering of Microorganisms. Weinheim: VCH, 1993. p 83-134.



PARTE IV

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS



ESTRATÉGIAS PARA ISOLAMENTO SELETIVO DE ACTINOMICETOS

Janete Magali de Araujo

Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária
CEP 50770-901, Recife, PE

INTRODUÇÃO

Os actinomicetos compreendem um grupo heterogêneo de bactérias filamentosas, que filogeneticamente pertencem ao ramo das bactérias Gram-positivas com alto teor de G+C. Neste grupo estão incluídos gêneros com diferentes características morfológicas, como: *Micrococcus*, *Arthrobacter* e *Corynebacterium*, que podem se reproduzir por fissão binária; *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*, denominados actinomicetos nocardioformes, apresentam micélio substratal rudimentar seguido de fragmentação. No outro extremo, está o grupo “esporoactinomicetos”, que engloba *Streptomyces*, *Actinoplanes*, *Microbispora*, e exibe uma rede de micélio aéreo bem desenvolvida, diferenciada em estruturas especializadas como artrosporos em cadeia observados em *Streptomyces*, esporos em vesículas como em *Actinoplanes* e *Streptosporangium* e endosporos em *Thermoactinomyces* (Chater & Hopwood, 1993; Cross, 1989; Lechevalier & Lechevalier, 1981).

Em geral, os actinomicetos crescem lentamente, o que torna difícil seu isolamento; em relação a seus competidores, bactérias e fungos apresentam velocidade de crescimento radial sobre meio sólido inferior ao de fungos, e sua velocidade de produção de células geralmente é mais lenta do que a das demais bactérias. Um ciclo de divisão celular

em actinomicetos pode levar de 2 a 3 dias, enquanto *Escherichia coli* pode chegar a apenas 20 minutos (Lechevalier & Lechevalier, 1981).. Por causa deste crescimento lento, os actinomicetos foram negligenciados, mas atualmente os esporoactinomicetos e nocardioformes têm atraído a atenção de biotecnologistas e ecologistas por serem, reconhecidamente, os principais produtores de compostos bioativos de alto valor comercial, e por causa do seu importante papel na reciclagem de nutrientes do solo, ultimamente demonstrado.

Entre as bactérias, a ordem Actinomycetales é a única fonte de compostos bioativos comercialmente importante. Nos últimos anos, mais de 6.000 antibióticos foram descobertos, e destes, 65% são produzidos pelo gênero *Streptomyces*. Além dos antibióticos de uso clínico, veterinário e agroquímico, outros metabólitos secundários — enzimas, imunomoduladores, inibidores de enzimas — são produzidos também por *Streptomyces*. A busca de outros metabólitos bioativos requer a descoberta de novos microrganismos, abundantes nos diversos ecossistemas e que necessitam apenas da exploração de diferentes nichos ecológicos associados a condições seletivas de isolamento.

OCORRÊNCIA

Os actinomicetos saprofíticos colonizam substratos sólidos e podem se espalhar na atmosfera por meio de esporos hidrofóbicos ou de esporângios resistentes à dessecação, ocorrendo principalmente em condições estritamente aeróbias, em pH neutro a alcalino. Muitos actinomicetos do solo comportam-se como neutrófilos em cultivo de laboratório, podendo crescer em pH de 5,0 a 9,0. Em solos ácidos, o pH é um fator que limita a distribuição e a atividade dos actinomicetos. Esporoactinomicetos acidófilos crescem bem em pH 3,5 a 5,5, sendo observada sua ocorrência em solos ácidos (Khan & William, 1975; Hagedorn, 1976; Coelho & Drozd-wicz, 1978). Um dos problemas para o estudo de microrganismos acidófilos é o uso de meio com ágar que não permanece sólido em condições de baixa acidez (Iwai & Takahashi, 1992), mas o uso de tampão fosfato ácido ao meio contorna esta dificuldade (Williams *et al.*, 1971). A ocorrência de actinomicetos saprofíticos nos diferentes ecossistemas decorre da sua diversidade metabólica e da evolução de mecanismos específicos de dispersão. Esta diversidade metabólica mostra a grande variabilidade destes microrganismos em colonizar ambientes salinos, ácidos, com ele-

vada temperatura, indicando a grande capacidade de se adaptarem a ambientes extremos (Tabela 1).

TABELA 1. Principais habitats de alguns actinomicetos (McCartney & William, 1990).

GÊNERO	HABITAT
<i>Actinoplanes</i>	Água, solo e plantas em decomposição
<i>Frankia</i>	Nódulos de raízes de plantas não-leguminosas
<i>Micromonospora</i>	Água, sedimentos, solo úmido
<i>Nocardia amarae</i>	Lodo ativado
<i>Rhodococcus coprophilus</i>	Fezes animais, solo, água
<i>Saccharopolyspora hirsuta</i>	Bagaço de cana-de-açúcar auto-aquecido
<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	Trigo mofado
<i>Streptomyces</i>	Solo, plantas em decomposição, água etc.
<i>Thermoactinomyces</i>	Compostagem, ração animal e outros "resíduos" com auto-aquecimento

O gênero *Streptomyces* é amplamente distribuído na natureza, e seu nicho primário é o solo. Porém, ele pode também ocorrer em diferentes ambientes aquáticos, como pântanos e folhagens em decomposição. No solo, a população de *Streptomyces* usualmente atinge 10^4 a 10^7 UFC/g de solo seco, ocorrendo principalmente na forma de esporos, mas também pode ser encontrada na forma de hifa vegetativa. Segundo Iwai & Takahashi (1992), 80% dos actinomicetos do solo ocorrem na camada mais superficial do solo (0-10 cm), diminuindo progressivamente com a profundidade. Estas bactérias filamentosas ocupam um importante papel na biodegradação de polímeros como lignina, quitina, amido etc. (Crawford, 1988; Nolan & Cross, 1988), além de produzirem importantes metabólitos secundários de interesse comercial (Lancini & Lorenzetti, 1993).

Embora este dado seja questionado, inúmeras investigações mostram que os esporoactinomicetos e actinomicetos nocardioformes podem ser isolados de ambientes aquáticos como mar, rios, lagos, pântanos (Okami & Okazaki, 1972; Al Diwany *et al.*, 1978; Barcina *et al.*, 1987; Takizawa *et*

al., 1993; Jiang & Xu, 1996; Hatano, 1997). O gênero *Micromonospora* tem sido isolado muito freqüentemente de solos úmidos na proporção de 10^4 a 10^5 UFC/g de solo, mas também pode ocorrer em lagos e água corrente. O estudo da população de actinomicetos em amostras de água de 15 lagos da região de Wisconsin revelou que 10 a 20% da população bacteriana total isolada pertencia ao gênero *Micromonospora* (Cross, 1981). Entretanto, o próprio Cross questiona o fato de os actinomicetos serem muito adaptados para crescimento em substratos sólidos, e se sua ocorrência em ambientes aquáticos estaria relacionada com a "lavagem" do solo, uma vez que a diversidade taxonômica de actinomicetos do solo é a mesma do meio aquático. Vários estudos mostram que, em maior profundidade de ambientes aquáticos marinhos, o grupo *Actionoplanes* predomina e requer água do mar para isolamento, indicando que estes actinomicetos fazem parte da comunidade microbiana autóctone marinha (Jensen *et al.*, 1991). Actinomicetos nocardioformes também ocorrem em ambientes aquáticos, como o *Rhodococcus marinonascens*, descrito como uma espécie nova por Helmke & Weyland (1984), mostrando a grande diversidade microbiológica desse ecossistema.

Outro nocardioforme conhecido como coprofílico, que ocorre em esterco animal, é o *Rhodococcus coprophilus*. A presença deste actinomiceto em rios e lagos é utilizada como um indicador da contaminação fecal por animais herbívoros (Rowbotham & Cross, 1977; Mara & Oragui, 1981). Estudos ecológicos mostram que este actinomiceto sobrevive à passagem através do rúmen e intestinos de ruminantes atingindo as fezes, onde ocorre o crescimento. A proporção de *R. coprophilus* para actinomicetos totais em fezes de gado, carneiros e patos é bem maior do que nas fezes de porcos e cavalos (Mara & Oragui, 1981).

As condições ideais de pH, umidade e aerobiose da compostagem, forragem animal (grão de cereais, feno) e do bagaço de cana, associados ao alto conteúdo de nutriente orgânico e de auto-aquecimento, favorecem a predominância de actinomicetos termofílicos. Neste habitat com temperatura elevada (50-55°C), a diversidade microbiana é baixa, predominando os gêneros *Saccharomonospora* no bagaço de cana e *Thermomonospora* em compostagem do cultivo comercial de cogumelos (McCarthy & Cross, 1981; Amner *et al.*, 1989). Os actinomicetos termofílicos destacam-se como degradadores primários da biomassa vegetal, que é a principal fonte de carbono no ambiente terrestre, composta principalmente de lignina e celulose (McCarthy & Williams, 1992).

A grande diversidade microbiana, e em particular a população de actinomicetos que ocorre em habitats naturais, muitas vezes pode ser alterada pela atividade do homem que, inadvertidamente, introduz no solo substâncias químicas (fungicidas, inseticidas, herbicidas) ou não (lodo ativado) que podem ocasionar a predominância de determinados grupos de actinomicetos no solo, como *Nocardiosis* sp., isolado de solo tratado com clordane ou a predominância de *Nocardia* e *Micromonospora* em solo enriquecido com lodo ativado (Orchard, 1980; Percich & Loockwood, 1978).

Em ambientes poluídos por petróleo é comum o isolamento de *Nocardia* sp. e *Rodhococcus* sp., mostrando que este grupo tem um importante papel na degradação de hidrocarbonetos (Williams & Goodfellow, 1983; Sorkhoh *et al.*, 1990).

Nesse amplo grupo de bactérias filamentosas existem algumas formas patogênicas ao homem, como *Mycobacterium leprae* e *Corynebacterium diphtheriae*, *Nocardia* sp., *Actinomyces* sp., ou fitopatogênicas à batata, como *Streptomyces scabies* (Lechevalier, 1988).

Os actinomicetos podem ocorrer também na rizosfera e no rizoplane de muitas plantas, sendo o gênero *Frankia* o primeiro actinomiceto endofítico simbiótico isolado de plantas não-leguminosas como *Alnus*, *Casuarina* e *Myrica*. Essa associação, conhecida como actinorrízica, ocorre em 24 gêneros e 194 espécies de plantas de regiões do trópico e sub-trópico, onde o clima comumente é muito frio. A simbiose desse actinomiceto com as plantas não-leguminosas é de grande importância no balanço mundial do nitrogênio. A presença de *Frankia* como fixador de nitrogênio nos nódulos das raízes dessas plantas foi acompanhada durante muito tempo por microscopia e, apenas em 1978, Callaham e colaboradores conseguiram isolar este actinomiceto, utilizando diferentes meios seletivos de isolamento, temperatura de cultivo de 25-37°C e longo tempo de incubação (4 a 8 semanas) (Quispel *et al.*, 1983; Callaham *et al.*, 1978).

A ocorrência de microrganismos endofíticos em tecidos vegetais de plantas sem sintomas de doenças vem sendo constatada pela utilização de técnicas comumente utilizadas na fitopatologia e que não são utilizadas na ecologia microbiana. A literatura sobre fungos e bactérias endofíticas é bem ampla (Azevedo, 1997), enquanto para actinomicetos endofíticos não-simbióticos existem poucas investigações.

Sardi *et al.* (1992) foi o primeiro a relatar o isolamento, na Itália, de 499 actinomicetos endofíticos de raízes de 28 diferentes espécies vege-

tais. Os actinomicetos foram isolados de raízes esterilizadas e pertencem, em sua maioria, ao gênero *Streptomyces*, seguido de *Streptosporangium*, *Nocardia* e *Micromonospora*.

Em 1996, na China, Liu & Tang isolaram 17 *Streptomyces* endofíticos de raízes esterilizadas de algodão (*Gossypium* spp.), dos quais 58% apresentavam atividade antagonística para *Rhizoctonia solani*.

No Brasil, pesquisas realizadas no Laboratório de Genética do Departamento de Antibióticos, da UFPE, mostram a ocorrência de actinomicetos endofíticos em folhas, raízes e tubérculos de diferentes plantas. Em folhas e raízes de milho (*Zea mays*) cultivado no campus universitário da UFPE, foram isolados 54 actinomicetos (31 de folhas e 23 de raízes), a maioria pertencente ao gênero *Microbispora*, e alguns aos gêneros *Streptomyces* e *Streptosporangium* (Silva *et al.*, 1995). De plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) cultivadas em casa-de-vegetação na Universidade Federal Rural de Pernambuco foram isolados 32 actinomicetos (7 de folhas e 25 de raízes), que em sua maioria também correspondiam ao gênero *Microbispora*, seguido de *Streptomyces* e *Streptosporangium* (Brito & Araújo, 1997). Mais recentemente, Matsuura *et al.* (1998) também isolaram de raízes e folhas desinfetadas de feijão caupi (*Vigna unguiculata*), cultivado no campus universitário da Universidade Federal do Amazonas, 31 actinomicetos (14 de folhas e 17 de raízes). As primeiras análises para identificação mostram predominância do gênero *Streptomyces*, seguido de *Streptosporangium* e *Nocardiosis*. Todos os actinomicetos endofíticos isolados apresentam, em sua maioria, atividade antibiótica para bactérias Gram-positivas e *Candida albicans* e fraca atividade para bactérias Gram-negativas. Do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban), leguminosa nativa da região do Amazonas que produz tubérculos comestíveis ricos em amido, foram isolados 10 actinomicetos endofíticos do tubérculo desinfetado, todos identificados como *Nocardiosis*, que apresentavam elevada atividade amilolítica (Stamford, 1997).

SOLAMENTO

A técnica convencional de diluição seriada em placa usando meios de cultura seletivos não indica a população real de actinomicetos naquele ambiente, uma vez que os actinomicetos podem ser inibidos por competidores ou podem apresentar crescimento lento, sendo superados por outros actinomicetos de crescimento mais rápido. Para contor-

naar estes problemas, inúmeras estratégias foram desenvolvidas para isolamento seletivo deste grupo de bactérias filamentosas.

O isolamento e a quantificação de actinomicetos dos diversos nichos ecológicos através da técnica de diluição em placa são objetivos muitas vezes não-compatíveis. O taxonomista, por exemplo, procura em certas ocasiões apenas um novo taxon, enquanto o ecologista está interessado em quantificar e qualificar a população microbiana em um determinado nicho ecológico, já o microbiologista industrial isola centenas de linhagens para encontrar uma única e nova substância bioativa, sem levar em consideração os dados ecológicos.

Vários são os procedimentos para o isolamento seletivo e a quantificação de actinomicetos, que podem ser influenciados por vários fatores, como:

1. Seleção de amostras.
2. Pré-tratamento da amostra.
3. Uso de meios seletivos e condições de cultivo.
4. Uso de antibióticos.

SELEÇÃO DA AMOSTRA

Alguns critérios para a seleção da amostra (solo, água, pântanos etc.) a ser analisada devem ser levados em consideração. A exploração de regiões ainda não exploradas pelo homem, climas, ambientes salinos e ácidos, micronichos ecológicos específicos, constituem estratégias que poderão conduzir ao conhecimento da biodiversidade bacteriana. Segundo Bull *et al.* (1992), apenas 12% das espécies bacterianas são conhecidas em todo o mundo, necessitando portanto de maiores investigações para que o homem possa usufruir da potencialidade microbiana.

As amostras de solo devem ser coletadas obedecendo a procedimentos de assepsia, seguidos da análise microbiológica. Após a coleta, as amostras devem ser processadas e, em seguida, é realizado o isolamento utilizando meios seletivos ou não. Em geral, a amostra do solo deve ser seca ao ar, à temperatura ambiente, seguida da preparação da suspensão em água esterilizada ou solução de Ringer e agitação (*shaker*) durante 20 a 30 minutos, ou ainda, como sugere Hatano (1997), em solução de 0,05% de dodecil-sulfato de sódio (SDS), acrescido de 6% de extrato de levedura. As amostras de solo podem ser estocadas a

baixa temperatura (0-4°C). Para amostras provenientes de ambientes aquáticos, a concentração da população através de membranas filtrantes ou centrifugação constitui estratégia importante para o sucesso do isolamento. Para amostras de bagaço de cana-de-açúcar ou materiais de plantas em decomposição, a agitação em câmara de sedimentação facilita o isolamento de actinomicetos termofílicos, como relatado por Lacey & Dutkiewicz (1976).

Para o isolamento de actinomicetos endofíticos, o tecido vegetal — folha, raiz e caule — deve ser submetido a esterilização com etanol (70% a 96%), seguido de tratamento com hipoclorito de sódio (1 a 3%) e lavagens sucessivas com água destilada esterilizada, para realização do isolamento em meio seletivo com antifúngico (Fisher *et al.*, 1992; Schulz, 1993).

PRÉ-TRATAMENTO DA AMOSTRA

A população de actinomicetos na amostra pode ser aumentada por alguns pré-tratamentos químicos ou físicos que eliminam endosporos de bactérias nas placas de isolamento (Tabela 2).

O aquecimento diminui a proporção de bactéria para actinomiceto, podendo também diminuir o número de actinomicetos, mas, ainda assim, preserva a viabilidade de inúmeros actinomicetos. O tratamento por aquecimento tem sido usado com sucesso para isolar *Actinomadura*, *Microbispora* e *Rhodococcus*. A temperatura não reduz completamente o número de bactérias, mas reduz significativamente as bactérias Gram-negativas que invadem a superfície das placas, contaminando as colônias de actinomicetos no isolamento (Goodfellow & O'Donnell, 1989).

A filtração por membrana (0,45 µm) pode ser usada para concentração de propágulos de águas de diferentes procedências e também para eliminar muitas bactérias não filamentosas. A membrana é colocada na superfície do meio nutriente, onde pode permanecer ou ser retirada após algumas horas. O tipo de membrana utilizada pode ter efeito sobre o surgimento do número de colônias (Al-Diwany *et al.*, 1978).

Iwai & Takakashi (1992) sugerem que a amostra do solo a ser analisada pode ser tratada com penicilina ou outro antibiótico durante 3 a 5 horas sob agitação (*shaker*), lavagem por centrifugação para eliminar o antibiótico, seguida de diluição seriada e plaqueamento em meio seletivo onde se observam colônias isoladas de actinomicetos após o período de incubação.

TABELA 2. Pré-tratamento de material para isolamento de actinomicetos.

TRATAMENTO FÍSICO	MATERIAL	ISOLADOS	AUTORES
55°C/6 min	Água, solo, sedimentos	<i>Rhodococcus coprophilus</i> , <i>Micromonospora</i>	Rowbotham & Cross, 1977 Williams & Cross, 1971
50°C/ 60 min	Água	<i>Micromonospora</i>	Takizawa, 1993
120°C/60 min	Solo	<i>Streptosporangium</i> , <i>Microbispora</i>	Nonomura, 1989
100°C/15 min	Solo	<i>Actinomadura</i>	Athalye <i>et al.</i> , 1981
Membrana filtrante	Água	<i>Thermoactinomyces</i>	Al-Diwany <i>et al.</i> , 1978
Enriquecimento com CaCO ₃ / Incubação	Solo	<i>Streptomyces</i>	El Nakeeb & Lechevalier, 1963
Fio de cabelo humano	Solo	<i>Ampulariella</i>	Booth, 1971

Para o isolamento do grupo Actinoplanetes, que formam esporângios com esporos móveis, duas técnicas de enriquecimento da amostra foram desenvolvidas. Na primeira, conhecida como técnica da isca (Booth, 1971), coloca-se uma suspensão de solo em placa estéril ou a amostra de água que se deseja analisar, e na superfície líquida coloca-se um fio de cabelo humano ou grão de pólen como isca, e incuba-se este material por 2 ou 3 dias. Em seguida, os esporângios podem ser observados sob luz refletida, e poderão ser plaqueados em meios seletivos.

A outra técnica desenvolvida por Palleroni (1980) baseia-se no método quimiotático, onde os zoósporos liberados do esporângio podem ser atraídos pelos íons cloreto ou brometo. A amostra do solo (0,5 g) deve ser colocada em cada câmara de isolamento (Fig. 1a), adicionada de água estéril até a altura de 2 mm no canal de conexão. Em seguida, um tubo capilar contendo tampão fosfato 0,01 M (pH 7,0) e KCl 0,01 M é imerso no canal 1 mm abaixo da superfície da água (Fig. 1b), sendo em seguida levado para estufa 28-30°C por 1 hora. Durante este período

do, os esporos com motilidade são liberados do esporângio e são atraídos para o interior do tubo capilar por quimiotaxia. A solução do capilar deverá ser espalhada em placas com meio seletivo. A técnica do capilar tem se mostrado mais eficiente do que a técnica da isca.

Estes pré-tratamentos frequentemente exercem grande seletividade e direcionam o isolamento para um determinado taxon de actinomiceto.

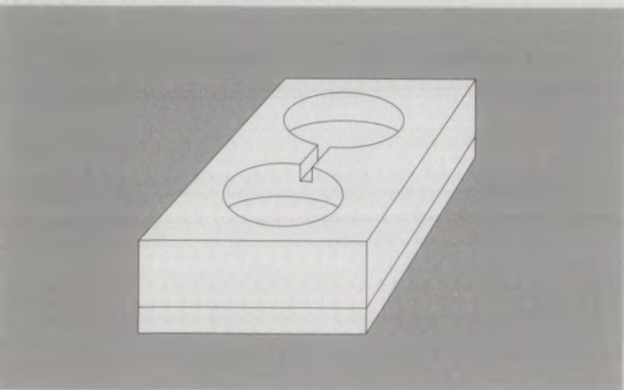


FIGURA 1A. Câmara de isolamento.

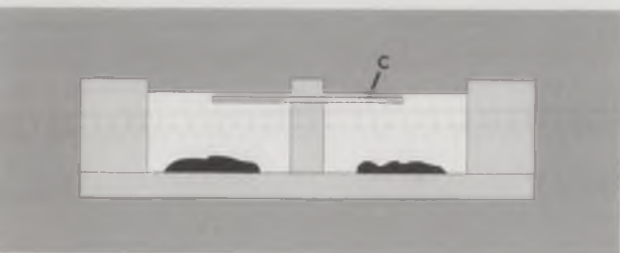


FIGURA 1B. Corte longitudinal da câmara de isolamento com o capilar (c) no canal abaixo da superfície líquida.

MEIOS SELETIVOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

A seletividade do meio de isolamento é influenciada pela sua composição em nutrientes, pH, adição de inibidores e pelas condições de cultivo. Muitos meios têm sido usados para o isolamento de actinomicetos, mas suas formulações não foram baseadas em critérios nutricionais ou fisiológicos. Entretanto, pelo uso continuado dos diversos meios de isolamento, pode-se concluir que as melhores fontes de carbono são amido, glicerol e quitina, enquanto caseína, asparagina e arginina se destacam como fontes orgânicas de nitrogênio. Os meios seletivos comumente utilizados para o isolamento de actinomicetos são amido-caseína-ágar (Kuster & Williams, 1964); quitina coloidal-

água (Hsu & Lockwood, 1975), glicerol-arginina-água (Porter *et al.*, 1960), meio M3 (Rowbotham & Cross, 1977) e água-água (Hunter-Cevera *et al.*, 1984).

O meio de quitina coloidal apresenta vantagens para isolamento de actinomicetos porque bactérias e fungos não crescem neste meio, sendo observadas apenas pequenas colônias de actinomicetos, que deverão ser transferidas para meios nutritivos mais ricos, como extrato de levedura-água e aveia-água (Shirling & Gottlieb, 1966). O meio de caseína-amido-água é um dos mais utilizados para exploração dos diferentes ecossistemas. A adição de cloreto de sódio (4,6%) ou o uso de água do mar (75% + 25% de água deionizada) a este meio favorece o isolamento de actinomicetos de ambiente marinho (Jansen *et al.*, 1991); para o isolamento de acidofílicos este meio deve ser acidificado (pH 3,5-5,5) com tampão fosfato. Para o isolamento do grupo nocardioforme, o meio M3 é nutricionalmente pobre, retardando o crescimento de bactérias e de *Streptomyces* e favorecendo o isolamento de actinomicetos de crescimento lento, como *Rhodococcus*. A adição de azida sódica e ácido nalidíxico nas concentrações de 3,5 mg e 5,0 mg, respectivamente, melhora a seletividade, segundo Mara & Oragui (1981).

Para o isolamento de actinomicetos termofílicos, o uso do meio extrato de papel-água e celulose-água (Hunter-Cevera *et al.*, 1984), seguido de incubação a 45-50°C, permite o isolamento seletivo de termoactinomicetos com atividade celulolítica (Araújo *et al.*, 1997).

Em geral, o gênero *Streptomyces* é facilmente isolado nestes meios em decorrência do seu rápido crescimento, superando o isolamento de outros gêneros como *Actinomadura*, *Kitasatosporia*, *Rhodococcus* e *Nocardia*, conhecidos como "actinomicetos raros" por causa do seu lento crescimento.

A maioria dos actinomicetos são neutrofílicos e o pH ideal usado nos meios fica em torno de pH 7,0. Entretanto, actinomicetos acidófilos crescem bem em pH de 3,5 a 5,5 e não crescem em pH 7,0. O uso do meio caseína-amido-água com pH 3,1 a 4,5 tem permitido isolar inúmeros actinomicetos de solos ácidos de florestas e de resíduos de minas, que são importantes no processo de decomposição desse tipo de solo (Hagedorn, 1976).

O tempo e a temperatura de incubação também podem contribuir para a seletividade do meio. Os mesofílicos crescem bem em temperatura de 25-30°C, enquanto os actinomicetos termofílicos são favoreci-

dos a 45-55°C. Em geral, o tempo de incubação para o crescimento de esporoactinomicetos mesofílicos varia de 7 a 14 dias, enquanto os termoactinomicetos crescem entre 2 e 3 dias. Com um tempo maior de incubação (4 a 6 semanas), porém, é possível isolar actinomicetos endofíticos como o gênero *Frankia*, ou isolar esporoactinomicetos como *Streptomyces*, *Streptosporangium*, *Microbispora*, endofíticos de culturas de milho e feijão utilizando tecidos vegetais (folhas e raiz). O tempo de incubação prolongado é um dos fatores que contribuem para o isolamento de actinomicetos endofíticos não-simbióticos (Silva *et al.*, 1995).

A incorporação de antibióticos ao meio de isolamento constitui uma estratégia importante que aumenta a seletividade do meio. Para prevenir ou inibir o crescimento de fungos, a adição de antibióticos antifúngicos ao meio de isolamento tem sido usada com sucesso, principalmente o uso combinado de cicloheximida (Actidione) e nistatina (50 µg/ml), que não têm nenhuma ação sobre os actinomicetos (William & Davis, 1965). Baixas concentrações de polimixina B (8,0 µg/ml) e penicilina G (0,8 µg/ml) aumentam a seletividade do meio de isolamento.

O pré-tratamento acoplado ao uso de meio seletivo com antibiótico pode proporcionar placas de isolamento com colônias de actinomicetos bem separadas, facilitando a contagem e o isolamento.

USO DE ANTIBIÓTICOS ANTIBACTERIANOS

O desenvolvimento da sistemática de actinomicetos à base de dados da taxonomia numérica pode fornecer informações (bioquímica, fisiologia, perfil de sensibilidade a antibióticos) ideais para a escolha mais racional dos meios seletivos para o isolamento de um determinado taxon (Goodfellow & O'Donnell, 1989).

A adição de antibióticos antibacterianos melhora a seletividade do meio, permitindo o isolamento de um determinado gênero ou espécie (Tabela 3). O uso combinado de benzilpenicilina (5-10 µg/ml) e ácido nalidíxico (15 µg/ml) permite isolar apenas o gênero *Saccharotrix*; enquanto com novobiocina (25 µg/ml) e estreptomomicina (15 µg/ml) é possível isolar o gênero *Glicomyces*. Através da taxonomia numérica, pode-se observar que *Streptoverticillium* apresenta maior resistência à neomicina e oxitetraciclina do que *Streptomyces*, e a adição de oxitetraciclina (25 µg/ml) ao meio seletivo proporciona o surgimento de inú-

meras colônias de *Streptoverticilium* nas placas de isolamento de diferentes amostras do solo; o uso de novobiocina (50 µg/ml) promoveu o isolamento seletivo de *Kitasatosporia*, que é mais resistente a este antibiótico que *Streptomyces* (Iwai & Takahashi, 1992).

TABELA 3. Uso de antibióticos antibacterianos para isolamento seletivo de actinomicetos.

ANTIBIÓTICO	ACTINOMICETO ISOLADO	REFERÊNCIA
Novobiocina, Estreptomina	<i>Glycomyces</i>	Labeda, 1989
Benzil-penicilina, Ácido nalidíxico	<i>Saccharotrix</i>	Labeda, 1989
Vancomicina	<i>Amycolatopsis</i>	Lechevalier, 1986
Tunicamicin	<i>Micromonospora</i>	Wakisaka <i>et al.</i> , 1982
Rifampicina	<i>Actinomadura</i>	Athalye <i>et al.</i> , 1981
Oxitetraciclina	<i>Streptoverticillium*</i>	Hanka <i>et al.</i> , 1985
Novobiocina	<i>Kitasatosporia</i>	Takahashi, 1991

*considerado sinonímia de *Streptomyces*.

Vickers *et al.* (1984) e Williams *et al.* (1984) também analisaram o comportamento fisiológico de diferentes espécies de *Streptomyces*, e desenvolveram o meio rafinose-histidina ágar para isolamento seletivo das espécies *S. chromofuscus*, *S. cyaneus* e *S. rochei*.

SELEÇÃO DA COLÔNIA

Esta é a etapa de maior dificuldade no processo de isolamento, por que a contagem e caracterização das colônias de actinomicetos exige paciência do microbiologista. Em geral, as colônias de esporoactinomicetos apresentam consistência cartilaginosa, aderindo firmemente ao meio sólido através do micélio vegetativo, e podem ser reconhecidas utilizando-se um estereoscópio. Em particular, o grupo *Streptomyces* mostra colônias pequenas pulverulentas ou velutinas, com micélio aé-

reio de diferentes tonalidades (branco, cinza, rosa etc.). As colônias também podem produzir pigmentos solúveis de cores diversas; são colônias bem distintas daquelas de bactéria típica. Estas características fenotípicas dependerão da composição do meio de cultura (Cross, 1989).

Entretanto, os actinomicetos nocardioformes apresentam colônias friáveis, isto é, que se partem ao toque com a alça de platina e exibem fragmentação da hifa em cocos e bastonetes. O micélio aéreo é fracamente desenvolvido, não sendo observada a ocorrência de hifas longas.

As colônias podem ser selecionadas ao acaso ou com base em alguma característica morfológica, e torna-se difícil distinguir entre diferentes espécies de um mesmo gênero nas placas de isolamento primário. As colônias selecionadas deverão ser transferidas para outros meios (aveia-ágar e glicerol-asparagina ágar) para proporcionar bom crescimento do micélio aéreo, permitindo assim uma melhor caracterização e posterior identificação.

A identificação de actinomicetos, em termos de espécie, requer técnicas especializadas da quimiosistemática e da sistemática molecular.

A identificação de gênero baseada apenas na morfologia raramente é segura, mesmo para microbiologistas experientes. A quimiosistemática associada à micromorfologia é um critério adotado para a identificação de gêneros de actinomicetos, como relatado por Lechevalier (1989). Diferentemente das bactérias típicas, os actinomicetos formam vários tipos de conídios que podem ser utilizados na sua classificação. Estes conídios são formados no micélio aéreo ou no micélio vegetativo, ou em esporângios contendo esporos com motilidade ou não. Os critérios químicos são fundamentados nos estudos de Lechevalier & Lechevalier (1970, 1980), que determinaram, por cromatografia, diferentes tipos de parede celular com ocorrência ou não do ácido diaminopimélico (DAP) em sua forma meso-DAP ou LL-DAP, e também o diagnóstico da presença de açúcares no hidrolisado celular, revelado por cromatografia de papel. Estes estudos associam vários tipos de parede celular a determinados grupos genéricos. Estudos detalhados de gênero e espécie podem ser encontrados na 9ª edição do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, volume 4 (1989).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-DIWANY, L.J., UNSDORTH, B.A.; CROSS, T.A. comparison of membrane filters for counting *Thermoactinomyces* endospores in spore suspensions and river water. **Journal of Applied Bacteriology**, v.45, p.249-258, 1978.
- AMNER, W.; EDWARDS, C.; MCCARTHY, A.J. Improved medium for recovery and enumeration of the farmer's lung organisms, *Saccharomonospora viridis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, p.2669-2674, 1989.
- ARAÚJO, J.M.; SILVA, I.M.; ANDRADE LIMA, M.A. Isolation of macromolecules degrading thermotolerant actinomycetes of municipal solid waste disposal in Recife, Brazil. Trabalho apresentado no VII Congress of Biotechnology and Bioengineering and II International Symposium on Bioprocess Engineering, México, set. 1997.
- ATHALYE, M.; LACEY, J.; GOODFELLOW, M. Selective isolation and enumeration of actinomycetes using rifampicin. **Journal of Applied Bacteriology**, v.51, p.289-297, 1981.
- BARCINA, I.; IRIBERI, J.; EGEE, L. Enumeration, isolation and some physiological properties of actinomycetes from sea water and sediment. **Systematic and Applied Microbiology**, v.10, p.85-91.
- BOOTH, T. Occurrence and distribution of chytrids chytridiaceous fungi and some actinomycetales from solis of Oregon, California and Nevada. **Canadian Journal of Botany**, v.49, p.939-949, 1971.
- BRITO, K.C.; ARAÚJO, J.M. Ação antibacteriana de actinomicetos endofíticos isolados da folha e da raiz do feijão (*Phaseolus vulgaris*). Trabalho apresentado no VII Congresso de Iniciação Científica da UFRPE, Recife, dez. 1997.
- BULL, A.T.; GOODFELLOW, M.; SLATER, J.H. Biodiversity as a source of innovation in Biotechnology. **Annual Review of Microbiology**, v.46, p.219-252, 1992.
- CALLAHAM, D.; DEL-TRIDICI, P.; TORREY, J.G. Isolation and cultivation *in vitro* of the actinomycetes causing root nodulation in Comptonia. **Science**, v.199, p.899-902, 1978.
- CHATER, K.F.; HOPWOOD, D.A. *Streptomyces*. In: SONENSHEIN, A.L.; HOCH, J.A.; LOSICK, R., ed **Bacillus subtilis and other Gram-positive bacteria**. s.l.: s.n., 1993. p.83-89.
- CRAWFORD, D.L. Biodegradation of agricultural and urban wastes. In: GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S.T.; MORDARSKI, M. **Actinomycetes in biotechnology**. s.l.: s.n., 1988. p.433-459.
- COELHO, R.R.R.; DROZDOWICZ, A.G. The occurrence of Actinomycetes in a cerrado soil in Brazil. **Review Ecologie et Biologie du Soil**, v.15, p.459-473, 1978.
- CROSS, T. Aquatic actinomycetes a critical survey of the occurrence, growth and role of actinomycetes in aquatic habitats. **Journal of Applied Bacteriology**, v.50, p.397-424, 1981.
- CROSS, T. Growth and examination of actinomycetes – Some guidelines. In: WILLIAMS, S.T.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G., ed. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 9.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1989. v.4, p.2340-2343.
- EL-NAKEEB, M.A.; LECHEVALIER, H.A. Selective isolation of aerobic actinomycetes. **Applied Microbiology**, v.11, p.75-77, 1963.
- FISHER, P.J.; PETRINI, O.; LAPPIN-SCOTT, H.M. The distribution of some fungal and bacteria endophytes in maize (*Zea mays* L.). **New Phytologist**, v.127, p.99-305. 1992.
- GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S.T. Ecology of Actinomycetes. **Annual Review of Microbiology**, v.37, p.189-216, 1983.
- GOODFELLOW, M.; O'DONNELL, A.G. In: BAUMBERG, S.; HUNTER, I.S.; RHODES, P.M., ed **Microbial products: new approaches**. Cambridge: Cambridge University Press, 1989. p.343-383.
- HAGEDORN, C. Influence of soil acidity on *Streptomyces* populations inhabiting forest soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v.32, p.368-375, 1976.
- HANKA, L.J.; RUEKERT, P.W.; CROSS, T.A. method for isolation strains of the genus *Streptoverticillium* from soil. **FEMS Microbiology Letters**, v.30, p.365-368, 1985.
- HATANO, K. Actinomycete populations in mangrove rhizospheres **IFO Research Communications**, n.18, p.26-31, 1997.
- HELMKE, E.; WEYLAND, H. *Rodhococcus marinonascens* sp. nov., actinomycete from the sea. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.34, p.127-138. 1984.

- HSU, S.C.; LOCKWOOD, J.L. Powdered chitin as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. **Applied Microbiology**. v.29, p.422-426, 1975.
- HUNTER-CEVERA, J.C.; FONDA, M.E.; BELT, A. Isolation of cultures. In: DEMAINA, A.L.; SOLONON, N.A. **Industrial microbiology and biotechnology**. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1984. p.3-23.
- IWAI, Y.; TAKAHASHI, Y. Selection of microbial sources of bioactive compounds. In: OMURA, S., ed. The search for bioactive compounds from microorganisms. New York: Springer-Verlag, 1992. p.281-302.
- JENSEN, P.R.; DWIGHT, R.; FENICAL, W. Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. **Applied and Environmental Microbiology**. v.57, p.1102-1108, 1991.
- LIANG, C.L.; XU, L.H. Diversity of aquatic actinomycetes in lakes of the middle plateau, Yunnan, China. **Applied and Environmental Microbiology**. v.62, p.249-253, 1996.
- KHAN, M.R.; WILLIAMS, S.T. Studies on the ecology of actinomycetes in soil. VIII. Distribution and characteristics of acidophilic actinomycetes. **Soil Biology and Biochemistry**. v.7, p.345-348, 1975.
- KUSTER, I.; WILLIAMS, S.T. Selection of media for isolation of Streptomyces. **Nature**. London, v.202, p.928-929, 1964.
- LABEDA, 1989. Genus *Glycomyces* Labeda, Testa, Lechevalier and Lechevalier. In: WILLIAMS, S.T.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G., ed. **Bergey's manual of systematic bacteriology** 9 ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1985. v.4, p.2586-2589.
- LACEY, J.; DUTKIEWICZ, J. Isolation of actinomycetes and fungi from mouldy hay using a sedimentation chamber. **Journal of Applied Bacteriology**. v.41, p.315-319, 1976.
- LANCINI, G.; LORENZETTI, R. **Biotechnology of antibiotics and other bioactive microbial metabolites**. New York: Plenum Press, 1993. 235p.
- LECHEVALIER, H.A.; LECHEVALIER, M.P. Introduction of the order Actinomycetales. In: STARR, M.P.; STOLP, H.; TRUPER, H.G.; BALOW, A.; SCHLEGEL, H.G., ed. **The prokaryotes**: a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria. Berlin: Springer-Verlag, 1981. v.2, p.1915-2123.
- LECHEVALIER, H.A. A practical guide to generic identification of actinomycetes. In: WILLIAMS, S.T., ed. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1989. p.2344-2347.
- LECHEVALIER, M.P. Actinomycetes in agriculture and forestry. In: GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S.T.; MORDARSKI, M., ed. **Actinomycetes in biotechnology**. s.l.: s.n. 1988. p.327-358.
- LECHEVALIER, M.P.; LECHEVALIER, H.A. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v.20, p.435-443, 1970.
- LECHEVALIER, M.P.; PRAUSER, H.; LABEDA, D.P.; RUAN, J.S. Two new genera of nocardioform actinomycetes. *Amycolata* gen. nov. and *Amycolatopsis* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v.36, p.29-37, 1986.
- LECHEVALIER, M.P.; LECHEVALIER, H.A. The chemotaxonomy of actinomycetes. In: DIETZ; THAYER, ed. **Actinomycetes + taxonomy**. Arlington: Society for Industrial Microbiology, Arlington, 1980. p.237-291. (Special Publication, 6).
- LIU, S.; TANG, W. The study on endophytic streptomyces of cotton. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON BIOLOGICAL CONTROL OF PLANT DISEASES. 1996, Beijing, China. **Proceedings** s.l.: s.n., 1996.
- MARA, D.D.; ORAGUI, J.J. Occurrence of *Rhodococcus coprophilus* and associated actinomycetes in feces, sewage and freshwater. **Applied Environmental Microbiology**. v.42, p.1037-1042, 1981.
- MATSUURA, T.; SILVA, I.M.; ARAÚJO, J.M. Diversidade genética de actinomicetos endofíticos isolados do feijão (*Vigna unguiculata*). Trabalho apresentado no XIII Encontro de Genética do Nordeste, Feira de Santana, Bahia, abr. 1998.
- MCCARTHY, A.J.; CROSS, T. A note on a selective isolation medium for the thermophilic actinomycete *Thermomonospora chromogena*. **Journal of Applied Bacteriology**. v.51, p.299-301, 1981.
- MCCARTHY, A.J.; WILLIAMS, S.T. Methods for studying the ecology of actinomycetes. In: **Methods in microbiology**. New York: Academic Press, 1990. v.22, p.529-563.
- MCCARTHY, A.J.; WILLIAMS, S.T. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment - a review. **Gene**. v.115, p.189-192, 1992.
- MOLAN, R.D.; CROSS, T. Isolation and screening of actinomycetes. In: GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S.T.; MORDARSKI, M., ed. **Actinomycetes in biotechnology**. Orlando: Academic Press, 1988.

- NONOMURA, H. Genus *Streptosporangium* Couch 1955. In: WILLIAMS, S.T.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G., ed. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 9.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1989. v.4, p.2340-2343.
- OKAMI, Y.; OKAZAKI, 1972. Studies in Marine actinomycetes. I. Isolation from the Japan Sea. *Journal of Antibiotics*, v.25, p.456-460, 1972.
- ORCHARD, V.A.; GOODFELLOW, M. The selective isolation of *Nocardia* from soil using antibiotics. *Journal of General Microbiology*, v.85, p.160-162.
- ORCHARD, V.A.; GOODFELLOW, M. Numerical classification of some named strains of *Nocardia asteroides* and related isolates from soil. *Journal of General Microbiology*, v.118, p.295-312, 1980.
- PALLERONI, N.J. A chemotactic method for the isolation of *Actinoplanaceae*. *Archives of Microbiology*, v.128, p.53-55, 1980.
- PERCICH, J.A.; LOCKWOOD, J.L. Interaction of atrazine with soil micro-organisms: population change and accumulation. *Canadian Journal of Microbiology*, v.24, p.1145-1152, 1978.
- PORTER, J.N.; WILHELM, J.J.; TRESNER, H.D. Method for the preferential isolation of actinomycetes from soils. *Applied Microbiology*, v.8, p.174-178, 1960.
- QUISPEL, A.; BURGGRAAF, A.J.P.; BORSJE, H.; TAK, T. The role of lipids in the growth of *Frankia* isolates. *Canadian Journal of Botany*, v.61, p.2801-2806, 1993.
- ROWBOTHAM, T.J.; CROSS, T. Ecology of *Rhodococcus coprophylus* and associated actinomycetes in fresh water and agricultural habitats. *Journal of General Microbiology*, v.100, p.231-240, 1977.
- SARDI, P.; SARACCHI, M.; QUARON, S.; PETROLUNI, G.; BORGONOV, E.; MERLI, S. Isolation of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized roots. *Applied and Environmental Microbiology*, v.58, p.2691-2693.
- SCHULZ, B.; WANKE, U.; DRAEGER, S.; AUST, H.J. Edophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilizations methods. *Mycological Research*, v.12, p.1447-1450, 1993.
- SILVA, A.C.; ARAÚJO, J.M.; AZEVEDO, J.L. Ocorrência de actinomicetos endofíticos em milho (*Zea mays*) In: REUNIÃO ANUAL DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, 20., 1995, Piracicaba. *Anais* Piracicaba: SBG, 1995. p.125.
- SHIRLING, E.B.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.16, p.313-340, 1996.
- SORKHOH, N.A.; GHANNIDUM, M.A.; IBRAHIM, A.S.; STRETTON, R.J.; RADWAN, S.S. Sterol and diacetylglycerolphosphocholines in the lipids of the hydrocarbon-utilizing prokaryote *Rhodococcus rhodochrous*. *Journal of Applied Bacteriology*, v.69, p.856-863, 1966.
- STAMFORD, T.L.M. Actinomicetos endofíticos isolados do jacatupé *Pachyrhizus erosus* L. Urban produtores de enzimas amilolíticas. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 1997. 196p. Tese de Doutorado.
- TAKAHASHI, Y.; SEKI, Y.; IWAI, Y.; OMURA, S. Taxonomic properties of five *Kitasatosporia* strains isolated by a new method. *Kitasato Archives of Experimental Medicine*, v.64, p.123-132, 1991.
- TAKIZAWA, M.; COLWEL, R.R.; HILL, R.T. Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake Bay. *Applied and Environmental Microbiology*, v.59, p.997-1002, 1993.
- VICKERS, J.C.; WILLIAMS, S.T.; ROSS, G.W. A taxonomic approach to selective isolation of Streptomyces from soil. In: ORTIZ-ORTIZ; BOJALIL; YAKOLEFF, ed. *Biological, biochemical and biomedical aspects of actinomycetes*. Orlando: Academic Press, 1984. p.553-561.
- WAKISAKA, Y.; KAWAMURA, Y.; YASUDA, Y.; KOIZUMI, K.; NISHIMOTO, Y. A selective isolation procedure for *Micromonospora*. *Journal of Antibiotics*, v.35, p.822-836, 1982.
- WILLIAMS, S.T.; CROSS, T. Actinomycetes. In: *Methods in microbiol.* New York: Academic Press, 1971. p.295-334.
- WILLIAMS, S.T.; DAVIES, F.L.; MAYFIELD, C.I.; KHAN, M.R. Studies on the ecology of actinomycetes in soil. II the pH requirements of Streptomyces from two acid soils. *Soil Biology and Biochemistry*, v.3, p.187-195, 1971.
- WILLIAMS, S.T.; DAVIES, F.L. Use of antibiotics for selective isolation and enumeration of actinomycetes in soil. *Journal of General Microbiology*, v.38, p.251-267, 1965.
- WILLIAMS, S.T.; LANNING, S.; WELLINGTON, E.M.H. Ecology of Actinomycetes. In: GOODFELLOW, M.; MORDARSKI, M.; WILLIAMS, S.T., ed. *The Biology of the Actinomycetes*. London: Academic Press, 1984. p.481-528.
- ZHANG, Z.; WANG, Y.; RUAN, J. A proposal to revive the genus *Kitasatospora* (Omura, Takahashi, Iwai and Tanaka 1982). *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.47, p.1048-1054, 1997.



15

MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS

Dirce Mithico Yamaoka-Yano

Departamento de Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109, CEP 13081-970, Campinas, SP

Pedro José Valarini

EMBRAPA Meio Ambiente
Caixa Postal 69, CEP 13820-000, Jaguariúna, SP

INTRODUÇÃO

Uma identificação acurada de microrganismos requer culturas puras e, embora a economia no tempo seja um fator importante, é sempre aconselhável plaquear colônias de culturas selecionadas para checagem da pureza.

O caminho para caracterizar uma bactéria é descrever qualitativamente as muitas propriedades relativas à morfologia, cultivo, nutrição, bioquímica, metabolismo, proteínas, ácidos nucleicos, patogenicidade e ecologia. Caracterização é um pré-requisito na identificação, e representa uma das bases da sistemática.

Devido a um grande número de microrganismos distribuídos em uma variedade de grupos taxonômicos diferentes, não é fácil o uso de um método padrão para a caracterização e identificação de bactérias. Porém, é aconselhável seguir um método padronizado, usando-se requerimentos mínimos para a caracterização. Também é importante considerar o tipo do microrganismo em estudo. Por exemplo, os testes usados para bactérias fototróficas são diferentes daqueles usados para as quimiorganotróficas.

Procedimentos de identificação devem ser checados com culturas de microrganismos conhecidos que fornecem resultados positivos e negativos. Tais culturas de referência ou linhagens-tipo estão disponíveis nos centros de referência ou nas coleções de culturas.

Muitos métodos convencionais (testes bioquímicos) usados na identificação de microrganismos estão sendo substituídos por tiras de papel, discos e baterias de testes sob a forma de "kits". Esses novos métodos oferecem a vantagem de diminuir o tempo de serviço, porém uma escolha adequada deve ser feita entre os muitos produtos disponíveis comercialmente.

Métodos quimiosistemáticos estão sendo usados com certa frequência para a identificação de microrganismos, principalmente aqueles que fornecem dados quantitativos e cujos resultados podem ser analisados por computador. Perfil eletroforético de proteínas, perfil de ácidos graxos e pirólise estão substituindo os métodos convencionais.

O conhecimento da terminologia utilizada na taxonomia de um microrganismo é parte integrante da identificação. Assim, pode-se dizer que classificação e identificação não são sinônimos. A classificação define grupos taxonômicos, e a identificação determina um organismo de taxonomia desconhecido para um grupo correto. Enquanto a classificação estabelece um arranjo ordenado de grupos taxonômicos, a identificação tenta comparar um organismo desconhecido com organismos padrões já estabelecidos, a fim de determinar se deve ser considerado como um membro de um desses grupos. Alguns podem ver a identificação como uma aplicação prática de classificação, permitindo o reconhecimento correto de um microrganismo como um membro de um grupo taxonômico pré-existente.

Um sistema de identificação deve permitir eficiência e segurança na distinção de microrganismos. Para fins de identificação, qualquer sistema de classificação artificial será eficiente, desde que permita que o organismo seja identificado com aqueles outros que foram previamente colocados no sistema.

Embora classificação e identificação de microrganismos sejam processos distintos, ambos requerem culturas puras para serem examinados. As características usadas num sistema de identificação são limitadas por aquelas de caráter significativo, o que distingue um grupo do outro. Via de regra, o sistema de identificação tenta usar um mínimo de características para se obter uma identificação mais segura. Como a

finalidade desses sistemas é fazer uma identificação correta e eficiente, as características incluídas nos sistemas de identificação são muitas vezes diferentes daquelas usadas nos sistemas de classificação.

Taxonomia é a ciência da classificação. Como ciência, é dinâmica e sujeita a mudanças com base nos dados disponíveis. Novos dados são necessários para que ocorram mudanças na taxonomia. Estas mudanças frequentemente resultam na mudança de uma classificação já existente, na nomenclatura, no critério para identificação e no reconhecimento de uma nova espécie.

A sistemática bacteriana pode ser dividida em três áreas principais:

Classificação é um arranjo ordenado do organismo com características fenotípicas e genotípicas semelhantes dentro de um determinado grupo.

Nomenclatura é o significado através do qual as características de uma espécie são definidas, e é dado um nome de acordo com as regras internacionais recomendadas pelo International Committee of Systematic Bacteriology.

Identificação é o uso prático de uma classificação para distinguir um organismo de interesse.

Embora não seja oficial, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology é aceito internacionalmente para classificação e identificação de bactérias.

IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS

Métodos Tradicionais — Série Bioquímica

Para determinar suas características, as bactérias devem ser cultivadas puras, isto é, de células que são desenvolvidas a partir de uma única célula ou de uma única colônia isolada. Numa rotina, para economizar tempo, é suficiente usar subculturas de uma colônia simples isolada.

A temperatura de incubação correta é muito importante para se obter resultados adequados. Como regra, testes devem ser feitos sob temperatura ótima de crescimento. Para muitas bactérias de importância clínica, duas temperaturas são suficientes para testes de identificação, 35-37°C, e para bactérias Gram-negativas não-fermentativas de glicose, 30°C.

O requerimento de oxigênio é importante no isolamento de colônias. Testes devem ser feitos sob condições ótimas de exigências atmosféricas, isto é, no ar (aeróbias e anaeróbias facultativas), no nitrogê-

nio com 10% de CO₂ e 5% de O₂ (organismos microaerófilos) e menos de 1% de O₂ (anaeróbios).

Para obter resultados reproduzíveis, o tempo de incubação é de grande importância. Em um estágio de multiplicação suficiente, deve-se obter no meio líquido uma turbidez ou precipitação, ou um bom crescimento superficial no meio sólido. Para se obter um bom crescimento, o meio de cultura pode ser suplementado com 5% de soro bovino ou por fatores de crescimento nas bactérias fastidiosas, e com 3 a 7% de NaCl para as bactérias halofílicas. O tempo padrão de incubação é específico para cada teste e, assim, um período de incubação mais curto do que o prescrito é geralmente suficiente, especialmente se o teste for positivo.

O crescimento também é influenciado pelo tamanho do inóculo e o volume do meio de teste. O inóculo é especificado na quantidade "ponta de agulha" do meio sólido ou 0.2-0.3 ml do meio líquido. O volume do meio de teste é de 2-3 ml para tubos estreitos (diâmetro de 10 a 12 mm) ou 5-6 ml para os tubos de diâmetro de 16 mm. Para placas de Petri de 90 mm de diâmetro, deve ser usado cerca de 25 ml de meio.

Um ponto essencial na identificação é o controle de qualidade. Todos os meios de cultura e reagentes devem ser testados com culturas apropriadas ou linhagem-tipo antes de serem colocados no uso rotineiro. Linhagem-tipo é uma linhagem que foi designada como padrão representativo de uma dada espécie. Todas as outras linhagens incluídas como pertencentes à mesma espécie devem ser comparadas com a linhagem-tipo.

A Tabela 1 mostra testes primários que nem sempre são suficientes para a caracterização de bactérias, e testes específicos, que são complementares para uma identificação mais segura.

CHAVE DE IDENTIFICAÇÃO

As tentativas clássicas de identificação de microrganismos envolvem o desenvolvimento de tabelas de diagnósticos e chaves de identificação. Uma chave de identificação consiste em uma série de questões que conduzem para um sistema de classificação seguro e na determinação da identidade do microrganismo.

Numa chave, as propriedades descritivas devem estar dispostas de uma forma que os microrganismos possam ser facilmente identificados. São agrupados porque apresentam alguma propriedade de fácil reconhecimento.

Chaves dicotômicas ou chaves de diagnósticos estão entre as primeiras formas de esquemas de identificação de bactérias. São sistemas seqüenciais onde a identificação é conseguida passo a passo. A diagnose segue progressivamente por rotas ramificadas, dependendo das reações positivas ou negativas dos testes. O caminho da identificação é unidirecional, e um simples erro na determinação de uma característica ou uma característica atípica poderá resultar em erro na identificação. Exemplos de chaves de identificação são apresentados na Fig. 1.

TABELA 1. Requerimentos mínimos e testes específicos normalmente usados na caracterização e identificação de bactérias.

REQUERIMENTO MÍNIMO PARA IDENTIFICAÇÃO		TESTES ESPECÍFICOS
Morfologia Celular	coloração de Gram teste com KOH forma, arranjo e motilidade de esporos	posição e número de flagelos cápsulas inclusões
Características de Crescimento	pigmentação	colônia em meio sólido: forma, superfície, consistência, elevação, borda, odor colônia em meio líquido: depósito, turbidez
Características Fisiológicas	requerimento de oxigênio T°C ótima de crescimento	tolerância à temperatura, pH fatores de crescimento inibição por antibióticos: meios seletivos, NaCl
Características Bioquímicas	utilização de glicose: fermentativo, oxidativo, inerte catalase oxidase	produção de ácidos a partir de açúcares redução de nitrato denitrificação Voges Proskauer Vermelho de metila descarboxilase de arginina: lisina, ornitina hidrólise de amido: gelatina, esculina, Tween 80 utilização de citrato: malonato produtos de fermentação hemólise

FIGURA 1. Exemplo de uma chave simplificada.

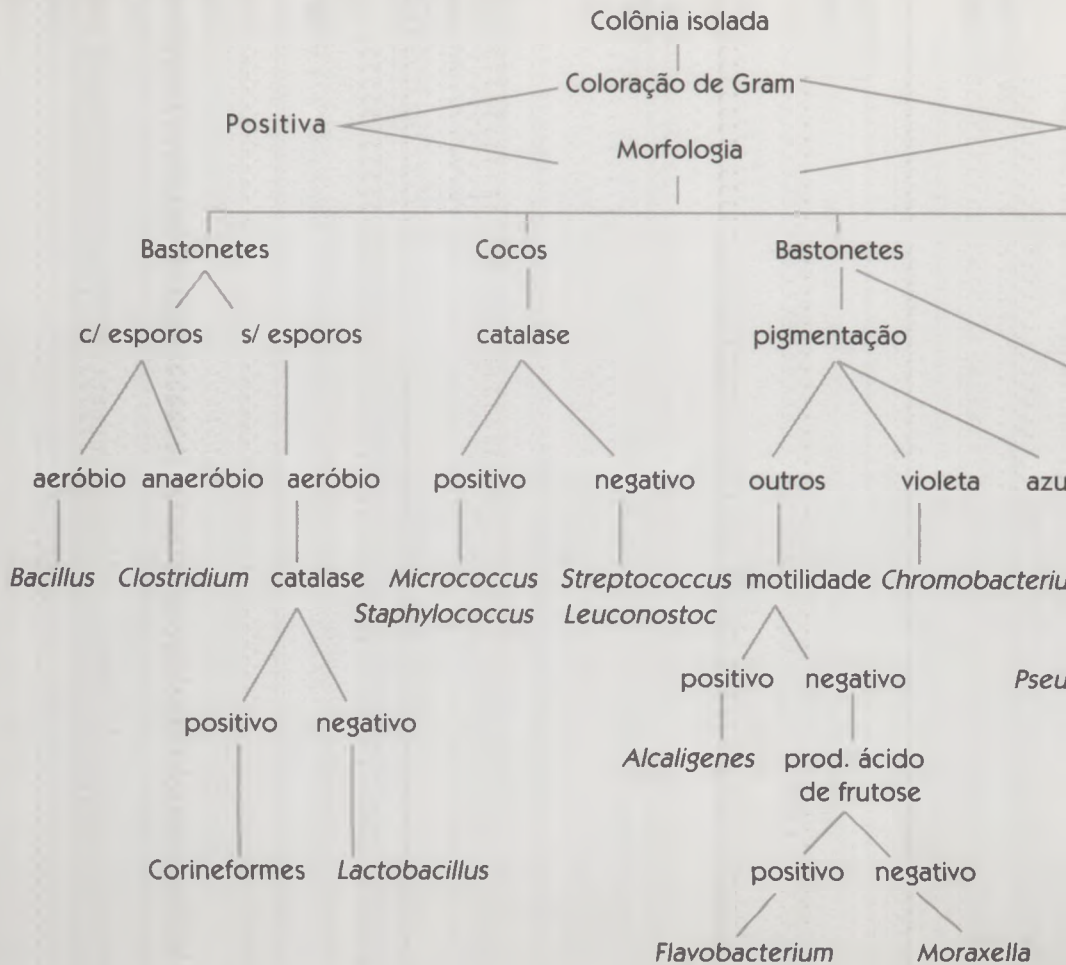


TABELA DE DIAGNÓSTICOS

Complementando as chaves de identificação, existem as tabelas de diagnósticos que podem ser desenvolvidas para auxiliarem na identificação de microrganismos. Tais tabelas sumarizam as características de grupos taxonômicos, mas não indicam uma separação hierárquica da taxa. Tabelas de diagnósticos geralmente são mais complicadas do que chaves de identificação porque contém muito mais informações. Entretanto, nos casos onde algumas características são variáveis para diferentes grupos, tabelas de diagnósticos são melhores do que as chaves para uma identificação segura do microrganismo. As Tabelas 2 e 3 mostram exemplos de tabelas de diagnósticos para diferenciar gêneros de bactérias não-fermentadoras e bactérias fitopatogênicas, respectivamente.

MÉTODOS RÁPIDOS E AUTOMAÇÃO

Métodos rápidos e automação em microbiologia são uma área relativamente nova e dinâmica e estão, em sua maioria, baseados em métodos tradicionais ou série bioquímica. Com a utilização de técnicas bioquímicas, químicas, biofísicas, imunológicas e sorológicas, os estudos para melhoria nos métodos para o isolamento, caracterização e enumeração de microrganismos isolados têm apresentado um grande desenvolvimento nas últimas décadas.

Kits Comerciais

Apesar da variedade de "kits" disponíveis no mercado, o seu uso tem sido restrito. Muitos foram direcionados para propósitos específicos, principalmente na identificação de grupos de bactérias de importância médica. Dentro dessa restrição, existem aqueles que alcançaram sucessos confiáveis, mas podem surgir problemas quando o "kit" é usado para outras finalidades, como identificação de uma grande variedade de isolados do meio-ambiente. Neste contexto, é importante notar que o meio-ambiente natural contém uma variedade maior de taxa do que a encontrada nos laboratórios clínicos.

Essencialmente, dois tipos de "kits" comerciais foram desenvolvidos: aqueles que visam respostas bioquímicas dos microrganismos e aqueles baseados em reações sorológicas.

TABELA 2. Exemplo de uma tabela de diagnóstico para diferenciar gêneros de bactérias não fermentadoras.

CARACTERÍSTICA	<i>PSEUDOMONAS</i>	<i>ALCALIGENES</i>	<i>ACHROMOBACTER</i>
MacConkey agar	+	+	+
Motilidade	+	+	+
Glicose	+, -	-	+
Oxidase	+	+	+
Hidrólise de uréia	+, -	-	+, -
Indol	-	-	-
Ceto-lactose	-	-	-
% G+C	58-70	57-70	66.9-69.8
CARACTERÍSTICA	<i>FLAVOBACTERIUM</i>	<i>MORAXELLA</i>	<i>ACINETOBACTER</i>
MacConkey agar	+	+	+
Motilidade	-	-	-
Glicose	+	-	-
Oxidase	+	+	-
Hidrólise de uréia	-	-	-
Indol	-	-	+
Ceto-lactose	-	-	-
% G+C	36	40-46	39-47

“Kits” medem reações bioquímicas desenvolvidas no centro de cavidades dispostas em fileiras ou tiras de papel impregnadas com vários substratos liofilizados. Estes são reidratados por inoculação com uma suspensão bacteriana e, após um período pré-determinado de incubação, os resultados são verificados por mudança de cor, geralmente depois da adição de reagentes. A identificação pode ser conseguida em 24 horas ou até menos.

Alguns critérios devem ser considerados:

- Não existe um “kit” universal. Alguns organismos como *Corynebacterium diphtheriae*, nocardias e mycobacteria não podem ser identificados por estes métodos rápidos.

- Cuidados são necessários na interpretação dos resultados. Um resultado via “kit” pode sugerir organismos improváveis ou inviáveis, e uma análise mal feita dos resultados pode causar equívocos.

TABELA 3. Exemplo de uma tabela de diagnóstico para diferenciar gêneros de bactérias fitopatogênicas.

CARACTERÍSTICA	<i>CORYNEBACTERIUM</i>	<i>AGROBACTERIUM</i>	<i>ERWINIA</i>
Gram-positiva	+	-	-
Colônias amarelas ou laranjas	+	-	-
Pigmento em meio King	-	-	-
Crescimento anaeróbico	-	-	+
Mais de 4 flagelos peritríquios	-	-	+
Crescimento em D-L agar	-	+	-
CARACTERÍSTICA	<i>PSEUDOMONAS</i>	<i>XANTHOMONAS</i>	
Gram-positiva	-	-	
Colônias amarelas ou laranjas	-	+	
Pigmento em meio King	+	-	
Crescimento anaeróbico	-	-	
Mais de 4 flagelos peritríquios	-	-	
Crescimento em D-L agar	-	-	

- Métodos convencionais, tiras de papel ou discos possibilitam que o usuário faça sua própria escolha dos testes. Com “kit” isto já não é possível; os métodos contêm de 10 a 20 testes padronizados, mesmo que o usuário não necessite de todos os testes.

- Métodos convencionais, tiras de papel ou discos geralmente requerem o julgamento do usuário, enquanto nos “kits” os resultados são interpretados por tabelas, gráficos ou programas de computador.

- Se a identificação final depende de sorologia, poucos testes seletivos serão adequados.

- Se a identificação depende dos testes bioquímicos, quanto mais testes usados, mais seguros serão os resultados. “Kits” podem, então, ser métodos de escolha quando o organismo é desconhecido, em investigações epidemiológicas e também quando os serviços manufaturados de “kits” são particularmente úteis.

Alguns sistemas de “kits” comerciais disponíveis no mercado:

Sistemas API (Analytab Products, Plainview, NY)

Suspensões de células são adicionadas nas cavidades plásticas e incubadas por 24 horas. Alguns testes requerem adição de reagentes. Os resultados são analisados e registrados por códigos num perfil de registros. Há também serviços de computação para identificação.

API 20E – *Enterobacteriaceae*, Gram-negativos não-fermentadores.

API 20S – Estreptococos.

API 20A – Anaeróbios.

Staph-Ident (Analytab Products, Plainview, NY)

Placas de plástico contendo substratos desidratados para 20 reações de caracterização de *Staphylococcus* spp.

Rapid E (Analytab Products, Plainview, NY)

Semelhante ao API 20 E, porém com 21 reações e incubação por 4 horas.

Enterotubos (Roche Diagnostic Systems, Nutley, NJ)

São usados para identificação de *Enterobacteriaceae*. É um tubo plástico contendo substratos para 15 testes bioquímicos padrões e um fio de metal que atravessa cada substrato de ponta a ponta. Após a remoção da tampa com o inóculo na ponta do fio, passa-se o fio de metal ao longo dos compartimentos-testes com movimentos rotatórios. Os tubos são fechados e incubados a 37°C por 18 a 24 horas. Alguns testes necessitam de adição de reagentes.

Oxi-Ferm

Este sistema permite a identificação de organismos Gram-negativos não-fermentadores. O sistema Oxi-Ferm é semelhante ao enterotubo, porém oito meios diferentes são usados no tubo para a identificação.

Micro ID System (Organon Teknika Corp., Durham, NC)

O sistema identifica *Enterobacteriaceae* utilizando substratos incorporados em tiras de papel. O sistema Micro ID é baseado nos resultados de 15 testes bioquímicos, e podem ser analisados em menos de 4 horas. Os resultados são interpretados com o auxílio de um manual de códigos.

Minitek II System (BBL Microbiology Systems, Cockersville, MS)

Permite a identificação de *Enterobacteriaceae*, Gram-negativos não-fermentadores (são 21 reações), cocos Gram-positivos (são 20 reações), *Neisseria* spp. (são 4 reações de caracterização). Consiste em discos de papel impregnados com substratos desidratados, nos quais uma suspensão celular é adicionada para a determinação de reações características. Período de incubação variável, dependendo do organismo em teste. Resultados são interpretados utilizando-se uma tabela de cores.

Minitek Anaerobe II

Semelhante ao Minitek II, são 20 reações de caracterização, incubação em condições anaeróbicas.

Computadores facilitam e auxiliam na identificação de microrganismos. Quando são usados, os dados obtidos de um microrganismo desconhecido podem ser rapidamente comparados com o banco de dados contendo as informações sobre as características de um taxon definido. É possível usar tabelas de diagnósticos em conjunto com computador. As tabelas são incorporadas dentro da memória do computador, os resultados de organismos desconhecidos são comparados com cada uma das possibilidades e a correlação mais alta é dada como uma identificação.

Os sistemas de identificação computadorizados têm sido desenvolvidos para avaliar a probabilidade estatística de identificação de microrganismos. Tal tipo de sistema de identificação muitas vezes envolve o desenvolvimento e o uso de matrizes de probabilidade, que são compilações de frequência de ocorrência das características de um microrganismo desconhecido dentro de um grupo taxonômico. Estas matrizes de probabilidade são desenvolvidas para caracterizar um número grande de linhagens pertencentes a cada grupo taxonômico. Deste modo, a variabilidade do grupo para uma característica particular pode ser determinada. Os resultados de um microrganismo isolado são rapidamente comparados com as matrizes de probabilidade.

Seguem alguns "kits" que usam programas de computador na identificação de bactérias.

RapidNH (Innovative Diagnostic Systems, Atlanta, GA)

Este sistema identifica *Neisseria*, *Haemophilus* e *Moraxella* spp. Suspensões celulares são inoculadas nas cavidades com substratos e incu-

bados. Após a incubação, reagentes são adicionados. Os resultados são analisados e comparados com padrões do manual ou por meio de serviços de computador.

Biolog Nutritional System (Biolog Inc., Hayward, CA)

Biolog MicroPlates testa a habilidade de uma bactéria utilizar (oxidar) 95 diferentes fontes de carbono pré-selecionadas. A identificação da bactéria é reproduzida por uma combinação de propriedades metabólicas dos isolados com a base de dados dos padrões. Os testes GN MicroPlate são para Gram-negativas, enquanto os GP MicroPlate são para Gram-positivas. Uma suspensão de bactérias (150 μ l) em 0.85% de salina é dispensada com multipipetador em cada uma das cavidades da placa e incubadas por 18 a 24 horas, entre 33 e 35°C. Os resultados podem ser analisados visualmente ou por meio de leitor de placas. Neste caso, a leitura deve ser feita no comprimento de 590 nm.

Vitek (Vitek Systems, Hazelwood, MO)

O sistema é rápido e muito usado nas indústrias. O material é inoculado nas cavidades por um multipipetador. Um módulo computadorizado faz leitura, e a identificação é feita após 8 horas de incubação. O sistema serve para a caracterização de anaeróbios (ANI), *Bacillus* spp. (Bacillus Biochemical Card), Gram-negativos (Gram-negative identification card – GNI) e Gram-positivos (Gram-positive identification card – GPI).

MÉTODOS SOROLÓGICOS

Existem vários métodos de reações sorológicas já descritas, incluindo “whole-cell agglutination” (WCA), aglutinação em látex, testes diretos e indiretos com anticorpos fluorescentes, imunohistoquímica e ensaios imunoenzimáticos (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay – ELISA). A principal vantagem de testes sorológicos é a rapidez, e em alguns casos, como no WCA, o diagnóstico pode ser conseguido em poucos minutos. Com certos métodos como ELISA, existem “kits” disponíveis comercialmente. Resumindo, sorologia pode ser usada para identificar culturas bacterianas, componentes subcelulares ou bactérias embebidas com tecidos. A condição é a obtenção de um anticorpo seguro.

MÉTODOS QUÍMICOS

Avanços recentes na bioquímica dos microrganismos têm revelado que as análises dos componentes celulares estão se tornando instrumentos essenciais na identificação e sistemática das bactérias.

Para que esses componentes celulares tenham efeito significativo na identificação das bactérias, devem estar normalmente presentes entre as bactérias a serem estudadas, e os dados devem ser homólogos entre as bactérias dentro de um taxon, enquanto existem diferenças significativas entre as taxa.

A estrutura celular da maioria das bactérias é semelhante à primeira vista, principalmente DNA, membrana citoplasmática e a parede celular. Entretanto, a ultra-estrutura desses componentes apresenta diferenças significativas e estas diferenças estão na sua natureza química. A variação desses componentes não está distribuída igualmente entre as bactérias. Cada tipo de variação é encontrada entre as bactérias do mesmo grupo, o que significa que essas diferenças químicas são específicas do taxon e são valiosas para identificação e classificação das bactérias.

A sistemática baseada nos componentes químicos é denominada quimiotaxonomia ou quimiosistemática. Os métodos clássicos de testes bioquímicos e fisiológicos podem ser considerados influenciados por fatores de crescimento, e às vezes os testes fornecem resultados variáveis e instáveis. Assim, um resultado negativo nem sempre significa ausência de atividade, podendo ser uma resposta ao fraco crescimento do microrganismo. Para tanto, as culturas devem crescer nas mesmas condições e devem ser usadas no mesmo estágio de crescimento, para assegurar a uniformidade das influências do meio. Porém, isto pode ser difícil, e às vezes impossível, se os organismos diferem fisiologicamente, como termófilos, psicrófilos, aeróbios e microaeróbios. Um dos pontos positivos da quimiosistemática é o fato de possibilitar a análise química dos microrganismos crescendo em diferentes condições de cultivo.

Quando comparamos bactérias somente na composição química dos componentes celulares, a variação observada é o resultado de diferenças genéticas e não de um efeito do meio-ambiente. Dentre os vários componentes químicos usados, somente DNA e RNA cromossômico não são afetados pelas condições de cultivo.

O progresso no desenvolvimento de instrumentos analíticos, principalmente na tecnologia dos métodos cromatográficos, como a cromatografia,

tografia em camada delgada (TLC), gasosa (GC), líquida-gasosa (GLC) e líquida de alta eficiência (HPLC), tornou frequente o uso dos métodos quimiosistemáticos, que podem ser operados em qualquer laboratório. Com o uso dessas técnicas é possível separar e identificar as moléculas químicas encontradas nos diferentes componentes celulares.

Os métodos químicos variam na rapidez e facilidade do uso, porém, no conjunto, produzem dados valiosos para esquemas de identificação. Portanto, a quimiosistemática fornece um suplemento útil para os métodos tradicionais na identificação e classificação, desde que sejam tomados os cuidados necessários.

Principais componentes celulares usados na identificação de bactérias:

- parede celular – estrutura de peptidoglicanos, ácido murâmico, açúcares;
- membrana citoplasmática – distribuição de fosfo e glicolipídeos, isoprenos e quinonas, ácidos graxos;
- membrana externa – lipopolissacarídeos, ácidos micólicos.

Peptidoglicano

O peptidoglicano é o principal componente da parede celular de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e cianobactérias. A estrutura química do peptidoglicano das bactérias Gram-negativas, com poucas exceções, é praticamente uniforme. Entretanto, muitas bactérias Gram-positivas apresentam uma variação qualitativa na estrutura primária do peptidoglicano devido à composição de aminoácidos e açúcares. Esses dados fornecem informações importantes que contribuem para a identificação e classificação dessas bactérias. Nas bactérias Gram-positivas, a composição de aminoácidos da parede celular é um critério importante em termos de gênero, enquanto a composição dos açúcares pode auxiliar na distinção entre espécies.

Os métodos para determinar diferenças nos tipos de peptidoglicano são especializados e não costumam ser usados rotineiramente para um grande número de bactérias.

Proteínas

O perfil eletroforético de proteínas tem fornecido valiosas informações adicionais nos estudos de identificação e sistemática de microrganismos e tem sido aplicado com sucesso para vários microrganismos de importância médica e ecológica.

A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) de proteínas totais, proteínas solúveis de bactérias, produz padrões de bandas que podem ser considerados como marcas (impressões) altamente específicas dentro de diferentes taxa de bactérias. Uma das técnicas eletroforéticas mais usadas é a eletroforese de proteínas totais (ou proteínas da parede celular) na presença de um detergente aniônico dodecilsulfato de sódio (SDS).

O conjunto de padrões de bandas pode ser quantificado e comparado por meio do uso de técnicas computadorizadas, permitindo a elaboração de uma base de dados de identificação automatizada de amostras de bactérias.

Assim, SDS-PAGE de padrões de proteínas totais combinada com a análise do computador permite a identificação de um número de diferentes tipos de perfis eletroforéticos de várias espécies de bactérias. Taxonomicamente, este método diferencia níveis de espécies e sub-espécies.

Embora haja a necessidade de manter as condições de cultivo das bactérias padronizadas, a eletroforese de proteínas oferece vantagens como a estabilidade do padrão eletroforético, a comparação dos perfis eletroforéticos fornece uma medida segura da relação taxonômica de amostras analisadas, os padrões podem ser armazenados em base de dados (como registro de densitometria) e comparados por técnicas de análise numérica, uma vez estabelecidos perfis eletroforéticos definidos e seguros, bibliotecas de referências podem ser construídas para a identificação de novos isolados.

Lipídeos, ácidos graxos

Os estudos sobre a fisiologia e o metabolismo de lipídeos e ácidos graxos de vários microrganismos, juntamente com o desenvolvimento de métodos e procedimentos práticos para a sua determinação, têm fornecido dados suficientes para a caracterização e identificação de microrganismos.

Os lipídeos de microrganismos são encontrados na parede celular como ácidos livres, glicolipídeos e formando complexos com polisacarídeos. Existem quatro classes importantes: ácidos graxos de cadeia longa, ácidos micólicos, lipídeos polares e quinonas isoprenóides.

Os ácidos graxos componentes da célula de uma bactéria não são alterados por condições de cultivo, porém sua composição é afetada.

Para comparar a composição dos ácidos graxos dentro de um grupo de bactérias, condições de cultivo devem ser padronizadas para todas as amostras que serão analisadas.

Muitos lipídeos, mas não todos, são removidos por extração com um solvente orgânico. No entanto, para determinar ácidos graxos totais, as células devem ser hidrolizadas com ácido ou base. A hidrólise é o ponto crítico na obtenção de resultados finais confiáveis.

Alterações na composição de alguns metil ésteres de ácidos graxos (FAMES) entre bactérias podem ser observadas por TLC. As amostras são aplicadas numa placa de sílica e desenvolvidas com uma mistura de hexano e dietil éter (4:1,v/v). De acordo com a polaridade, o fracionamento auxilia na separação e a identificação por cromatografia líquida-gasosa (GLC).

Os ácidos micólicos de alto peso molecular são encontrados somente em algumas linhagens de *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*. As moléculas contêm um número total de carbonos de 24 a 90 e atuam como uma barreira impermeável na reação "acid fast" e coloração negativa de Gram. Diferenças na estrutura dos ácidos micólicos são critérios utilizados na classificação e identificação dos membros dessas taxa.

Ocorrendo em todas as bactérias, os lipídeos polares são muitas vezes considerados como lipídeos livres, desde que possam ser extraídos facilmente por embebição das células em solventes orgânicos apropriados. São facilmente analisados por TLC. Os mais comuns são os fosfolipídeos, incluindo outros tipos como os glicolipídeos. Fosfolipídeos ocorrem em muitas bactérias, mas actinomicetos e corineformes contêm fosfolipídeos característicos. Os glicolipídeos estão amplamente distribuídos entre as bactérias Gram-positivas e são usados como marcadores químicos.

Os isoprenóides ou quinonas respiratórias são encontrados na membrana plasmática de todas as bactérias aeróbias e são constituídas de dois tipos: isoprenóides menaquinonas e isoprenóides ubiquinonas. Apresentam funções importantes no transporte de elétrons, fosforilação oxidativa e possivelmente no transporte ativo. São extraídos normalmente com solventes orgânicos e analisadas por TLC ou HPLC de fase reversa.

Muitas bactérias contêm ubiquinonas ou menaquinonas, ou ambas. Bactérias Gram-negativas estritamente aeróbias apresentam somente ubi-

quinoínas com 9 unidades isopreno, enquanto as bactérias entéricas (anaeróbias facultativas) contêm uma mistura de menaquinonas e ubi-quinonas. Bactérias Gram-negativas estritamente anaeróbias produzem somente menaquinonas. Nas bactérias láticas geralmente há ausência de isoprenóides, e a maioria das bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* apresentam menaquinonas.

A análise de ácidos graxos por HPLC é também muito usada na identificação de microrganismos devido à facilidade no processo de automação. A produção de um perfil leva cerca de 60 a 90 minutos, e o equipamento compara os perfis com os traços armazenados no computador.

Pirólise de componentes celulares

Outro método que oferece vantagens pela rapidez e automação é a pirólise.

Pirólise é uma técnica na qual uma amostra orgânica é decomposta através de um aquecimento rápido, e os produtos decompostos são analisados por GLC (PGLC). A técnica é semelhante a outras formas de GLC, onde apenas os compostos que são voláteis sob as condições de análise serão separados e detectados.

No entanto, em alguns casos, dados desses estudos não são muito confiáveis. Por exemplo, os pirogramas de diferentes espécies de bactérias podem apresentar resultados idênticos, com pequenas diferenças quantitativas que dificultam a leitura e comparação dos cromatogramas.

Assim, as técnicas na instrumentação de PGLC têm sido melhoradas com o uso de colunas capilares para maior resolução e com o emprego de computadores para coleta, armazenamento e processamento de dados.

A PGLC pode ser usada juntamente com o espectrômetro de massa (pirólise-MS) para se obter informações químicas sobre os produtos resultantes da pirólise. Espectrometria de massa de microrganismos pirolizados resulta em perfis de massa de íons que diferem entre as linhagens. A análise de dados que fornece as diferenças entre espécies é bastante complexa, sendo baseada em vários procedimentos de exclusão, e na qual é determinada uma combinação de caracteres quantitativos que melhor diferenciam um conjunto estabelecido de taxa. A análise de diferenciação simplesmente indica aqueles caracteres que melhor definem a taxa. Essencialmente, o método envolve a determinação dos perfis de

padrões de referência. Perfis de organismos desconhecidos podem então ser comparados com os padrões de referência, e a identificação é determinada com os padrões de correlação. O método é mais complexo e de custo mais elevado do que PGLC, mas tem a vantagem de ser mais rápido, com resultados avaliados por computador.

MÉTODOS BASEADOS NA ANÁLISE DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

Determinação na Composição das Bases do DNA

A parte mais laboriosa deste método é a preparação e purificação do material. Essencialmente, células são lisadas com detergentes, tal como o dodecil sulfato de sódio (SDS). Células Gram-positivas devem ser antes digeridas com lisozimas. As proteínas são removidas por digestão de uma protease não-específica (por exemplo, pronase) e desproteínização química usando fenol ou clorofórmio. O RNA é removido com RNase e o DNA pode ser seletivamente precipitado na presença de ribooligonucleotídeos por isopropanol. DNA é concentrado e purificado por precipitação em etanol. É importante que o DNA esteja livre de proteínas, RNA e carboidratos, porque esses componentes podem interferir nas análises da determinação da composição das bases. Para maiores detalhes sobre extração de DNA, consultar o capítulo 7.

Estimativa direta na composição dos nucleotídeos do DNA envolve a hidrólise, seguida de uma separação e quantificação dos produtos por HPLC. Embora a análise por HPLC seja mais rápida, ela é menos usada do que a análise físico-química. Esta análise mede alguns parâmetros físicos da molécula dupla e relaciona em % mol G+C usando uma fórmula empírica. Entre as bactérias, o valor de % mol G+C é constante para um dado organismo.

Hibridização

A aplicação da biologia molecular, particularmente técnicas de hibridização de ácidos nucléicos, tem revolucionado a identificação de microrganismos através do desenvolvimento de sondas (probes) de ácidos nucléicos. Se dois organismos diferem fenotipicamente, isto é, um reflexo de diferenças na seqüência do genoma, esta diferença pode ser

detectada, pelo menos teoricamente, por uma sonda de hibridização. Quando comparações lado a lado são feitas e comparadas, por sua vez, com os padrões documentados, este método pode ser apropriado para identificação. Os padrões são geralmente simples e não são adequados para a identificação de um organismo desconhecido contra uma grande variedade de gêneros. É mais um método onde a identidade aproximada de um organismo desconhecido é conhecida, e para quando existe a necessidade de uma distribuição a nível de subespécies ou biótipos.

Na hibridização com o DNA, as sondas podem ser direcionadas a uma variedade de seqüências dependendo dos objetivos do teste. Existem duas classes de sondas, as desenvolvidas empiricamente e aquelas direcionadas a uma seqüência de bases específica. Sonda empírica é feita a partir de todo o DNA celular.

Outra aplicação muito usada das sondas é hibridização direta do DNA de colônias, sem a necessidade da extração do mesmo e separação em gel de agarose. Colônias sobre placas são transferidas para uma membrana de nitrocelulose, lisadas e então processadas para retirar as proteínas e desnaturação dos ácidos nucléicos para uma fita simples. A hibridização é então feita diretamente no filtro de nitrocelulose. Um problema muito comum neste procedimento é a presença de materiais contaminantes, mas pode ser minimizado por uma modificação nas condições de processamento.

Este método tem sido usado nos estudos do meio-ambiente, tais como enumeração e detecção de bactérias de solo e do conteúdo de rúmen de animais. Tem também aplicação na detecção e manutenção de plasmídeos liberados por microrganismos, em particular organismos geneticamente manipulados (GEMS).

Reação PCR (Polymerase Chain Reaction – Reação da Polimerase em Cadeia)

A técnica se baseia na amplificação de seqüências conhecidas do DNA.

Consiste numa reação enzimática em cadeia de uma seqüência específica do DNA usando iniciadores, “primers” (oligonucleotídeos sintéticos) que hibridizam a fita oposta e flanqueiam a região de interesse no DNA-alvo. Uma série de ciclos repetitivos envolve a denaturação do “template” pela elevação da temperatura para 94 a 95°C. Na fase do anelamento do “primer”, a temperatura é reduzida para uma média

entre 55 a 72°C dependendo da composição das bases, comprimento e seqüência do "primer" utilizado, permitindo a hibridização DNA-DNA de cada "primer" com as seqüências complementares que flanqueiam a região-alvo.

A elongação dos "primers" anelados por DNA polimerase (a temperatura é elevada para 72°C) resultam num acúmulo exponencial de um fragmento específico do DNA-alvo. A extensão do "primer", produto sintetizado em um ciclo, serve como um "template" para o próximo ciclo. O número de cópias do DNA alvo dobra a cada ciclo. Assim, 20 ciclos de PCR produzem amplificação de cerca de 1 milhão de vezes.

O uso da técnica PCR oferece vantagens em relação às metas tradicionais de identificação porque o método é rápido e versátil, possibilitando que um grande número de isolados possa ser caracterizado em curto espaço de tempo.

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA – Poliformismo de DNA Amplificado ao Acaso)

Também conhecida como AP-PCR (Arbitrarily Primed – Polymerase Chain Reaction), uma vez que os "primers" possuem seqüência arbitrária, mas a amplificação ocorre em lugares específicos no genoma, e não ao acaso. Esta técnica está sendo usada com certa freqüência na pesquisa de identificação de fungos e bactérias, apresentando vantagens em relação aos outros métodos, como rapidez, processamento de grande número de microrganismos, isenção da utilização de sondas radioativas. Também proporciona uma redução no custo e aumento na segurança utilizando menores quantidades de DNA, não necessitando de informações sobre seqüência de nucleotídeos do genoma.

Entretanto, para a utilização desta técnica deve-se trabalhar com culturas puras do microrganismo, pois os "primers" são aleatórios e podem reconhecer qualquer DNA contaminante que esteja na mistura. O capítulo 8 deste volume descreve o uso da técnica RAPD nos estudos de ecologia microbiana.

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism – Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição)

O polimorfismo no comprimento de fragmentos obtidos por corte da fita dupla de DNA é evidenciado pela fragmentação do DNA através do uso de enzimas de restrição, que resulta em fragmentos de diferen-

tes comprimentos, e por hibridização destes fragmentos com seqüências homólogas de DNA marcadas com radioatividade. Para a detecção do polimorfismo é necessário que as seqüências dos nucleotídeos nas fitas de DNA de dois ou mais organismos sejam distintas.

A técnica de RFLP vem sendo utilizada para investigar as relações fitopatogênicas de fungos e bactérias em vários níveis taxonômicos, principalmente nos níveis de subespécies, variedades, formas específicas. Apesar da eficiência da técnica na identificação de microrganismos, há algumas desvantagens como custo elevado, necessidade de radioisótopos, além da complexidade do método para ser utilizado rotineiramente.

CONCLUSÃO

A escolha de um método adequado para identificar um microrganismo deve ser feita de acordo com a natureza da investigação, o conhecimento profissional, a habilidade do pesquisador ou da equipe técnica e a disponibilidade do laboratório. Além disso, o conhecimento sobre o procedimento de consulta à literatura correlata é fundamental para o êxito na identificação segura de um microrganismo.

Considerando que os métodos tradicionais de identificação de bactérias apresentam limitações de tempo e segurança, sobretudo quando se trata de subespécies, variedades etc, e até mesmo de espécies morfológicamente semelhantes, a pesquisa tem recorrido com grande intensidade ao uso de técnicas moleculares, principalmente em casos de microrganismos para o uso biotecnológico. Técnicas moleculares baseadas na imunologia e análise de ácidos nucléicos têm sido aplicadas nas diversas áreas da microbiologia, como técnicas complementares de identificação, com algumas vantagens: rapidez, segurança e especificidade no diagnóstico.

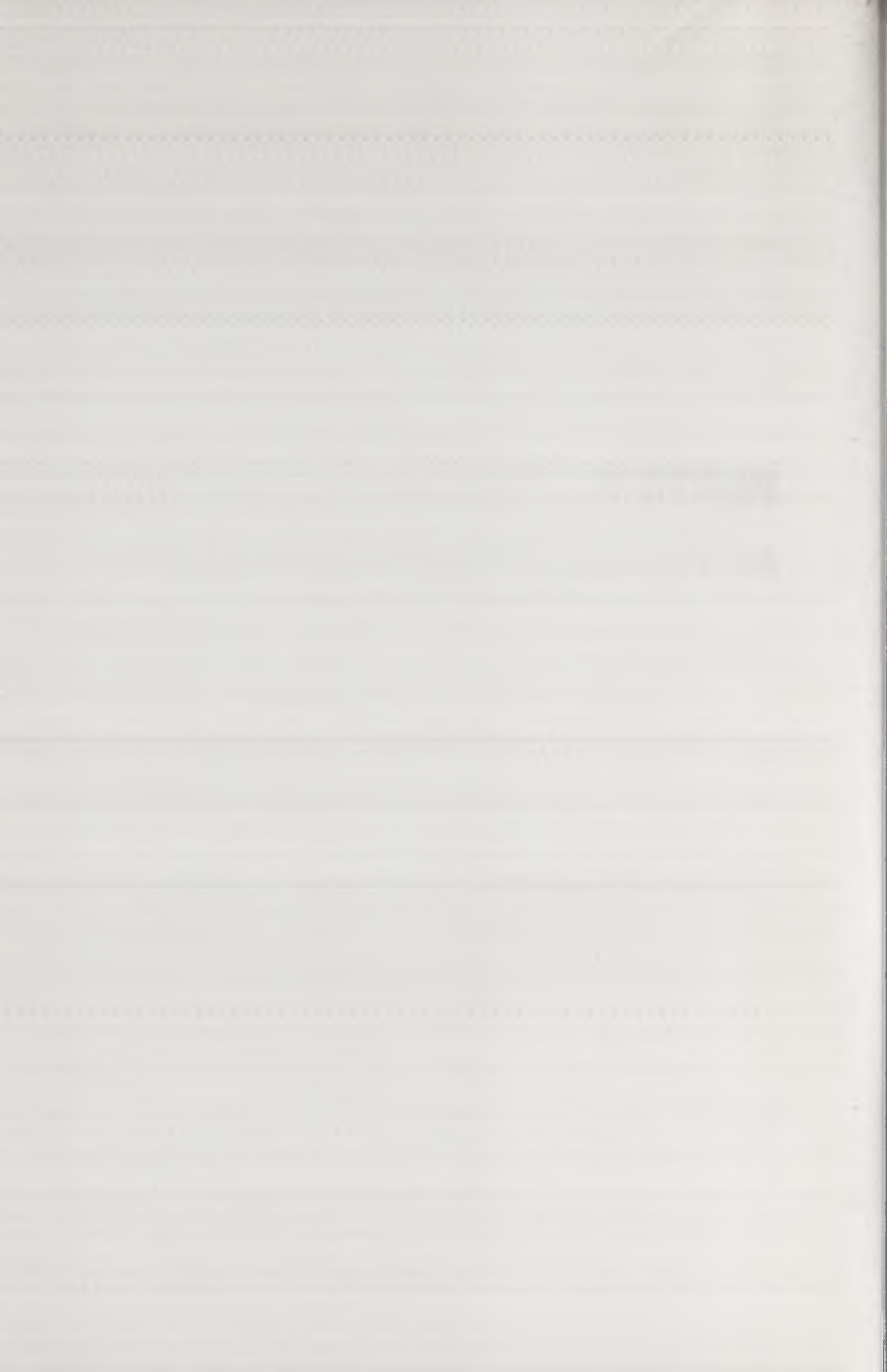
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATLAS, R.M. **Microbiology fundamentals and applications**. 2.ed., New York, Macmillan Publishing Company, 785p., 1989.
- CODINGTON, A.; GOULD, D.S. Use of RFLP to identify races of fungal pathogens. p.162-176. In: DUNCAN, J.M.; TORRANCE, L. (eds), *Techniques for the Rapid Detection of Plant Pathogens*. Cambridge, Cambridge University Press, 1992.

- COLLINS, C.H.; LYNE, P.M.; GRANJE, J.M. **Microbiological Methods**. 6.ed., Oxford, Butterworth & Co Ltd, 1989.
- COWAN, S.T.; STELL, C. **Manual for identification of medical bacteria**. Cambridge, Cambridge University Press, 238p., 1979.
- ERLICH, H.A. **PCR Technology. Principles and applications for DNA amplifications**. USA, WH. Freeman and Company, 246p., 1992.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 220p., 1995.
- FUNG, D.Y.C. Handbook for rapid methods and automation in microbiology. 13. Workshop on Rapid Methods and Automation in Microbiology, Kansas, Kansas State University, 174p., 1993.
- GERHARDT, P. **Manual of methods for general bacteriology**. Washington DC, American Society for Microbiology, 524p., 1981.
- GERHARDT, P.; MURRAY, R.G.E.; WOOD, W.A.; KRIEG, N.R. **Methods for general and molecular bacteriology**. Washington DC, American Society for Microbiology, 791p., 1994.
- GOODFELLOW, M.; MINNIKIN, D.E. **Chemical methods in bacterial systematics**. London, Academic Press, Inc., 410p., 1985.
- GOODFELLOW, M.; O'DONNELL, A.G. **Chemical methods in prokaryotic systematics**. Chichester, John Wiley & Sons, 555p., 1994.
- GORDON, R.E.; HAYDNES, W.C.; EPANG, C.H. The genus *Bacillus*. In: Agriculture Handbook n.427. Agriculture Research Service, United States Department of Agriculture, Washington DC, 283p., 1973.
- GOTTSCHALK, G. **Methods in Microbiology**. v.18, Academic Press, 383p., 1985.
- HENSON, J.M.; FRENCH, R. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**. Palo Alto, v.31, p.81-109, 1993.
- KERSTERS, K.; POT, B.; DEWETTINCK, D.; TORCK, U.; VANCANNEYT, M.; VAUTERIN, L.; VANDMME, P. Identification and typing of bacteria by protein electrophoresis. In: Bacterial diversity and systematics. F.G. Priest *et al.*(eds.), Plenum Press, New York, p.51-66, 1994.
- KOCHER, T.D.; WHITE, T.J. Evolutionary analysis via PCR. p.137-151. In: ERLICH, H.A. (ed.), PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification. New York, Stockton University Press, 1989.
- KRIEG, J.G.; SNEATH, P.H.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T.; HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. Baltimore, Williams & Wilkins, 1994.
- LANYI, B. Classical and rapid identification methods for medically important bacteria. p.1-65. In: Methods in Microbiology. v.19. New York, Academic Press, Inc.,
- LENETTE, E.H.; BALOWS, A.; HAUSLER, W.J.; SHADOMY, H.J. **Manual of clinical microbiology**. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1149p., 1985.
- MACFADDIN, J.F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. 2.ed., Baltimore, Williams & Wilkins, 511p., 1980.
- MITSUOKA, T. **A color atlas of anaerobic bacteria**. Tokyo, 329p. 1980
- PRIEST, F.; AUSTIN, B. **Modern bacterial taxonomy**. 2.ed, London, Chapman & Hall, 228p., 1993.
- RICKWOOD, D.; HAMES, B.D. **Gel electrophoresis of nucleic acids**. 2.ed, Oxford, Oxford University Press, 311p., 1990.
- TARR, M.; STOLP, H.; TRUPER, H.; BALOWS, A.; SCHLEGEL, H. **The Prokaryotes**. v.I-II, Berlin Heidelberg, New York, Springer-Verlag, 2271, p.1981.
- TALARINI, P.J.; MELO, I.S.; YAMAOKA-YANO, D.M.; PINHATI, M. E.M.C.; CARVALHO, D.F. **Identificação de rizobactérias utilizadas como agente de controle biológico de doenças de plantas**. p.443-449. In: HUNGRIA, M. *et al.* (eds.), Microbiologia do solo: Desafios para o século XXI. Londrina, IAPAR-EMBRAPA/CNPQ, 1996.
- ABUUTI, E. **Glucose non-fermentative Gram-negative rods**. In: Illustrated laboratory technique. serie 14. Tokyo, Igaku-Shoin, 90p., 1977.

PARTE V

METABÓLITOS MICROBIANOS



BIOSSÍNTESE DE ANTIBIÓTICOS PEPTÍDICOS EM MICRORGANISMOS

Augusto Etchegaray

Biologia Celular e Molecular, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo
Caixa Postal 96, CEP 13400-970, Piracicaba, SP

INTRODUÇÃO

Metabólitos secundários são compostos especiais com estruturas geralmente diferentes das de metabólitos primários como açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos, dos quais são derivados. Entre estes compostos encontram-se antibióticos, pigmentos, toxinas, indutores de competição ecológica e simbiose, pesticidas, inibidores de enzimas, agentes moduladores de resposta imunológica, agentes anti-tumorais, feromônios e promotores de crescimento de animais e plantas (Demain, 1992). O metabolismo secundário não é essencial para o crescimento dos microrganismos que os produzem, mas é uma via alternativa que colabora para a sua sobrevivência na natureza. Metabólitos originários desta via possuem estruturas químicas pouco comuns como novos açúcares e nucleosídeos, policetídeos e peptídeos cíclicos compostos por aminoácidos não naturais. A produção de metabólitos secundários por microrganismos encontra ampla aplicação na área de fármacos e de agroquímicos (Robinson, 1988). Entre os microrganismos utilizados citam-se actinomicetos, fungos filamentosos e algumas linhagens de *Bacillus* produtoras de antibióticos-peptídicos. Streptomicetos, em especial, produzem substâncias variadas como policetídeos e peptídeos com aminoácidos não protéicos (Robinson, 1988; Donadio *et al.*, 1991; Katz & Donadio, 1993; Kleinkauf & von Döhren, 1995).

ANTIBIÓTICOS PEPTÍDICOS

Antibióticos de estrutura peptídica podem ser elaborados sem a participação direta do ribossoma através de uma série de reações catalizadas por enzimas multifuncionais chamadas peptídeo sintetases (Kleinkauf & von Döhren, 1987, 1990, 1996; Marahiel, 1992; Stachelhauss & Marahiel, 1995). Neste caso, a adição de inibidores da síntese protéica como cicloheximida não inibe a síntese peptídica, enfatizando a característica de um processo não ribossomal.

Alguns antibióticos, também com estrutura peptídica, são sintetizados pelo ribossoma, sendo porém constituídos somente por aminoácidos protéicos. Embora geneticamente codificados, sofrem diversas modificações pós-translacionais como no caso dos lantibióticos (Fig. 1a), antibióticos-peptídicos de estrutura complexa produzidos por diversas bactérias Gram-positivas que têm como característica a presença de resíduos de lantionina (Hansen, 1993).

Diversos peptídeos já foram identificados como originários da via não-ribossômica (para uma lista atualizada, consultar Kleinkauf & von Döhren, 1996). Estes metabólitos possuem estruturas lineares ou cíclicas, sendo compostos por aminoácidos modificados, incluindo ácidos graxos e hidroxídeos, como no caso de iturinas e eniatinas, respectivamente (Maget-Dana & Peypoux, 1994; Zocher *et al.*, 1982). Em cianobactérias, por exemplo, peptídeos altamente tóxicos para mamíferos (microcistinas) são produzidos por enzimas multifuncionais (Meissner *et al.*, 1996; Börner, 1996). Característica destas cianotoxinas é a presença do aminoácido Adda (ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-deca-4, 6-dienóico), composto por 20 átomos de carbono (Fig. 1b).

Diversos lipopeptídeos são produzidos por *Bacillus subtilis*, como surfactina (Vater, 1986), micosubtilina e bacilomicina (Landy *et al.*, 1948; Besson *et al.*, 1978); estes últimos pertencem a uma classe de lipopeptídeos chamados iturinas (Besson *et al.*, 1976; Maget-Dana & Peypoux, 1994) (Fig. 1c). Iturinas atuam sobre a membrana citoplasmática de fungos, contribuindo para o antagonismo de *B. subtilis* (Phae *et al.*, 1990; Klich *et al.*, 1991, 1994; Citernesi *et al.*, 1994). Surfactina não é um bom fungicida, mas suas propriedades surfactantes potencializam a atuação da iturina, havendo portanto um sinergismo na atuação destes antibióticos (Thimom *et al.*, 1992; Asaka & Makoto, 1996).

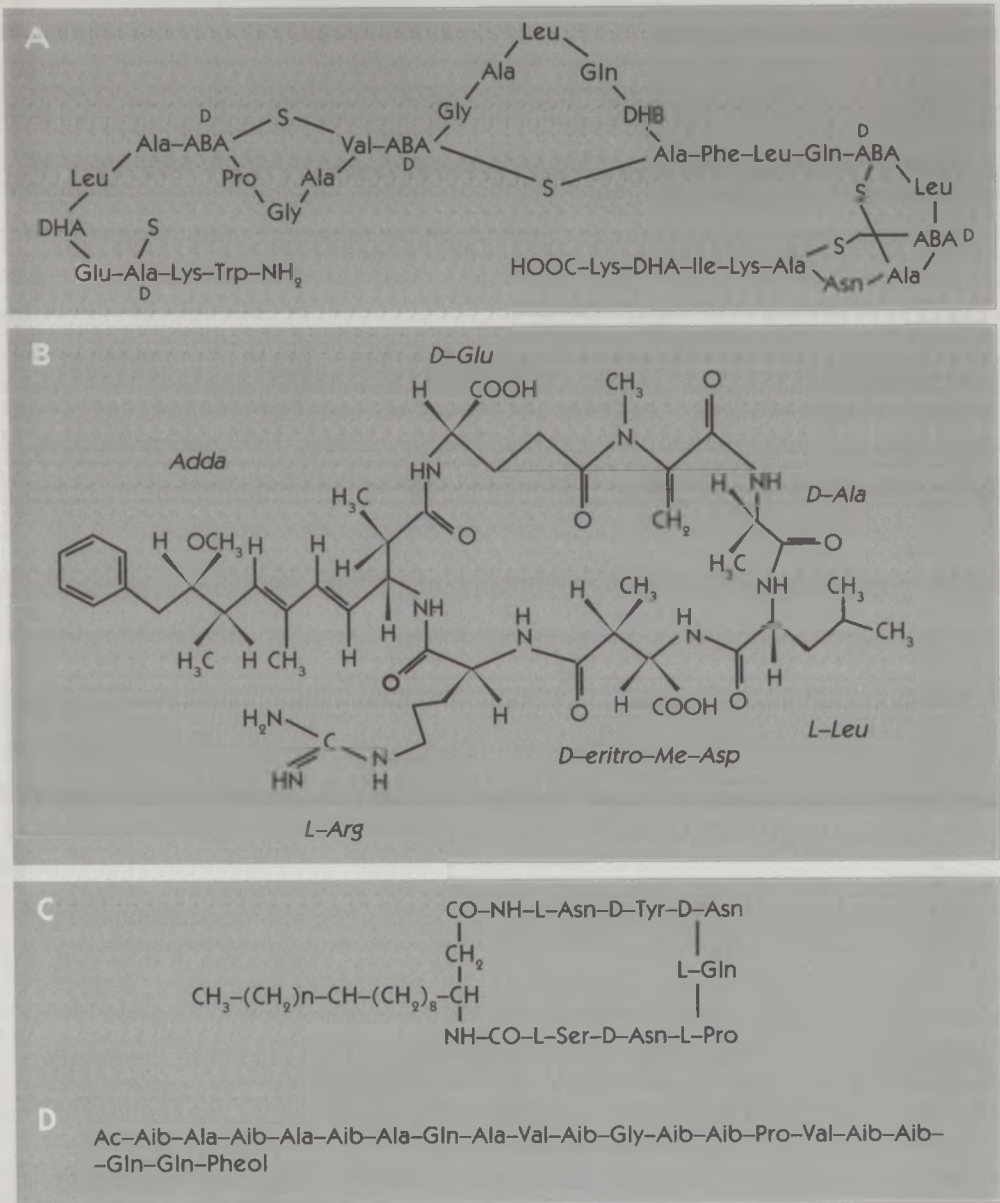


FIGURA 1. Antibióticos-peptídicos produzidos por microrganismos. Estrutura A – subtilina, antibiótico produzido pelo ribossoma em *B. subtilis*, após diversas modificações translacionais (os aminoácidos com a configuração D em relação ao carbono *alfa* estão indicados por “D”); B – microcistina LR, hepato-toxina produzida pela via não ribossômica em *M. aeruginosa* e *Anabaena* spp.; C – Iturina A, lipopeptídeo com atividade fungicida produzido por *B. subtilis* pela via não ribossômica (n = 0 ou 1); D – paracelsina A, um “peptaibol” produzido por *Trichoderma saturnisporum*, provavelmente sintetizado por enzimas multifuncionais. Abreviações: ABA (ácido amino butírico); Ala-S-Ala (lantionina); ABA-S-Ala (b-metil-lantionina); DHA (desiro-alanina); DHB (desidro-butirina ou b-metil-desidro alanina); Adda (ácido-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-deca-4,6-denóico); D-eritro-Me-Asp (D-eritro-metil ácido aspártico).

Algumas linhagens de *Trichoderma* produzem peptídeos chamados "peptaibols", também capazes de modificar a polaridade e permeabilidade de membranas, participando ativamente de processos de controle biológico de fungos fitopatogênicos (El Hajji *et al.*, 1987). Acredita-se que, durante o micoparasitismo, ocorra um sinergismo entre a expressão de enzimas hidrolíticas e a produção de "peptaibols" pelo fungo *Trichoderma harzianum* (Schirmböck *et al.*, 1994). "Peptaibols" são constituídos por 19 a 20 aminoácidos, havendo alta proporção de dois aminoácidos pouco comuns, ácido α -amino isobutírico e isovalina, além de apresentarem a extremidade N-terminal acetilada e possuírem um amino álcool na extremidade C-terminal (Ritieni *et al.*, 1995) (Fig. 1d). A biossíntese do "peptaibol" alameticina (Brewer *et al.*, 1987) foi parcialmente caracterizada por Mohr & Kleinkauf (1978), confirmando a participação de uma enzima multifuncional.

Outros antibióticos originários da via não-ribossômica incluem a ciclosporina A, que possui atividade imunossupressora (Lawen *et al.*, 1989; Dittmann *et al.*, 1994), substâncias fitotóxicas como toxina HC, tentoxina e siringomicina, entre outras (Kleinkauf & von Döhren, 1996), além de peptídeos com atividade inseticida como destruxinas e beauvericinas, produzidos respectivamente por *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* (País *et al.*, 1981; Jegorov *et al.*, 1993; Peeters *et al.*, 1983; Bateman, 1997). Entre estes compostos incluem-se ainda sideróforos-peptídicos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* (Buysens *et al.*, 1996; Marschner & Crowley, 1997) e peptídeos contendo ácido D-lisérgico produzidos por ascomicetos como *Claviceps purpurea* (Riederer *et al.*, 1996; Walzel & Keller, 1996; Walzel *et al.*, 1997).

O tripeptídeo δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina (ACV) é o precursor de β -lactama, antibióticos como penicilinas e cefalosporinas. A biossíntese de penicilinas em fungos filamentosos como *Penicillium chrysogenum* e *Aspergillus nidulans* requer a participação de três enzimas (Fig. 2), ACV sintetase (ACVS), isopenicilina N sintetase (IPNS) e acil-coenzima A:ácido δ -aminopenicilânico aciltransferase (ACT) (Baldwin & Abraham, 1988).

Um outro mecanismo de síntese não-ribossômica envolve a formação de intermediários de ester de fosfato, ao contrário de carboxi-tioester ligados covalentemente ao suporte enzimático. Como exemplo de biossíntese através de ester de fosfato temos o tripeptídeo glutationa (γ -glutamil-cisteinil-glicina) e o peptídeo cíclico micobacilina, também produzido por *B. subtilis*

e que apresenta atividade fungicida. Na biossíntese por intermediários de fosfato não há formação de ligações covalentes entre enzima e substrato, e as sintetases envolvidas não apresentam nenhuma semelhança na sua estrutura primária com as sintetases que seguem o mecanismo de tiotemplato (Meister, 1988; Kleinkauf & von Döhren, 1996).

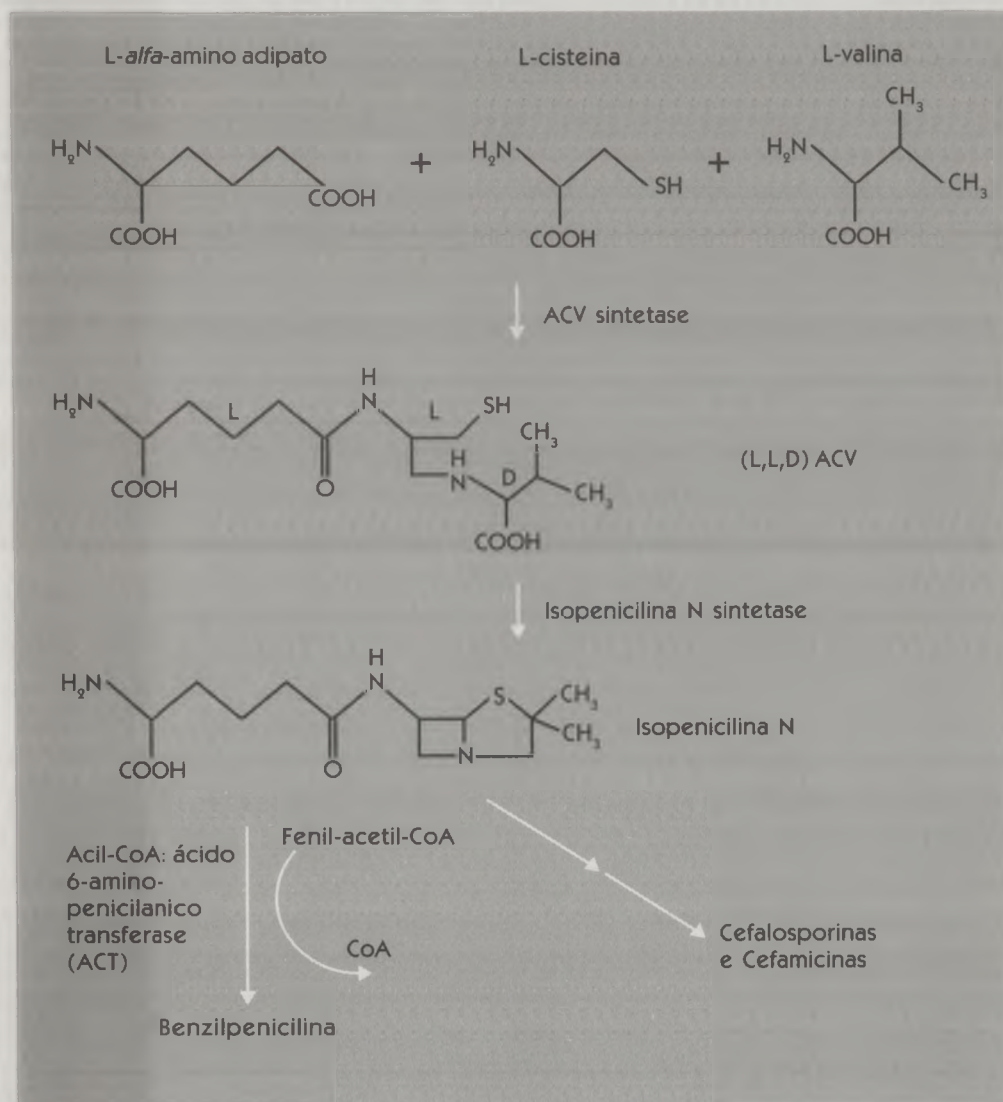


FIGURA 2. Biossíntese de b-lactama antibióticos. A etapa inicial da biossíntese de penicilinas e cefalosporinas é catalizada por uma peptídeo sintetase: d-(L-a-aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina (ACV) sintetase.

PEPTÍDEO SINTETASES

Peptídeo sintetases constituem uma família de enzimas multifuncionais capazes de produzir peptídeos biologicamente ativos a partir de substratos (geralmente L-aminoácidos), em muitos casos não-protéicos (Kleinkauf & von Döhren, 1987, 1990). O interesse por estas enzimas tem sido motivado pela busca de uma rota de biossíntese de peptídeos que seja independente do ribossoma, já que estas multienzimas podem catalizar até 40 reações como no exemplo da ciclosporina sintetase, uma multienzima com mais de 1.000 kDa expressa por um quadro aberto de leitura 45.8 kb (Weber *et al.*, 1994).

A seqüência de reações envolve a ativação de grupamentos carboxila, formando acil-adenilatos associados à enzima; formação de acil-tioésteres ligados covalentemente à enzima e transferência do aminoácido ativado para o próximo intermediário (acil-enzima tioester), formando uma ligação peptídica de acordo com a seqüência de reações abaixo:

1. $aa + ATP \leftrightarrow AMP-aa + PPi$ (formação de amino acil-adenilatos)
2. $aa-AMP + Enz-SH \rightarrow Enz-S-aa + AMP$ (tioesterificação)
3. $Enz-S-aa_1 + Enz-S-aa_2 \rightarrow Enz-S-aa_2-aa_1$ (condensação)
4. $Enz-S-aa_2-aa_1 \rightarrow aa_1-aa_2 + Enz-SH$ (terminação)

onde (aa = aminoácido; PPi = pirofosfato)

Ao término da reação, o peptídeo deve ser liberado por ciclização, com a formação de uma ligação interna (amida ou ester), ou por hidrólise do tioester seguida ou não de modificação da extremidade carboxi-terminal (Kleinkauf & von Döhren, 1996).

Peptídeo sintetases são enzimas compostas de regiões com alta similaridade de seqüência chamadas "domínios", onde ocorre a ativação de aminoácidos (reações 1, 2 e 3 acima). Uma estrutura modular foi evidenciada inicialmente por Smith *et al.* (1990) após a clonagem e o seqüenciamento do gene da ACV sintetase de *P.chrysogenum*. Estruturas modulares também são encontradas em outras enzimas do metabolismo secundário em microrganismos na biossíntese de policetídeos (Donadio *et al.*, 1991; Katz & Donadio, 1993). Em peptídeo sintetases, estruturas altamente conservadas foram identificadas, e o pareamento de seqüências de diversas enzimas que utilizam ATP para ativação de substratos como acetil-coenzima A ligases, metiltransferases e diversas peptídeo sintetases já clonadas, seqüenciadas e ca-

racterizadas; além do pareamento com ácido graxo sintetases, N-metila transferases, epimerases e tioesterases, permite que se associe determinados segmentos da estrutura primária destas enzimas com a atividade catalítica (Turgay & Marahiel, 1992; Stachelhauss & Marahiel, 1995; Kleinkauf & von Döhren, 1996; Dieckmann *et al.*, 1997). Os segmentos listados na Tabela 1 foram descritos por Kleinkauf & von Döhren (1996). Estes mesmos autores sugerem uma distinção entre módulo e domínio para o arranjo estrutural de uma peptídeo sintetase. Desta forma, módulo corresponderia ao segmento de DNA que codifica a informação para a adição de um amino ou hidroxíácido, juntamente com alguma atividade catalítica associada à sua modificação (por exemplo, racemização ou N-metilação). O segmento protéico correspondente seria denominado de unidade da sintetase. Fragmentos protéicos obtidos por proteólise limitada (por exemplo, Skarpeid *et al.*, 1990; Pieper *et al.*, 1995) são chamados domínios para indicar sua integridade estrutural e provável autonomia funcional. Estes domínios são compostos por subdomínios que apresentam provavelmente uma estrutura similarmente definida.

Desta forma, inseridos em um domínio de ativação genérico para um amino ou hidroxíácido encontram-se os subdomínios de formação de adenilatos, de transferência de grupamentos acila (ou de tioesterificação), de condensação, subdomínio com atividade de epimerase e subdomínio com atividade de N-metila transferase. A Fig. 3 representa uma possível organização estrutural para um domínio em uma peptídeo sintetase. Ressaltamos os subdomínios associados às atividades catalíticas citadas acima e os prováveis sítios envolvidos na catálise, listados na Tabela 1. Um domínio genérico contém as atividades de adenilação, tioesterificação e condensação. Os subdomínios com atividade de N-metila transferase, epimerase e (talvez) tioesterase poderiam estar inseridos nas regiões indicadas (Tabela 1 e Fig. 3).

Uma etapa importante na biossíntese corresponde à formação de intermediários covalentemente ligados à enzima na forma de tioester. A idéia original do mecanismo chamado "tiotemplato" (Lipmann, 1971) envolveria a ligação dos substratos à enzima, formando tioesteres com a cadeia lateral de resíduos de cisteína. Com a ajuda de um cofator central, 4'-fosfopantotenato (PAN), seria promovida a condensação de aminoácidos através de uma transferência de grupamentos acila da cadeia lateral de cisteínas para o grupamento SH da extremidade cisteamina do mesmo cofator (Fig. 4).

TABELA 1. Sequências peptídicas associadas à ligação de substratos ou atividades catalíticas parciais na síntese peptídica não ribossomal.

SEQUÊNCIA(S) ^{1,2}	CARACTERÍSTICA
a) LTXXELXXELXXXALXR	presente em enzimas que ativam substratos utilizando ATP, formando acil-adenilatos
b) AVXXAXAXYVXIDXXYPXER	
c) YTSGTTGXPKG ³	identificado como provável sítio de ligação de AMP (Bairoch, 1991)
d) IIXXYGXT	presente em enzimas que ativam substratos utilizando ATP, formando acil-adenilatos.
e) GELXIXGXVAR	seqüências associadas à ligação de ATP (adenosina)
f) RLYRTGDL	
g) IEYLGRDXQVKIRXXRIELGEIE	presente em enzimas que ativam substratos utilizando ATP, formando acil-adenilatos
h) LXXYMVP	associada à ligação de ATP e potencialmente à ligação de coenzima A (CoA)
i) LTXXGKLRKAL	potencialmente associada a ligação de CoA
j) LGGXSIXAI	sítio de ligação do cofator 4'- fosfopantotenato, precursor da CoA. Presente também em ácido graxo sintetases e policetídeo sintetases
-b ₁) YPSVXXQXRMYL	associadas ao domínio de formação da ligação peptídica (condensação)
-b ₂) LXPIQXWF	
-b ₁) LIXRHEXL	
-b ₂) LXXXHD	
n-b ₁) DMHHIIXDGXSXXI	potencialmente envolvida na reação de condensação
n-b ₂) HHXXVDXVSWXIL	
-b ₁) LSKXGQXDIIIXGTPXAGR	associadas ao domínio de formação da ligação peptídica (condensação)
-b ₂) VXXEGHGRE	
-b ₁) IXGMFVNTXLALR	
-b ₂) TVGWFTXXXPXXL	
m) PXXGXGX	potencialmente associadas à atividade de epimerase
n) VXFNYLG	

segmentos (a-i) são encontrados em acil-CoA sintetases e peptídeo sintetases.

segmentos com a identificação (b1) estão presentes em peptídeo sintetases sem atividade de epimerase; segmentos com a identificação (b2) estão presentes em peptídeo sintetases com atividade de epimerase.

anticorpos gerados contra o peptídeo YTSGTTGRPKG são capazes de reconhecer enzimas como acetil-coenzima A ligases e peptídeo sintetases de origens variadas (Etchegaray *et al.*, 1996a, 1997a)

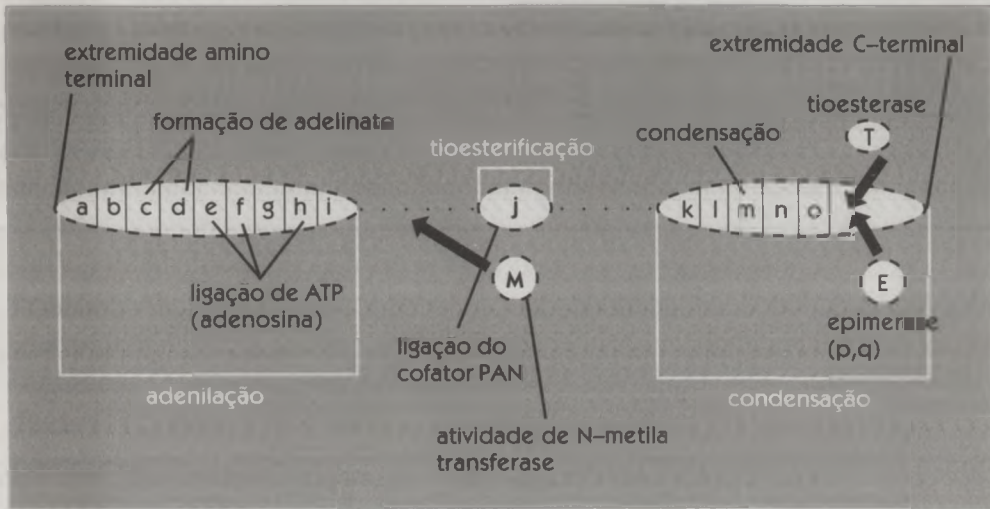


FIGURA 3. Domínio genérico de uma peptídeo sintetase. Domínios dentro de uma peptídeo sintetase são estruturas com até 1.000 resíduos de aminoácidos que catalizam a ativação e modificação enzimáticas de cada aminoácido a ser inserido em um antibiótico-peptídico. Os sub-domínios de adenilação, tioesterificação e condensação são caracterizados por seqüências altamente conservadas (Tabela 1, segmentos de a-q), algumas já caracterizadas ou parcialmente caracterizadas como os segmentos: c (YTS GTTGXPKG), f (RLYRTGDL), j (LGGXSIXAI) (Kleinkauf & von Döhren, 1996; Vollembroich *et al.*, 1993; Dieckmann *et al.*, 1996,1997). Algumas sintetases possuem domínios com atividade de N-metila transferase (M) (e/ou) epimerase ou epimerase/tioesterase, respectivamente (Weber *et al.*, 1994; Piper *et al.*, 1995; Gocht & Marahiel, 1994; Smith *et al.*, 1990; Aharonowitz *et al.*, 1993).

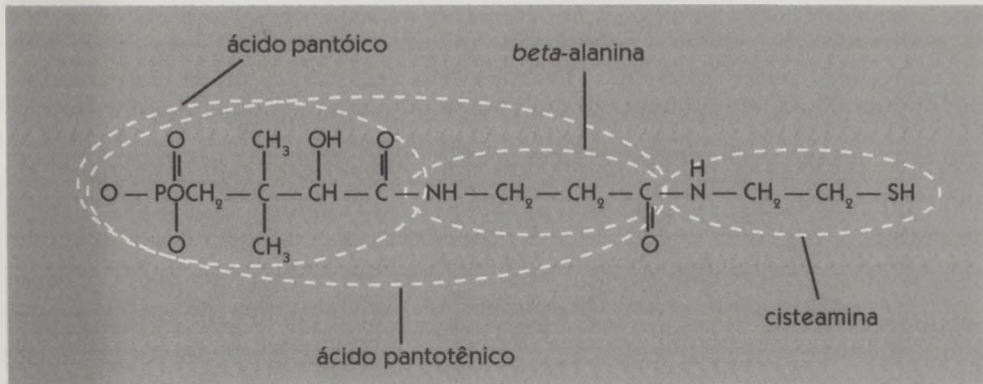


FIGURA 4. Estrutura do cofator 4'- fosfopantotenato (PAN). A extremidade pantotenato e a extremidade cisteamina do cofator estão identificadas. PAN é acoplado a peptídeo sintetases, ácido graxo sintetases e policetídeo sintetases por modificação pós-translacional catalizada por uma fosfopantotenil transferase (por exemplo, Ku *et al.*, 1997) formando uma ligação fosfo-di-éster com a cadeia lateral da serina no sítio LGG (H/D)SI (Schlumbohn *et al.*, 1991; Stein *et al.*, 1996).

O modelo atual para o mecanismo de tiotemplato envolve a participação de vários cofatores (PAN), covalentemente ligados a um resíduo de serina no sítio LGGXSIXAI (Tabela 1), (Schlumbohn *et al.*, 1991; Stein *et al.*, 1994, 1996). Este modelo é chamado de "múltiplo carreador de tióis", ou seja, em cada domínio responsável pela ativação individual de um aminoácido existe um cofator (PAN) para a formação de tioéster. O modelo múltiplo carreador foi confirmado através de técnicas de química de proteínas para o sistema enzimático responsável pela biossíntese do decapeptídeo cíclico (gramicidina S) (Stein *et al.*, 1996). Característica da biossíntese de antibióticos-peptídicos em procariotos é a participação de mais de uma enzima, formando um complexo enzimático (Turgay & Marahiel, 1992; Stachelhauss & Marahiel, 1995). Este é o caso para a biossíntese de gramicidina S, produzida por *Bacillus brevis* (Turgay & Marahiel, 1992) que envolve as sintetases 1 e 2. As sintetases 1 e 2 possuem respectivamente 1 e 4 domínios envolvidos na ativação dos substratos, totalizando 5 sítios de ligação de aminoácidos na forma de tioéster. Para confirmar o modelo de múltiplos tióis, cada um dos sítios de tioesterificação foi derivatizado ora com substratos radioativos, ora com inibidores de tióis. Os complexos formados foram digeridos com brometo de cianogênio ou proteases, técnicas comuns em estudos de mapeamento peptídico de uma proteína (Shively *et al.*, 1989). Após a purificação, os fragmentos foram submetidos a seqüenciamento amino-terminal, espectrometria de massas e análise de aminoácidos (Stein *et al.*, 1996). Um cofator PAN foi identificado em cada sítio de tioesterificação, covalentemente ligado a uma serina presente no segmento altamente conservado LGG(H/D)S(L/I) (Tabela 1), em cada um dos módulos de peptídeo sintetases para as quais se conhece a estrutura primária (Kleinkauf & von Döhren, 1996). O trabalho de Vollenbroich *et al.* (1993) contribuiu também para confirmar a participação de resíduos de serina na ligação do cofator PAN em peptídeo sintetases. A mutação sítio direcionada serina/alanina para o resíduo altamente conservado em LGG(H/D)S(L/I) para os quatro primeiros domínios do sistema enzimático da biossíntese de surfactina em *B. subtilis* (Galli *et al.*, 1994) resultou na perda da capacidade de formação de tioésteres, sendo porém mantida a atividade de formação de acil-adenilatos (Vollembroich *et al.*, 1993).

Exemplificando a biossíntese de peptídeos pelo mecanismo de tiotemplato, a Fig. 5 representa a biossíntese do tripeptídeo ACV, precursor de

penicilinas, pela enzima ACV sintetase (Aharonowitz *et al.*, 1993). ACV sintetase é provavelmente a mais simples peptídeo sintetase que se conhece, considerando-se o número de reações catalisadas. O modelo da Fig. 5 é baseado em uma similaridade com outras peptídeo sintetases já caracterizadas (por exemplo, Roskoski *et al.*, 1970; Zocher *et al.*, 1982; Lawen *et al.*, 1989; Turgay & Marahiel, 1992; Gocht & Marahiel, 1994; Weber *et al.*, 1994; Pieper *et al.*, 1995; Stein *et al.*, 1996; Walzel *et al.*, 1997). Segundo Shiau *et al.* (1997), ACVS não forma tioester com os substratos α -amino adipato e valina, e as etapas intermediárias envolvem a formação do dipeptídeo cisteinil-valina, ao contrário do aqui proposto, aminoadipil-cisteína, de acordo com o mecanismo de tiotemplato (Kleinkauf & von Döhren, 1996; Stein *et al.*, 1996).

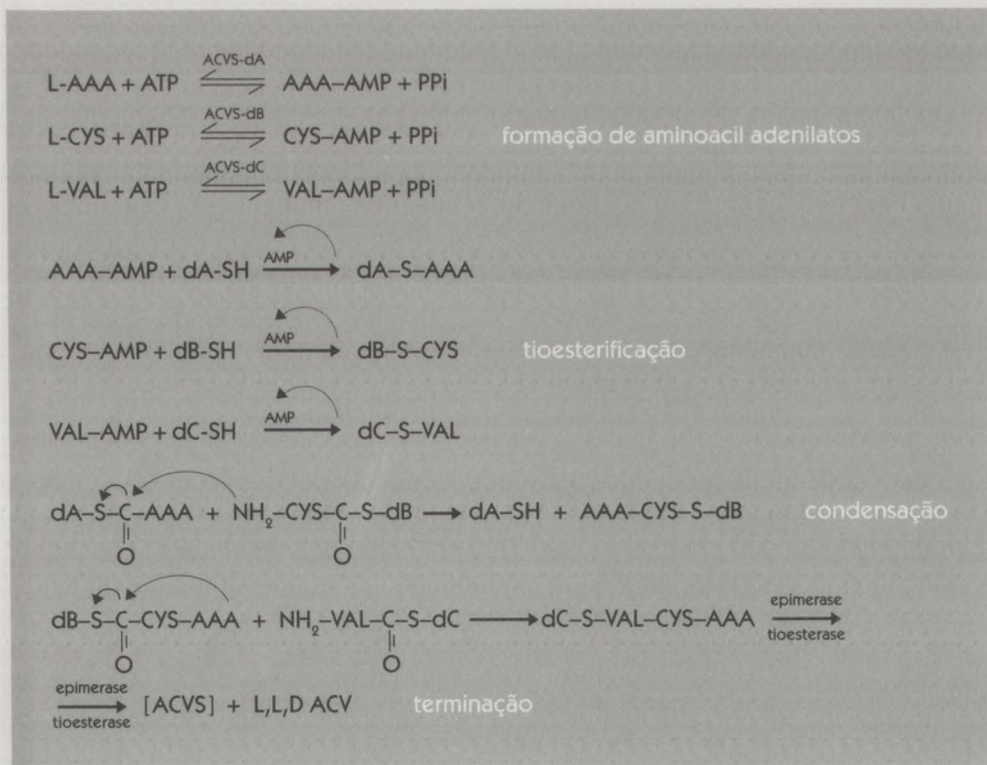


FIGURA 5. Biossíntese do tripeptídeo d-(L-a-aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina (ACV). Segundo o mecanismo de tiotemplato e o modelo múltiplo carreador de tióis, a enzima ACV sintetase cataliza até 10 reações: formação de amino acil-adenilatos (3); tioesterificação (3); condensação (2); epimerização (1) e, finalmente, hidrólise de tioester (1) para liberação do tripeptídeo. Os substratos, α -amino adipato (AAA), cistesina e valina seriam respectivamente nos domínios (A, B e C), identificados por Smith *et al.*, 1990.

GENES QUE CODIFICAM PEPTÍDEO SINTETASES

O isolamento, clonagem e seqüenciamento de genes que codificam diversas enzimas da família de peptídeo sintetases tanto de procaríotos como de eucariotos, exemplificados pelos sistemas envolvidos na biossíntese de tirocidina, gramicidina S, surfactina, bialafos, toxina HC, eniatina, ciclosporina e do tripeptídeo precursor de penicilinas (ACV), confirmam a organização modular destas enzimas. Um domínio de aproximadamente 600 aminoácidos altamente conservados é comum a todas as sintetases, e foi designado "domínio tipo I" (Stachelhaus & Marahiel, 1995). Domínios do tipo II são constituídos por um segmento adicional correspondente à atividade de N-metila transferase. A organização destes dois tipos de domínios dentro de uma enzima está colinearmente relacionada com a estrutura do peptídeo que está sendo sintetizado (Weber *et al.*, 1994; Stachelhaus *et al.*, 1995).

Os genes que codificam sintetases originárias de procaríotos, como na biossíntese de gramicidina S, surfactina e tirocidina, são organizados em operons de 20 kb ou mais (Turgay *et al.*, 1992; Fuma *et al.*, 1993; Cosmina *et al.*, 1993). O operon *grs* codifica duas enzimas GrsA e GrsB, organizadas em 5 domínios homólogos responsáveis pela ativação de 5 aminoácidos constituintes do peptídeo cíclico gramicidina S. De forma similar, três peptídeo sintetases, SrfA-A, SrfA-B e SrfA-C são os produtos do operon *srf* A. No total, estas sintetases constituem 7 domínios que ativam e em parte epimerizam os 7 aminoácidos constituintes do lipopeptídeo surfactina A. Todos os domínios codificados pelos operons *tyc*, *srf* A e *grs* de procaríotos e os que codificam ACV sintetases (*acv*A) e toxina HC (*hts*1) são do tipo I. Embora alguns também apresentem atividade de epimerase, não possuem atividade de N-metila transferase. Na biossíntese de peptídeos cíclicos com resíduos N-metilados, comuns a algumas sintetases de fungos filamentosos, encontram-se enzimas constituídas por uma única cadeia polipeptídica, compostas por uma mistura de domínios dos tipos I e II descritos acima. O dipsepeptídeo eniatina, por exemplo, é sintetizado pela condensação de três unidades de dipeptídeos seguidos de ciclização. A enzima eniatina sintetase, uma proteína de 347 kDa codificada pelo gene *esyn* 1, de 9.5 kb, é constituída de dois domínios de ativação de aminoácidos (Haese *et al.*, 1993). O primeiro domínio, tipo I, é responsável pela ativação e formação de tioéster com o hidroxíácido (D-2-ácido hidroxisovalérico), enquanto o segundo domínio, responsável pela ativação e N-

metilação de aminoácidos hidrofóbicos como a valina, é do tipo II. Sete domínios do tipo II foram identificados no gene *sim A*, de 45.8 kb, codificando uma proteína de 1.689.243 Da responsável pela biossíntese da droga imunossupressora ciclosporina A em *Tolypocladium niveum* (Weber *et al.*, 1994). Parcialmente caracterizada, a biossíntese de destruxinas — uma família de peptídeos cíclicos com atividade inseticida — constitui provavelmente outro exemplo de uma sintetase híbrida. A estrutura de destruxinas sugere que estes peptídeos são elaborados por enzimas multifuncionais (Jegorov *et al.*, 1993). Além de possuir aminoácidos pouco comuns, alguns resíduos são N-metilados, à semelhança dos peptídeos eniatina (Pieper *et al.*, 1995) e ciclosporina A (Weber *et al.*, 1994). Utilizando anticorpos sítio direcionados contra a seqüência YTSGTTGRPKG e a técnica de intertroca ATP/[³²P]PPi, foi possível identificar uma proteína de alto peso molecular que pode estar relacionada à biossíntese de destruxinas (Etchegaray *et al.*, 1997a). Em suporte a estes dados, Bailey *et al.* (1996) clonaram e seqüenciaram um fragmento de gene correspondente a um domínio de uma peptídeo sintetase de *Metarhizium anisopliae*. Os autores utilizaram primers degenerados específicos para peptídeo sintetases baseados nas seqüências altamente conservadas dos sítios KAGGAYPID e YTSGTTGKPKG (Borchert *et al.*, 1992; Turgay & Marahiel, 1994). O fragmento clonado foi parcialmente seqüenciado, expondo pela primeira vez a existência de introns em genes de peptídeo sintetases.

A atividade de tioesterase, associada ou integrada ao gene de algumas peptídeo sintetases é codificada pelos genes *grs T* e *srfA-TE*, respectivamente no sistemas de biossíntese de gramicidina S e surfactina A (Stachelhauss & Marahiel, 1995). O gene *grs T*, localizado na extremidade 5' do operon *grs*, codifica uma proteína de 29 kDa que apresenta alta similaridade com tioesterases que catalizam a liberação de ácidos graxos em complexos multienzimáticos (ácido graxo sintetases). O gene *srfA-TE* apresenta homologia de 31.5% com o gene *grs T* (Cosmina *et al.*, 1993). Em *Streptomyces hygroscopicus* verificou-se a existência de dois quadros abertos de leitura que apresentam homologia a tioesterases (Raibaud *et al.*, 1991). Estes genes estão associados ao operon de biossíntese do peptídeo herbicida biálafos, codificando tioesterases de aproximadamente 27 kDa que apresentam homologia de 31% com o gene *grs T*. Todas estas novas tioesterases, potencialmente associadas com peptídeo sintetases, contêm a seqüência GHSXG que poderia compor o sítio ativo de acila transferases, lipases, ácido graxo e policetídeo sintetases (Stachelhauss & Marahiel, 1995; Kleinkauf & von

Döhren, 1996). Enzimas envolvidas na biossíntese de peptídeos cíclicos como toxina HC e ciclosporina A não contêm genes de tioesterases em seus operons, indicando o provável envolvimento de proteínas ainda não caracterizadas e que possam auxiliar a etapa de ciclização de peptídeos (Kleinkauf & von Döhren, 1996). Embora a função de tioesterases em peptídeo sintetases não esteja totalmente clara, estas enzimas poderiam estar associadas à hidrólise da ligação tioester para liberação do peptídeo ao final da síntese. Mutações sítio direcionadas na região C-terminal do gene *acv A*, onde acredita-se estar presente a atividade de tioesterase, indicaram que esta região é essencial para a atividade catalítica da enzima ACV sintetase (Turner *et al.*, 1996). Estudos com o mutante serina/alanina no sítio GX SXG comum a diversas tioesterases e presente na região C-terminal da ACV sintetase indicam que há um impedimento na liberação do tripeptídeo (Kallow *et al.*, 1996). Ainda com relação ao sistema de biossíntese de penicilinas em *P. chrysogenum* e *A. nidulans*, trabalhos recentes visando a hibridização de domínios da ACV sintetase com o de outras peptídeo sintetases resultaram na construção de um mutante que não produz penicilinas (Turner *et al.*, 1996). Estes resultados foram obtidos pela deleção do gene *acv A* em *A. nidulans*. A reinserção do gene *acv A* sobre o controle do promotor da desidrogenase de álcool (*alc A*) em *A. nidulans* resultou em um aumento da produção de penicilinas de cerca de 50 vezes, indicando que a produção do tripeptídeo ACV constitui a etapa limitante na biossíntese de antibióticos com estrutura de β -lactamas em fungos filamentosos (Turner *et al.*, 1996). A construção deste mutante tem possibilitado a inserção de fragmentos de genes da enzima ACVS de *P. chrysogenum* em *A. nidulans* para estudos bioquímicos (Etcheagaray *et al.*, 1997b). A construção de uma sintetase híbrida contendo uma mistura de domínios da ACV sintetase de *P. chrysogenum* e *A. nidulans* nesse mesmo mutante não alterou a produção do tripeptídeo (Turner *et al.*, 1996).

O fungo filamentosos *Cochliobolus carbonum* é um patógeno de milho (*Zea mays*). Neste fungo, a produção da fitotoxina (toxina HC) está associada ao locus *tox 2*, um operon bastante grande e complexo que inclui o gene *bts 1*, codificando a ciclo peptídeo sintetase HTS, de 570 kDa (Ahn *et al.*, 1996). Linhagens de fungos correlatas produzem toxina T (operon *tox 1* em *C. heterostrophus*) e victorina (operon *tox 3* em *C. victoriae*) (Nikolskaya *et al.*, 1995; Jones & Dunkle, 1995; Walton *et al.*, 1996).

Novos genes codificando peptídeo sintetases incluem o gene da biossíntese de daptomicina em *Streptomyces roseosporus* (Hosted *et al.*, 1996), a desco-

berta de genes de peptídeo sintetases em cianobactérias produtoras de microcistinas (Meissner *et al.*, 1996; Börner, 1996; Sivonen, 1996) e em *Pseudomonas syringae* (Zhang *et al.*, 1995) associado à produção de siringomicina. Adicionalmente, foi descoberta uma família de genes que codificam peptídeo sintetases em *C. purpurea* (Panaccione, 1996).

ETAPAS DA SÍNTESE PEPTÍDICA NÃO RIBOSSOMAL E OS MÉTODOS UTILIZADOS PARA SUA CARACTERIZAÇÃO

Reconhecimento e Ativação de Aminoácidos

Enzima + aminoácido + ATP \leftrightarrow Enzima-AMP-aminoácido + pirofosfato

Utilizando-se $^{32}\text{P}[\text{PPi}]$ pode-se detectar a intertroca ATP/ $^{32}\text{P}[\text{PPi}]$ pela formação de ATP marcado (Lee & Lipman, 1975). Esta reação requer a presença de um substrato (aminoácido) específico para a hidrólise de ATP. A mesma reação ocorre na síntese ribossomal, catalisada por t-RNA sintetases. Para se detectar a intertroca ATP/ $^{32}\text{P}[\text{PPi}]$ utiliza-se um método descontínuo, ou seja, a reação enzimática deve ser interrompida bruscamente para posterior análise dos produtos formados. A reação de formação de amino acil adenilatos é interrompida pela adição de carvão ativo em uma suspensão contendo ácido perclórico (Lee & Lipman, 1975). A reação assim bloqueada é filtrada em membranas de fibra de vidro. ATP aderido ao carvão é retido nestas membranas e a radioatividade do filtro contendo $^{32}\text{P}[\text{ATP}]$ é medida por cintilação.

Formação de Intermediários Covalentemente Ligados à Enzima na Forma de Tioésteres

Enzima-AMP-aminoácido + Enzima-SH \rightarrow Enzima-S-aminoácido + AMP

A formação de intermediários durante a biossíntese de peptídeos pelo mecanismo de tiotemplato baseia-se na ligação covalente entre aminoácidos e o suporte protéico. Ao incubar-se enzima e aminoácidos radioativos na presença de MgATP^{2-} , obtêm-se intermediários covalentemente ligados à enzima e, portanto, proteína marcada com ^{14}C ou ^3H . A reação de tioesterificação é finalizada pela adição de ácido tri-cloro-acético. A proteína é precipitada por centrifugação e recolhida em membranas especiais para medição da radioatividade incorporada (Keller, 1987). Para confirmar a

formação de tioésteres, após a lavagem o precipitado deve ser tratado com ácido perfórmico e separado por cromatografia de camada delgada, utilizando-se como controle a mesma reação com ácido fórmico. Tioésteres são estáveis ao tratamento com ácido fórmico, mas são hidrolisados na presença de ácido perfórmico (Keller *et al.*, 1987). Para identificação do sítio de tioesterificação, a proteína marcada pode ser separada por eletroforese em gel desnaturante de proteínas (Laemmli, 1970). Utilizando-se técnicas de química de proteínas é possível identificar fragmentos protéicos marcados com radioatividade após proteólise limitada e seqüenciamento amino terminal (Etchegaray *et al.*, 1996b, 1997c).

Derivatização de Peptídeo Sintetases por Métodos Alternativos

Métodos adicionais têm sido empregados para a identificação de peptídeo sintetases focalizando-se sítios específicos destas enzimas. Por exemplo, o cofator PAN pode ser marcado indiretamente pela adição de precursores radioativos ao meio de cultura durante a fermentação do microrganismo de interesse. Os precursores normalmente utilizados consistem de ácido pantotênico marcado com ^{14}C ou o aminoácido β -alanina marcado com ^3H (Cronan, 1980; Lee & Lipmann, 1974; Pieper *et al.*, 1995).

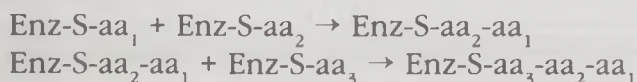
Pela adição de cofatores marcados por modificação pós-translacional a peptídeo sintetases ou ácido graxo sintetases (Lee & Lipmann, 1974; Lakin-Thomas & Brody, 1985, 1986; Geiger *et al.*, 1991; Rusnak *et al.*, 1991; Pieper *et al.*, 1995) resulta na obtenção de proteínas marcadas, as quais podem ser identificadas por proteólise limitada e seqüenciamento amino-terminal (Shively *et al.*, 1989).

Haese *et al.* (1994) utilizaram o substrato S-[metila- ^{14}C]adenosil metionina (SAM) para derivatização da multienzima eniatina sintetase por fotoafinidade com luz ultravioleta. Pela caracterização dos fragmentos marcados com ^{14}C , foi possível identificar o sítio de ligação para SAM junto ao domínio associado à atividade de N-metila transferase (Pieper *et al.*, 1995; Burmester *et al.*, 1995).

Métodos não-radioativos foram utilizados na identificação de sítios de ligação de ATP. Pavela-Vrancic e colaboradores (1994a) obtiveram fragmentos marcados por fluorescência para a enzima tirocidina sintetase 1 de *Bacillus brevis* pela adição do inibidor de ATPases, fluoresceína 5'-isotiocianato (FITC). Este composto liga-se covalentemente por afinidade à cadeia lateral do aminoácido lisina, modificando irreversivelmente o sítio de ligação de nucleotídeos. Após a derivatização da enzima foi feita proteólise

limitada e purificação de fragmentos por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) acoplada a um detetor de fluorescência. Os fragmentos marcados foram identificados posteriormente por análise de aminoácidos e caracterizados por espectrometria de massas (Pavela-Vrancic *et al.*, 1994a). Alternativamente, a derivatização de sítios de ligação em proteínas pode ser feita com substratos como o derivado de ATP 2-azido-adenosina trifosfato que se ligam covalentemente aos sítios de ligação, quando induzidos por fotoafinidade (Pavela-Vrancic *et al.*, 1994b). Utilizando ambos os métodos foi possível identificar alguns aminoácidos na estrutura primária de tirocidina sintetase 1 que estão envolvidos na ligação do cofator ATP (Pavela-Vrancic *et al.*, 1994b), bem como indicar a participação de resíduos de lisina em seqüências altamente conservadas em peptídeo sintetases na hidrólise de fosfato de ATP durante a formação de amino acil-adenilatos (Pavela-Vrancic *et al.*, 1994a).

Condensação



A biossíntese de peptídeos é feita pela condensação de intermediários ligados ao suporte enzimático na forma de tioéster. Na seqüência de reações, a cadeia peptídica que está crescendo do aminoácido N- para o C-terminal, é transferida para o próximo tioéster, formando uma ligação peptídica (Fig. 6). Intermediários podem ser visualizados por cromatografia de camada delgada (TLC) empregando-se substratos marcados com ^{14}C ou ^3H (Roskoski *et al.*, 1970; Zocher *et al.*, 1982; Walzel *et al.*, 1997).

BIOSÍNTESE DE PEPTÍDEOS COM ^{14}C -S-ADENOSIL-METIONINA

A biossíntese de peptídeos contendo resíduos N-metilados pode ser monitorada através de cromatografia de camada delgada empregando-se ^{14}C -S-adenosil metionina como substrato para metilação. Além de substratos (aminoácidos constituintes do peptídeo a ser sintetizado), adicionam-se MgATP^{2-} e o substrato ^{14}C -S-adenosil metionina à mistura reacional. A atividade de N-metila transferase presente em certas peptídeo sintetases utiliza este substrato, obtendo-se desta forma um peptídeo marcado, que deverá ser extraído da reação normalmente com acetato de etila, após a

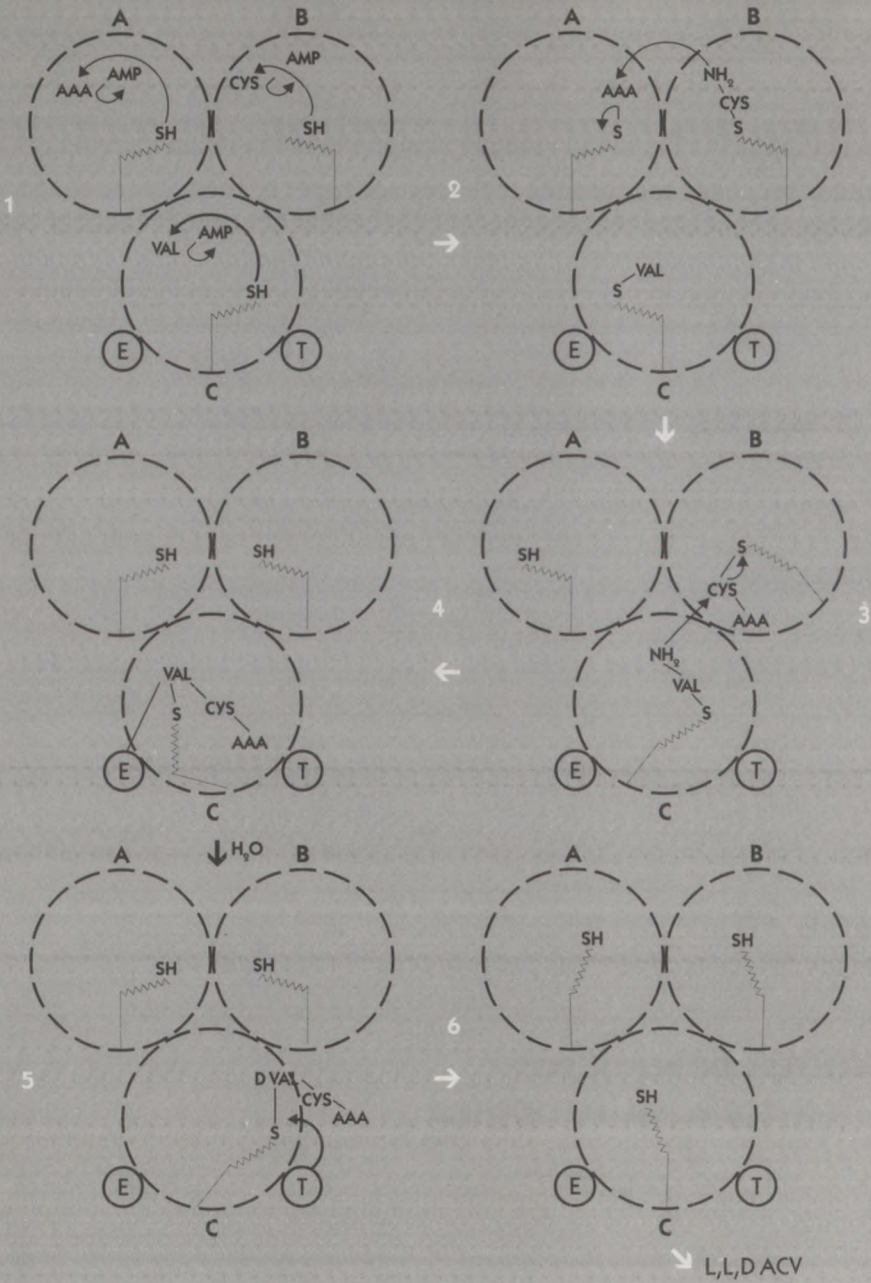


FIGURA 6. Representação esquemática da biosíntese de ACV segundo o modelo múltiplo carreador de tíois Stein *et al.*, 1996. 1 – Tioesterificação de amino acil-adenilatos nos domínio A, B, C. 2 – Formação do dipeptídeo aminoacil-cisteinil-tioester no domínio B. 3 – Formação do tripeptídeo aminoacil-cistenil-valinil-tioester no domínio C. 4 – Epimerização do tripeptídeo. 5 – Hidrólise do tioester (L,L,D) ACV. 6 – Liberação do tripeptídeo L,L,D (ACV).

precipitação de proteínas com ácido tricloro-acético (Peters *et al.*, 1983; Lawen *et al.*, 1989). O material extraído é analisado por TLC, quantificando-se a radioatividade e identificando-se as substâncias por auto-radiografia ou por varredura em equipamento apropriado (Keller, 1987).

BIOSSÍNTESE DE PEPTÍDEOS MARCADOS COM AMINOÁCIDOS RADIOATIVOS

Aminoácidos marcados como ^{14}C -valina, ^3H -valina, ^{14}C -cisteína, ^{14}C -leucina, ^{14}C -ácido-hidroxi isovalérico, entre outros, são utilizados na caracterização de diversas enzimas. A especificidade das reações permite que se utilizem sistemas parcialmente purificados, ou extratos protéicos produzidos após a remoção de paredes celulares (Zocher *et al.*, 1982; Pieper *et al.*, 1995). Através de um método descontínuo, a enzima ACV sintetase é incubada com α -aminoadipato, cisteína e ^{14}C -valina (van Liempt *et al.*, 1989). O tripeptídeo sintetizado *in vitro* é adsorvido em resinas Porapak-Q por interação hidrofóbica. Após a remoção do excesso de ^{14}C -valina lavando-se as microcolunas em pH ácido, elui-se o tripeptídeo (ACV) com metanol. A formação do tripeptídeo é estimada medindo-se a radioatividade por cintilação. Adicionalmente, a biossíntese de ACV ou de qualquer outro peptídeo pode ser monitorada por métodos não-radioativos por cromatografia de alta resolução (HPLC), utilizando-se padrões obtidos por síntese química (por exemplo, Zhang & Demain, 1992).

APLICAÇÕES DA SÍNTESE PEPTÍDICA NÃO RIBOSSOMAL: A ENGENHARIA DE BIOSSÍNTESE DE ANTIBIÓTICOS-PEPTÍDICOS

Métodos recentes de mutação direcionada em enzimas multifuncionais envolvem um rearranjo programado de domínios dentro de uma enzima pela fusão de domínios de outras sintetases da mesma família (Stein *et al.*, 1995). Esta fusão de domínios visa a produção de novos antibióticos pela alteração da especificidade, conseqüentemente do substrato a ser inserido no peptídeo final. Entretanto, o mecanismo de catálise de peptídeo sintetases não está totalmente elucidado, sendo portanto necessário saber que região da enzima poderá ser removida sem que se altere a especificidade ou atividade catalítica. As reações de ativação de aminoácidos e de tioeste-

rificação podem ser monitoradas utilizando-se substratos radioativos, [^{32}P]PPi e ^{14}C -aminoácidos, para construções genéticas truncadas.

Na biossíntese de penicilinas, as etapas iniciais catalisadas pela enzima ACV sintetase ainda não foram totalmente caracterizadas sob o ponto de vista bioquímico, seja a seqüência de reações ou a especificidade dos domínios de ativação. Em outros sistemas, para estudar estas características em detalhe, métodos como a fragmentação por proteólise limitada (Skarpeid *et al.*, 1990; Pieper *et al.*, 1995) ou a expressão de fragmentos truncados de peptídeo sintetases em *Escherichia coli* têm sido utilizados (Haese *et al.*, 1994; Dieckmann *et al.*, 1995). A caracterização bioquímica de fragmentos truncados de peptídeo sintetases é importante para que se entendam as funções de regiões não-conservadas da seqüência que possam estar associadas, por exemplo, à seleção do substrato (Kleinkauf & von Döhren, 1996). Ou seja, para a expressão de sintetases híbridas que venham a produzir novos intermediários na biossíntese de penicilinas, por exemplo (Fig. 2), é essencial que se entendam as reações parciais em detalhe. A expressão de domínios de peptídeo sintetases de eucariotos em *E. coli* tem resultado na produção de proteínas pouco solúveis (Haese *et al.*, 1994) e com baixa atividade catalítica, devido à ausência de modificações pós-translacionais, essenciais para catálise, como a inserção do cofator 4'-fosfopantotenato (Ku *et al.*, 1997). Nossos trabalhos têm visado a expressão de fragmentos da ACV sintetase de *P. chrysogenum* em sistemas homólogos como *Aspergillus nidulans* (Etchegaray *et al.*, 1997b). Para analisar a expressão de fragmentos truncados da enzima ACV sintetase foram utilizados anticorpos sítio direcionados desenhados a partir da análise da estrutura primária da ACVS pelo método de Jameson & Wolf (1988). Utilizando anticorpos contra um segmento peptídico do domínio A foi possível confirmar a expressão da proteína de fusão (ACVS-domínio A- β -galactosidase) e também dos domínios B e C, neste caso utilizando-se anticorpos contra a extremidade C-terminal da ACVS de *P. chrysogenum* (Etchegaray *et al.*, 1997b). Adicionalmente, anticorpos obtidos contra o provável sítio de ligação de AMP, SGTGXPKG (Bairoch, 1991; Dieckmann *et al.*, 1997), apresentam alta especificidade, sendo comprovadamente eficazes na identificação de novas peptídeo sintetases (Etchegaray *et al.*, 1996a; 1997a). Esta ferramenta pode ser utilizada conjuntamente com métodos de clonagem de genes de peptídeo sintetases baseados na amplificação de DNA utilizando-se primers degenerados (Borchert *et al.*, 1994). Baseando-se em seqüências altamente conservadas de genes que codifi-

cam peptídeo sintetases, foram desenvolvidas técnicas utilizando PCR ou hibridização com sondas construídas a partir de fragmentos destas mesmas enzimas (Turgay & Marahiel, 1994; Nikolskaya *et al.*, 1995; Bernhard *et al.*, 1996). O método foi utilizado com sucesso em vários sistemas, como na identificação de genes associados à produção de faseolotoxina em *Pseudomonas syringae* e genes envolvidos na biossíntese de bacitracina em *Bacillus licheniformis* (Turgay & Marahiel, 1994).

PRODUÇÃO DE NOVOS ANTIBIÓTICOS

A especificidade das enzimas envolvidas na biossíntese de peptídeos pelo mecanismo de tiotemplato poderia ser modificada por manipulações genéticas, entretanto, estas alterações requerem um estudo detalhado das sintetases envolvidas, já que estas enzimas possuem em geral mais de 10.000 aminoácidos. Uma alteração programada da seqüência de aminoácidos de um antibiótico-peptídico pode ser elaborada através de uma manipulação genética realizada em duas etapas. Primeiramente remove-se a parte do gene que codifica a adição e modificação enzimática de um aminoácido particular, mais precisamente, remove-se um domínio de ativação de aminoácidos (Kleinkauf & von Döhren, 1996).

Para recompor o gene, é necessário inserir outro fragmento, codificando a adição e modificação enzimática (por exemplo, epimerização ou N-metilação) do aminoácido escolhido. A clonagem e o seqüenciamento de novos genes que codificam peptídeo sintetases têm aumentado o número de domínios que poderiam ser escolhidos, mas aminoácidos não-protéicos podem requerer a expressão de enzimas específicas para sua biossíntese, como no caso de β -aminoácidos graxos, substratos necessários para a biossíntese de iturina A (Besson & Hourdou, 1987; Besson *et al.*, 1992; Maget-Dana & Peipoux, 1994). O trabalho de Stachelhauss *et al.* (1995) visando a produção de novos lipopeptídeos, variantes de surfactina A, um hepta-peptídeo cíclico com propriedades surfactantes produzido por *B. subtilis* (Vater, 1986), considerado pioneiro na técnica de engenharia da biossíntese de antibióticos-peptídicos, foi baseado na metodologia descrita acima. A retirada de um fragmento de gene codificando a adição do aminoácido C-terminal (leucina) no lipopeptídeo surfactina A, resultou na produção de um hexa-peptídeo linear precursor de surfactina. A introdução de módulos associados à ativação de outros aminoácidos possibilitou

a inserção de aminoácidos ativados pela enzima gramicidina S sintetase 2 de *B. brevis* ou da ACV sintetase de *P. chrysogenum*, restabelecendo a biossíntese de um hepta-peptídeo cíclico (Stein *et al.*, 1995).

A engenharia da biossíntese de antibióticos-peptídicos apresenta aplicações imediatas, como a produção de novos antibióticos como uma alternativa para solucionar os problemas de resistência a drogas naturais (Stachelhauss *et al.*, 1996). A construção de um mutante do *A. nidulans* e os experimentos de expressão de uma ACV sintetase híbrida com fragmentos de *P. chrysogenum* e *A. nidulans* e produção concomitante de penicilina podem abrir novas oportunidades para a biossíntese de antibióticos do tipo β -lactama (penicilinas e cefalosporinas).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHARONOWITZ, Y.; BERGENMEYER, J.; CANTORAL, J.M.; COHEN, G.; DEMAIN, A.L.; FINK, U.; KINGHORN, J.; KLEINKAUF, H.; MAC-CABE, A.; PALISSA, H.; PFEIFER, E.; SCHWECKE, T.; VAN-LIEMPT, H.; VON DÖHREN, H.; WOLFE, S.; ZHANG, J. D-(L- α -Aminoacidipyl)-L-Cysteiny-D-Valine synthetase, the multienzyme integrating the four primary reactions in b-Lactam biosynthesis as a model peptide synthetase. **Bio/Technology**, v.11, p.807-810, 1993.
- AHN, J.H.; WALTON, J.D. Chromosomal organization of TOX2, a complex locus controlling host-selective toxin biosynthesis in *Cochliobolus carbonum*. **Plant Cell**, v.8, n.5, p.887-897, 1996.
- ASAKA, O.; MAKOTO, S. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. **Applied Environmental Microbiology**, v.62, n.11, p.4081-4085, 1996.
- BAILEY, A.M.; KERSHAW, M.J.; HUNT, B.A.; PATERSON, I.C.; CHARNLEY, A.K.; REYNOLDS, S.E.; CLARKSON, J.M. Cloning and sequence analysis of an intron-containing domain from a peptide synthetase-encoding gene of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Gene**, v.175, p.195-197, 1996.
- BAIROCH, A. Prosite release n.7, 1991.
- BALDWIN, J.E.; ABRAHAM, E. The biosynthesis of penicillins and cephalosporins. **Natural Products Research**, v.5, p.129-143, 1988.
- BATEMAN, R. The development of a mycoinsecticide for the control of locusts and grasshoppers. **Outlook Agriculture**, v.26, n.1, p.13-18, 1997.
- BERNHARD, F.; DEMEL, G.; SOLTANI, K.; VON DÖHREN, H.; BLINOV, V. Identification of genes encoding for peptide synthetases in the gram-negative bacterium *Lysobacter* sp. ATCC 53042 and the fungus *Cylindrotrichum oligospermum*. **DNA Sequence**, v.6, n.6, p.319-330, 1996.
- BESSON, F.; PEYPOUX, F.; MICHEL, G. Characterization of iturin A in antibiotics from various strains of *Bacillus subtilis*. **Journal of Antibiotics**, v.29, n.10, p.1043-1049, 1976.
- BESSON, F.; PEYPOUX, F.; MICHEL, G. Action of mycosubtilin and of bacillomycin L on *Micrococcus luteus* cells and protoplasts: Influence of the polarity of the antibiotics upon their action on the bacterial cytoplasmic membrane. **FEBS Letters**, v.90, n.1, p.36-40, 1978.
- BESSON, F.; HOURDOU, M.L. Effect of amino acids on the biosynthesis of b-amino acids, constituents of bacillomycins F. **Journal of Antibiotics**, v.40, n. 2, p.221-223, 1987.
- BESSON, F.; TENOUX, I.; HOURDOU, M.L.; MICHEL, G. Synthesis of b-hydroxy fatty acids and b-amino fatty acids by the strains of *Bacillus subtilis* producing iturinic antibiotics. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1123, p.51-58, 1992.
- BORCHERT, S.; PATIL, S.S.; MARAHIEL, M.A. Identification of putative multifunctional peptide synthetase genes using highly conserved oligonucleotide sequences derived from known synthetases. **FEMS Microbiology Letters**, v.92, p.175-180, 1992.

- BÖRNER, T. Peptide synthetase genes in toxin producing cyanobacteria. In: ENZYMOLOGY OF BIOSYNTHESIS OF NATURAL PRODUCTS, 1996, **Symposium of the Special Research Group Integrated Enzyme Systems**. Berlin, 1996, p.11.
- BREWER, D.; MASON, F.G.; TAYLOR, A. The production of alamethicins by *Trichoderma* spp. **Canadian Journal of Microbiology**, v.33, p.619-625, 1987.
- BURMESTER, J.; HAESE, A.; ZOCHER, R. Highly conserved N-methyltransferases as an integral part of peptide synthetases. **Biochemical and Molecular Biology International**, v.37, p.201-207, 1995.
- BUYSSENS, S.; HEUGENS, K.; POPPE, J.; HOFTE, M. Involvement of pyochelin and pyoverdinin in suppression of *Pythium*-induced damping-off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.3, 1996.
- CITERNESI, A.S.; FILIPPI, C.; BAGNOLI, G.; GIOVANNETTI, M. Effects of the antimycotic molecule iturin A2, secreted by *Bacillus subtilis* strain M51, on arbuscular mycorrhizal fungi. **Microbiological Research**, v.149, p.241-246, 1994.
- COSMINA, P.; RODRIGUEZ, F.; DE FERRA, F.; PEREGO, M.; VENEMA, G.; VAN SINDEREN, D. Sequence analysis of the genetic locus responsible for surfactin synthesis in *Bacillus subtilis*. **Molecular Microbiology**, v.8, p.821-831, 1993.
- CRONAN, J.E. b-alanine synthesis in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.141, p.1291-1297, 1980.
- DEMAIN, A. Microbial secondary metabolism: a new theoretical frontier for academia, a new opportunity for industry. In: SECONDARY metabolites: their function and evolution. Chichester: J. Wiley, 1992. p.3-23. (Ciba Foundation Symposium, 171).
- DIECKMANN, R.; LEE, Y.O.; VAN LIEMPT, H.; VON DÖHREN, H.; KLEINKAUF, H. Expression of an active adenylate-forming domain of peptide synthetases corresponding to acyl-CoA-synthetases. **FEBS Letters**, v.357, p.212-216, 1995.
- DIECKMANN, R.; PAVELA-VRANCIC, M.; PFEIFER, E.; VON DÖHREN, H.; KLEINKAUF, H. The adenylation domain of tyrocidine synthetase 1: structural and functional role of the interdomain linker region and the (S/T)GT(T/S)GXPKG core sequence. **European Journal of Biochemistry**, v.247, p.1074-1082, 1997.
- DITTMANN, J.; WENGER, R.M.; KLEINKAUF, H.; LAWEN. Mechanism of cyclosporin A biosynthesis: evidence for synthesis via a single linear undecapeptide precursor. **Journal of Biological Chemistry**, v.269, n.4, p.2841-2846, 1994.
- DONADIO, S.; STAVER, M.J.; McALPINE, J.B.; SWANSON, S.J.; KATZ, L. Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis. **Science**, v.252, p.675-679, 1991.
- EL HAJJI, M.; REBUFFAT, S.; LECOMMANDEUR, D.; BODO, B. Isolation and determination of trichorzianines A antifungal peptides from *Trichoderma barzitanum*. **International Journal of Peptide Protein Research**, v.29, p.207-215, 1987.
- ETCHEGARAY, A.; DIECKMANN, R.; VON DÖHREN, H. Generation of group specific antibodies against the putative AMP-binding domain signature: YTS GTTGXPKG. In: MEETING OF THE FEDERATION OF EUROPEAN BIOCHEMICAL SOCIETIES (FEBS'96), 24., 1996. Barcelona: FEBS, 1996a. p.88.
- ETCHEGARAY, A.; TURNER, G.; VON DÖHREN, H. A quench-flow approach to access specific aminoacylation sites in peptide synthetases. In: SYMPOSIUM OF THE SPECIAL RESEARCH GROUP INTEGRATED ENZYME SYSTEMS, 1996, Berlin. **Enzymology of biosynthesis of natural products** Berlin, 1996b, p.39.
- ETCHEGARAY, A.; DIECKMANN, R.; ENGEL, P.; TURNER, G.; VON DÖHREN, H. Group specific antibodies against the putative AMP-binding domain signature: SGT TGXPKG in peptide synthetases and related enzymes. (submetido ao Biochem. Mol. Biol. Intern.), 1997a.
- ETCHEGARAY, A.; DIECKMANN, R.; KENNEDY, J.; TURNER, G.; VON DÖHREN, H. ACV synthetase: Expression of amino acid activating domains of the *Penicillium chrysogenum* enzyme in *Aspergillus nidulans*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.237, p.166-169, 1997b.
- ETCHEGARAY, A.; TAVANLAR, M.A.; VON DÖHREN, H.; ENGEL, P.C. Localization of enzyme-bound intermediates in nonribosomal peptide biosynthesis by quench-flow and controlled proteolysis. (submetido ao Biochem. Mol. Biol. Intern.), 1997c.
- FUMA, S.; FUJISHIMA, Y.; CORBELL, N.; D'SOUZA, C.; NAKANO, M.M.; ZUBER, P.; YAMANE, K. Nucleotide sequence of 5' portion of *srfA* that contains the region required for competence establishment in *Bacillus subtilis*. **Nucleic Acid Research**, v.21, p.93-97, 1993.

- GALLI, G.; RODRIGUEZ, F.; COSMINA, P.; PRATESI, C.; NOGAROTTO, R.; FERRA, F.; GRANDI, G. Characterization of the surfactin synthetase multi-enzyme complex. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1205, p.19-28, 1994.
- GEIGER, O.; SPAINK, H.P.; KENNEDY, E.P. Isolation of the *Rizobium leguminosarum* NodF nodulation protein: NodF carries a 4'-phosphopantetheine prosthetic group. **Journal of Bacteriology**, v.173, n.9, p.2872-2878, 1991.
- GOCHT, M.; MARAHIEL, M.A. Analysis of core sequences in the D-Phe activating domain of the multifunctional peptide synthetase TycA by site-directed mutagenesis. **Journal of Bacteriology**, v.176, n.9, p.2654-2662, 1994.
- HAESE, A.; SCHUBERT, M.; HERRMANN, M.; ZOCHER, R. Molecular characterization of the enniatin synthetase gene encoding a multifunctional enzyme catalysing N-methyldepsipeptide formation in *Fusarium scirpi*. **Molecular Microbiology**, v.7, p.905-914, 1993.
- HAESE, A.; PIEPER, R.; VON OSTROWSKI, T.; ZOCHER, R. Bacterial expression of catalytically active fragments of the multifunctional enzyme enniatin synthetase. **Journal Molecular Biology**, v.243, p.116-122, 1994.
- HANSEN, J.N. Antibiotics Synthesized by Posttranslational Modification. **Annual Review of Microbiology**, v.47, p.535-564, 1993.
- HOSTED, T.J.; MCHENNEY, M.A.; DE HOFF, B.S.; ROSTECK JR., P.R.; BALTZ, R.H. Genetics of lipopeptide antibiotic biosynthesis by *Streptomyces fradiae* and *Streptomyces roseosporus*. In: SYMPOSIUM OF THE SPECIAL RESEARCH GROUP INTEGRATED ENZYME SYSTEMS, 1996, Berlin. **Enzymology of biosynthesis of natural products**. Berlin, Germany, 1996, p.9.
- JAMESON, B.A.; WOLF, H. The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. **Cabios**, v.4, p.181-186, 1988.
- JEGOROV, A.; SEDMERA, P.; MATHA, V. Biosynthesis of destruxins. **Phytochemistry**, v.33, n.6, p.1403-1405, 1993.
- JONES, M.J.; DUNKLE, L.D. Virulence gene expression during conidial germination in *Cochliobolus carbonum*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.8, n.3, p.476-479, 1995.
- KALLOW, W.; VON DÖHREN, H.; KENNEDY, J.; TURNER, G. Functional consequences of structural variation of the thioesterase domain of ACV synthetase. In: SYMPOSIUM OF THE SPECIAL RESEARCH GROUP INTEGRATED ENZYME SYSTEMS, 1996, Berlin. **Enzymology of biosynthesis of natural products**. Berlin, 1996, p.63.
- KATZ, L.; DONADIO, S. Polyketide synthesis: prospects for hybrid antibiotics. **Annual Review of Microbiology**, v.47, p.875-912, 1993.
- KELLER, U.; Actinomycin synthetases: Multifunctional enzymes responsible for the synthesis of the peptide chains of actinomycin. **Journal Biological Chemistry**, v.262, n.12, p.5852-5856, 1987.
- KLEINKAUF, H.; VON DÖHREN, H. Biosynthesis of peptide antibiotics. **Annual Review of Microbiology**, v.41, p.259-289, 1987.
- KLEINKAUF, H.; VON DÖHREN, H. Nonribosomal biosynthesis of peptide antibiotics. **European Journal of Biochemistry**, v.192, p.1-15, 1990.
- KLEINKAUF, H.; VON DÖHREN, H. Linking peptide and polypeptide biosynthesis. **Journal Antibiotics**, v.48, n.7, p.563-567, 1995.
- KLEINKAUF, H.; VON DÖHREN, H. A nonribosomal system of peptide biosynthesis. **European Journal of Biochemistry**, v.236, p.335-351, 1996.
- KLICH, M.A.; LAX, A.E.; BLAND, J.M. Inhibition of some mycotoxigenic fungi by iturin A, a peptidolipid produced by *Bacillus subtilis*. **Mycopathologia**, v.116, n.2, p.77-80, 1991.
- KLICH, M.A.; ARTHUR, K.S.; LAX, A.E.; BLAND, J.M. Iturin A: A potential new fungicide for stored grains. **Mycopathologia**, v.127, p.123-127, 1994.
- KU, J.; MIRMIRA, R.G.; LIU, L.; SANTI, D.V. Expression of a functional non-ribosomal peptide synthetase module in *Escherichia coli* by coexpression with a phosphopantetheinyl transferase. **Chemical Biology**, v.4, n.3, p.203-307, 1997.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- LAKIN-THOMAS, P.L.; BRODY, S. A pantothenate derivative is covalently bound to mitochondrial proteins in *Neurospora crassa*. **European Journal Biochemistry**, v.146, p.141-147, 1985.
- LAKIN-THOMAS, P.L.; BRODY, S. *Neurospora crassa* mitochondria contain two forms of a 4'-phosphopantetheine-modified protein. **Journal of Biological Chemistry**, 261, n.11, p.4785-4788, 1986.

- LANDY, M.; WARREN, G.H.; ROSENMAN, S.B.; COLIO, L.G. Bacillomycin: An antibiotic from *Bacillus subtilis* active against pathogenic fungi. **Proceedings Society Experimental Biology and Medicine**. v.67, p.539-541, 1948.
- LAWEN, A.; TRABER, R.; GEYL, D.; ZOCHER, R.; KLEINKAUF, H. Cell-free biosynthesis of new cyclosporins. **Journal of Antibiotics**. v.XLII, n.8, p.1283-1289, 1989.
- LEE, S.G.; LIPMANN, F. Isolation of a peptidyl-pantetheine-protein from tyrocidine-synthesizing polyenzymes. **Proceedings National Academy of Science USA**. v.71, n.3, p.607-611, 1974.
- LEE, S.G.; LIPMANN, F. Tyrocidine synthetase system 1. **Methods in Enzymology**. v.43, p.585-602, 1975.
- LIPMANN, F. Attempts to map a process evolution of peptide biosynthesis: Synthesis of peptide antibiotics from thiol-linked amino acids parallels fatty acid synthesis. **Science**. v.173, p.875-884, 1971.
- MAGET-DANA, R.; PEYPOUX, F. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. **Toxicology**. v.87, p.151-174, 1994.
- MAGNUSON, K.; JACKOWSKI, S.; ROCK, C.O.; CRONAN JR., J.E. Regulation of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. **Microbiology Review**. v.57, n.3, p.522-542, 1993.
- MARAHIEL, M.A. Multidomain enzymes involved in peptide synthesis. **FEBS Letters**. v.307, p.40-43, 1992.
- MARSCHNER, P.; CROWLEY, D.E. Iron stress and pyoverdinin production by a fluorescent pseudomonad in the rhizosphere of white lupine (*Lupinus albus* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.). **Applied and Environmental Microbiology**. v.63, n.1, p.277-281, 1997.
- MEISSNER, K.; DITTMANN, E.; BÖRNER, T. Toxic and non-toxic strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* contain sequences homologous to peptide synthetase genes. **FEMS Microbiology Letters**. v.135, n.2-3, p.295-303, 1996.
- MEISTER, A.; Glutathione Metabolism and its Selective Modification. **Journal of Biological Chemistry**. v.263, p.17205-17208, 1988.
- MOHR, H.; KLEINKAUF, H. Alamethicin biosynthesis: acetylation of the amino terminus and attachment of phenylalaninol. **Biochimica Biophysica Acta**. v.526, p.375-386, 1978.
- NIKOLSKAYA, A.N.; PANACCIONE, D.G.; WALTON, J.D. Identification of peptide synthetase-encoding genes from filamentous fungi producing host-selective phytotoxins or analogs. **Gene**. v.165, p.207-211, 1995.
- PAIS, M.; DAS, B.C.; FERRON, P. Depsipeptides from *Metarhizium anisopliae*. **Phytochemistry**. v.20, n.4, p.715-723, 1981.
- PANACCIONE, D.G. Multiple families of peptide synthetase genes from ergopeptide-producing fungi. **Mycological Research**. v.100, n.4, p.429-436, 1996.
- PAVELA-VRANCIC, M.; PFEIFER, E.; SCHRÖDER, W.; VON DÖHREN, H.; KLEINKAUF, H.; Identification of the ATP-binding site in tyrocidine synthetase 1 by selective modification with fluorescein 5'-isothiocyanate. **Journal of Biological Chemistry**. v.269, p.14962-14966, 1994a.
- PAVELA-VRANCIC, M.; PFEIFER, E.; VAN LIEMPT, H.; SCHÄFER, H.J.; VON DÖHREN, H.; KLEINKAUF, H. ATP binding in peptide synthetases: determination of contact sites of the adenine moiety by photoaffinity labeling of tyrocidine synthetase 1 with 2-azidoadenosine triphosphate. **Biochemistry**. v.33, p.6276-6283, 1994b.
- PETERS, H.; ZOCHER, R.; MADRY, N.; OELRICHS, P.B.; KLEINKAUF, H.; KRAEPELIN, G. Cell-free synthesis of the depsipeptide beauvericin. **Journal of Antibiotics**. v.XXXVI, n.12, p.1762-1766, 1983.
- PHAE, C.G.; SHODA, M.; KUBOTA, H. Suppressive effect of *Bacillus subtilis* and its products on phytopathogenic microorganisms. **Journal of Fermentation Bioengineering**. v.69, n.1, p.1-7, 1990.
- PIEPER, R.; HAESE, A.; SCHRÖDER, W.; ZOCHER, R. Arrangement of catalytic sites in the multifunctional enzyme enniatin synthetase. **European Journal of Biochemistry**. v.230, p.119-126, 1995.
- RAIBAUD, A.; ZALACAIN, M.; HOLT, T.G.; TIZARD, R.; THOMPSON, C.J. Nucleotide sequence analysis reveals linked N-acetyl hydrolase, thioesterase, transport and regulatory genes encoded by the bialaphos biosynthetic gene cluster of *Streptomyces hygroscopicus*. **Journal of Bacteriology**. v.173, p.4454-4463, 1991.
- RIEDERER, B.; HAN, M.; KELLER, U. D-lysergyl peptide synthetase from the ergot fungus *Claviceps purpurea*. **Journal of Biological Chemistry**. v.271, n.44, p.27524-27530, 1996.
- RITTIENI, A.; FOGLIANO, V.; NANNO, D.; RANDAZZO, G.; ALTOMARE, C.; PERRONE, G.; BOTTALICO, A.; MADDAU, L.; MARRAS, L. Paracelsin E, a new peptaibol from *Trichoderma Saturnisporium*. **Journal of Natural Products**. v.58, n.11, p.1745-1748, 1995.

- ROBINSON, J.A. Enzymes of secondary metabolism in microorganisms. **Chemical Society Reviews**, v.17, p.383-452, 1988.
- ROSKOSKI, R.; KLEINKAUF, H.; GEVERS, W.; LIPMANN, F. Isolation of enzyme-bound peptide intermediates in tyrocidine biosynthesis. **Biochemistry**, v.9, n.25, p.4846-4850, 1970.
- RUSNAK, F.; SAKAITANI, M.; DRUECKHAMMER, D.; REICHERT, J.; WALSH, C.T. Biosynthesis of the *Escherichia coli* siderofore enterobactin: sequence of the *entF* gene, expression and purification of *EntF*, and analysis of covalent phosphopantetheine. **Biochemistry**, v.30, n.11, p.2917-2927, 1991.
- SCHIRMBÖCK, M.; LORITO, M.; WANG, Y.L.; HAYES, C.K.; ARISAN-ATAC, I.; SCALA, F.; HARMAN, G.E.; KUBICEK, C. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, n.12, p.4364-4370, 1994.
- SCHLUMBOHM, W.; STEIN, T.; ULRICH, C.; VATER, J.; KRAUSE, M.; MARAHIEL, M.A.; KRUF, V.; WITTMANN-LIEBOLD, B. An active serine is involved in covalent substrate amino acid binding at each reaction center of gramicidin S synthetase. **Journal of Biological Chemistry**, v.266, p.23135-23141, 1991.
- SHIVELY, J.E.; PAXTON, R.J.; LEE, T.D. Highlights of protein structural analysis. **TIBS**, v.14, p.246-252, 1989.
- SHIAU, C.Y.; BYFORD, M.F.; APLIN, R.T.; BALDWIN, J.E.; SCHOFIELD, C.J. D-L-(α -Aminoamidopyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase: thioesterification of valine is not obligatory for peptide bond formation. **Biochemistry**, v.36, n.29, p.8798-8806, 1997.
- SKARPEID, H.J.; ZIMMER, T.L.; VON DÖHREN, H. On the domain construction of the multienzyme gramicidin S synthetase 2. Isolation of domains activating valine and leucine. **European Journal of Biochemistry**, v.189, n.3, p.517-522, 1990.
- SIVONEN, K. Peptide synthetases in *Anabaena* cyanobacteria. In: SYMPOSIUM OF THE SPECIAL RESEARCH GROUP INTEGRATED ENZYME SYSTEMS, 1996, Berlin. **Enzymology of biosynthesis of natural products**, Berlin, 1996, p.12.
- SMITH, D.J.; EARL, A.J.; TURNER, G. The multifunctional peptide synthetase performing the first step of penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum* is a 421073 dalton protein similar to *Bacillus brevis* peptide antibiotic synthetases. **EMBO Journal**, v.9, n.9, p.2743-2750, 1990.
- STACHELHAUSS, T.; MARAHIEL, M. Modular Structure of Genes Encoding Multifunctional Peptide Synthetases Required for Non-Ribosomal Peptide Synthesis. **FEMS Microbiology Letters**, v.125, p.3-14, 1995.
- STACHELHAUSS, T.; SCHNEIDER, A.; MARAHIEL, M. Rational design of peptide antibiotics by targeted replacement of bacterial and fungal domains. **Science**, v.269, p.69-72, 1995.
- STACHELHAUSS, T.; SCHNEIDER, A.; MARAHIEL, M. Engineered biosynthesis of peptide antibiotics. **Biochemical Pharmacology**, v.52, p.177-186, 1996.
- STEIN, T.; VATER, J.; KRUF, V.; WITTMANN-LIEBOLD, B.; FRANKE, P.; PANICO, M.; McDOWELL, R.; MORRIS, H.R. Detection of 4'-phosphopantetheine at the thioester binding site for L-valine of gramicidin S synthetase 2. **FEBS Letters**, v.340, p.39-44, 1994.
- STEIN, T.; VATER, J.; KRUF, V.; OTTO, A.; WITTMANN-LIEBOLD, B.; FRANKE, P.; PANICO, M.; McDOWELL, R.; MORRIS, H.R. The multiple carrier model of nonribosomal peptide biosynthesis at modular multienzymatic templates. **Journal of Biological Chemistry**, v.271, p.15428-15435, 1996.
- THIMON, L.; PEYPOUX, F.; MAGET-DANA, R.; ROUX, B.; MICHEL, G. Interactions of bioactive lipopeptides, Iturin A and surfactin from *Bacillus subtilis*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.16, p.144-151, 1992.
- TURGAY, K.; KRAUSE, M.; MARAHIEL, M. Four homologous domains in the primary structure of GrsB are related to domains in a superfamily of adenylate-forming enzymes. **Molecular Microbiology**, v.6, p.529-546, 1992.
- TURGAY, K.; MARAHIEL, M.; A general approach for identifying and cloning peptide synthetase genes. **Peptide Research**, v.7, n.5, p.238-241, 1994.
- TURNER, G.; KENNEDY, J.; AREZI, B.; KALLOW, W. Genetic analysis of ACV synthetase in *Aspergillus nidulans*. In: SYMPOSIUM OF THE SPECIAL RESEARCH GROUP INTEGRATED ENZYME SYSTEMS, 1996, Berlin. **Enzymology of biosynthesis of natural products**, Berlin, 1996, p.7.
- VAN LIEMPT, H.; VON DÖHREN, H.; KLEINKAUF, H.; d-(L- α -aminoamidopyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase from *Aspergillus nidulans*: The first enzyme in penicillin biosynthesis is a multifunctional peptide synthetase. **Journal of Biological Chemistry**, v.264, n.7, p.3680-3684, 1989.

- VATER, J. Lipopeptides, an attractive class of microbial surfactants. **Progress in Colloid & Polymer Science**, v.72, p.12-18, 1986.
- VOLLENBROICH, D.; KLUGE, B.; D'SOUZA, C.; ZUBER, P.; VATER, J. Analysis of a mutant amino acid-activating domain of surfactin synthetase bearing a serine-to-alanine substitution at the site of carboxylthioester formation. **FEBS Letters**, v.325, n.3, p.220-224, 1993.
- WAKIL, S.J. Fatty acid synthetase, a proficient multifunctional enzyme. **Biochemistry**, v.28, p.4523-4530, 1989.
- WALTON, J.D.; AHN, J.H.; PITKIN, J.W.; NIKOLSKAYA, A. Biochemical genetics of a cyclic tetrapeptide with a fatty acid side chain that is required for plant pathogenicity. In: SYMPOSIUM OF THE SPECIAL RESEARCH GROUP INTEGRATED ENZYME SYSTEMS, 1996, Berlin. **Enzymology of biosynthesis of natural products**. Berlin, 1996, p.14.
- WALZEL, B.; KELLER, U.; Mechanism of D-lysergyl peptide formation in the ergot fungus *Claviceps purpurea*. In: SYMPOSIUM OF THE SPECIAL RESEARCH GROUP INTEGRATED ENZYME SYSTEMS, 1996, Berlin. **Enzymology of biosynthesis of natural products**. Berlin, 1996, p.71.
- WALZEL, B.; RIEDERER, B.; KELLER, U. Mechanism of alkaloid cyclopeptide synthesis in the ergot fungus *Claviceps purpurea*. **Chemical Biology**, v.4, n.3, p.223-230, 1997.
- WEBER, G.; SCHMORGENDÖRFER, K.; SCHNEIDER-SCHERZER, E.; LEITNER, E. The peptide synthetase catalyzing cyclosporin production in *Tolypocladium niveum* is encoded by a giant 45.8-kilobase open reading frame. **Current Genetics**, v.26, 120-125, 1994.
- ZHANG, J.; DEMAIN, A.L. ACV synthetase. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.12, n.3, p.245-260, 1992.
- ZHANG, J.H.; QUIGLEY, N.B.; GROSS, D.C. Analysis of the *syrB* and *syrC* genes of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* indicates that syringomycin is synthesized by a thiotemplate mechanism. **Journal of Bacteriology**, v.177, p.4009-4020, 1995.
- ZOCHER, R.; KELLER, U.; KLEINKAUF, H. Enniatin synthetase, a novel type of multifunctional enzyme catalyzing depsipeptide synthesis in *Fusarium oxysporum*. **Biochemistry**, v.21, n.1, p.43-48, 1982.



PARTE VI

BIOMASSA MICROBIANA



BALANÇO DE CARBONO E BIOMASSA MICROBIANA EM SOLOS DA AMAZÔNIA

Brigitte Josefine Feigl

Carlos Clemente Cerri

Martinal Bernoux

Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo
Caixa Postal 96, CEP 13400-970, Piracicaba, SP

INTRODUÇÃO

A biomassa microbiana é o principal responsável pela decomposição dos resíduos orgânicos, pela ciclagem de nutrientes e pelo fluxo de energia dentro do solo, exercendo sua influência tanto na transformação da matéria orgânica quanto na estocagem do carbono e nutrientes minerais, ou seja, na liberação e imobilização de nutrientes na maior parte dos ecossistemas terrestres (Jenkinson & Ladd, 1981). Esse seu papel torna-se ainda mais importante nos solos vermelhos e amarelos, tipicamente ácidos e pobres em nutrientes, que suportam as florestas tropicais úmidas da Amazônia. A produtividade dos ecossistemas naturais dessa região depende, portanto, da ciclagem dos nutrientes minerais contidos na liteira vegetal e na matéria orgânica do solo, constituindo um sistema em equilíbrio (Salati & Vose, 1984). Mudanças no uso da terra, como cultivo itinerante, cultivo intensivo de culturas anuais, culturas perenes ou pastagens, alteram drasticamente esse equilíbrio. O uso do fogo para “preparar” e “fertilizar” a área a ser cultivada é prática corrente na região, contribuindo, entre outros aspectos, para a alteração dos estoques de carbono no solo, aumento da concentração de gases responsáveis pelo efeito estufa na atmosfera e modificação da

distribuição e da atividade da biomassa microbiana do solo. Fearnside (1995) calcula que, do total da área desmatada anualmente na Amazônia, 20% são destinados a culturas anuais e 80% são convertidos diretamente em pastagens. Para o estado do Pará, Serrão (comunicação pessoal) estima que 50% da área desmatada sejam utilizados com pastagens, podendo chegar a 70% quando se consideram todas as áreas que por algum período sustentaram a pecuária bovina (Serrão, 1992). Embora esses valores não sejam iguais para toda a região, provavelmente não se incorre em superestimativa quando se considera que metade dos 425.000 km² desmatados até 1991 esteja atualmente coberta por pastagem, ou seja, uma área equivalente ao estado de São Paulo. Além de sua evidente importância em área, a introdução de gramíneas (plantas de ciclo fotossintético C4) em sucessão à floresta (plantas predominantemente de ciclo fotossintético C3) permite o cálculo do **balanço de carbono** por técnicas isotópicas (Cerri *et al.*, 1985). A diferente discriminação do isótopo ¹³C, durante os dois ciclos fotossintéticos, reflete-se na composição isotópica (razão ¹³C/¹²C) do material vegetal sintetizado que, por sua vez, dará origem à matéria orgânica do solo. A variação dessa composição isotópica, após a mudança da cobertura vegetal do solo, permite determinar a origem da matéria orgânica do solo (floresta ou pastagem), única maneira de se acompanhar com segurança a taxa de mineralização do carbono remanescente da floresta e a taxa de acúmulo do carbono derivado das gramíneas.

STOQUES DE CARBONO E FLUXOS

O cálculo do balanço do carbono na sucessão floresta/pastagem exige avaliação das diferentes entradas e saídas de material do sistema. Alguns dos parâmetros analisados a seguir foram obtidos na literatura, enquanto outros foram determinados a partir de análises da composição isotópica do ¹³C, de amostras coletadas pelos autores.

Fitomassa da Floresta

Para fins de cálculo, foi considerado o valor médio de 30,0 kg MS.m⁻² (MS = matéria seca), com variação de 4,5 kg MS.m⁻² para a fitomassa aérea (vegetação em pé, troncos caídos e liteira), indicado pela maioria dos trabalhos publicados sobre a Bacia Amazônica brasileira (Brown *et*

al., 1995; Fearnside, 1992, 1987, 1985; Uhl *et al.*, 1988). Descontados cerca de 3,0 kg MS.m⁻² (Cerri *et al.*, 1994), referentes à extração da madeira, a biomassa aérea potencialmente queimável varia entre 22,5 e 31,5 kg MS.m⁻². Esses valores correspondem a 10,1-14,2 kg C.m⁻² para um teor de carbono de 45%. Dados sobre a biomassa radicular são bastante escassos. Consideramos que as raízes representam de 10 a 20% da biomassa aérea, ou seja, de 3,5 a 5,2 kg MS.m⁻², o que corresponde a 1,6-2,3 kg C.m⁻².

Carbono do Solo

Moraes *et al.* (1995) estimaram o estoque de carbono nos solos da Amazônia Legal (aproximadamente 5.000.000 km²) em 47 Pg C na camada 0-100 cm, sendo 45% (21 Pg C) concentrados nos 20 cm superficiais. Esse valor corresponde a uma densidade média de carbono de 4,2 kg C.m⁻². Entretanto, dois tipos de solo, os oxissolos e os ultissolos, na classificação USDA, cobrem cerca de 75% da região, representando também a maior parte das áreas desmatadas para implantação de pastagem. A densidade média na camada 0-20 cm de 4,0 kg C.m⁻², segundo Moraes (1991), foi usada nos cálculos subseqüentes.

Fitomassa da Pastagem

Segundo a literatura, a fitomassa aérea das pastagens varia entre 1,0 e 1,5 kg MS.m⁻² (Fearnside, 1992; Teixeira, 1987), e a radicular entre 1,5 e 3,2 kg MS.m⁻². Esses valores correspondem respectivamente a 0,45-0,68 kg C.m⁻² e 0,67-1,44 kg C.m⁻², considerando-se o teor de carbono como sendo de 45%.

Combustão e Mineralização da Fitomassa da Floresta

A eficiência da combustão (EC) foi estimada nas proximidades de Manaus (AM) como sendo de 27,6% (Fearnside *et al.*, 1993). A EC da fitomassa aérea da floresta depende da composição florística, da estrutura da floresta, do clima do local antes e durante a queima e da duração e condições do período de secagem da vegetação derrubada. Uma EC de 25% implica, portanto, numa transferência direta de 2,5 a 3,5 kg C.m⁻² para a atmosfera durante o evento da queima. Os restantes 75% da fitomassa aérea (principalmente troncos parcialmente queimados) são mineralizados durante os anos seguintes.

Carbono do Solo Perdido e Fixado

Estudo recente conduzido em Rondônia (Moraes *et al.*, 1995) mostrou que o estoque de carbono total do solo aumentou 9% após a instalação da pastagem, em relação ao mesmo solo sob floresta durante os primeiros 5 anos. Esse valor alcança 19% depois de 35 anos. Isso corresponde a um acúmulo de carbono de respectivamente 0,36 e 0,76 kg C.m⁻², considerando-se um valor médio de 4,0 kg C.m⁻² para sua concentração no solo. Calculando a relação entre o carbono do solo remanescente do sistema florestal (Cf) e o carbono do solo introduzido pelas gramíneas da pastagem (Cp), segundo Cerri *et al.* (1985), os autores verificaram que, após 5 anos, o Cf remanescente ainda representava de 55,7 a 68,7% do carbono total do solo, enquanto que o Cp introduzido contribui com 33,1-33,3%. Depois de 35 anos, essas proporções se alteraram para 51,3-54,8%, relativas ao Cf, e 35,2-48,7%, referentes ao Cp. Desse modo, foi possível mostrar que a perda de 1,0-1,6 kg C.m⁻² ocorreu durante os primeiros 5 anos após a introdução da pastagem, contra uma fixação de carbono, pela pastagem, de 1,7-2,3 kg C.m⁻² durante 35 anos.

BALANÇO DO CARBONO

Com base nas considerações e nos cálculos apresentados foi elaborada a Tabela 1, que mostra os ganhos e perdas de carbono do solo após a conversão floresta/pastagem, assumindo que a pastagem introduzida permaneceu ativa durante um período de 35 anos.

Os valores encontrados demonstram que o processo da conversão da floresta em pastagem atua como uma fonte de carbono para a atmosfera. Esse tipo de mudança no uso da terra resulta numa liberação de 8,4 a 15,3 kg C.m⁻², se a pastagem for bem manejada por um período de 35 anos, enquanto o estoque de carbono do solo sob floresta não tem participação no efeito estufa, uma vez que o sistema está em equilíbrio. O acúmulo de carbono no solo pelo agrossistema de pastagem fica evidenciado pelo aumento de 0,76 kg C.m⁻², 35 anos após sua introdução.

Em resumo, todas as formas de carbono orgânico presentes na fitomassa da floresta estão sujeitas à mineralização e liberação para a atmosfera. A quantidade de carbono imobilizada na fitomassa aérea e radicular da floresta é estimada em 11,7-16,6 kg C.m⁻², dos quais 2,5-3,5 kg C.m⁻² são liberados durante a queima. O restante é decomposto de forma lenta, principalmente pela biomassa microbiana do solo, poden-

TABELA 1. Balanço do carbono de um sistema de conversão floresta/pastagem durante 35 anos.

CARBONO	QUEIMA		0-35 ANOS		TOTAL	
	min	max	min	max	min	max.
10^3 g C.m^{-2}						
PERDIDO pelo solo da floresta (0-20 cm)		0	1,00	1,60	1,00	1,60
biomassa aérea	2,53	3,54	7,60	10,63	10,13	14,17
biomassa radicular		0	1,57	2,39	1,57	2,39
Total	2,53	3,54	10,17	14,62	12,70	18,16
FIXADO pelo solo da pastagem (0-20 cm)			1,67	2,32	1,67	2,32
biomassa aérea			0,45	0,68	0,45	0,68
biomassa radicular			0,67	1,44	0,67	1,44
Total			2,79	4,44	2,79	4,44
BALANÇO	+2,53	+3,54	+5,73	+11,83	+8,26	+15,37

+ = Liberação de carbono para a atmosfera

do de novo ser queimado, se o fogo for usado para “limpar” a pastagem. No que se refere à pastagem, pode-se considerar que, em dois ou três anos, a fitomassa aérea e a radicular atingem um equilíbrio a 1,1-2,1 kg C.m². Esta nova fitomassa representa de 8 a 20% da fitomassa da floresta original. A substituição da fitomassa resulta, portanto, numa perda de 9,6-15,5 kg C.m⁻², reduzida para 8,4-15,3 kg C.m⁻² pela fixação de carbono pelos solos sob pastagem.

O PAPEL DA BIOMASSA MICROBIANA

A decomposição da matéria orgânica do solo envolve fracionamento físico, transformações bioquímicas e estabilização biofísica do material orgânico. Microrganismos heterótrofos, que promovem a decomposição primária, utilizam o carbono do material orgânico para seu metabolismo, aproveitando cerca de 95% da energia contida na matéria orgânica do

olo. A subsequente decomposição desses organismos e seus produtos resultam na formação de materiais húmicos complexos e heterogêneos.

Modelos atuais de dinâmica da matéria orgânica do solo (Parton *et al.*, 1989) consideram três frações principais, com diferentes tempos de ciclagem: a ativa (0 a 14 anos), a lenta (5 anos) e a passiva (150 anos). Devido justamente a essas diferenças temporais, a resposta da matéria orgânica do solo às mudanças do uso da terra e às técnicas de manejo podem passar despercebidas por décadas, enquanto a resposta da fração ativa, que contém principalmente a biomassa microbiana e seus metabólitos, ocorre muito mais rapidamente. Informações sobre as alterações da biomassa microbiana, após a remoção de uma vegetação, são importantes porque podem dar indicações sobre as mudanças que estão ocorrendo na matéria orgânica do solo (Sparling & Ross, 1993; Powlson & Jenkinson, 1981). A própria biomassa microbiana também contribui com a fertilidade do solo, contendo ela mesma uma quantidade considerável de nutrientes potencialmente disponíveis para as plantas (Duxbury *et al.*, 1989; Jenkinson, 1988). Áreas agrícolas contêm em torno de 200-1.000 μg de biomassa-C.g⁻¹ de solo, o que equivale a 100-1.000 kg de nitrogênio e 50-300 kg de fósforo por hectare na camada 0-100 cm do solo. Essas quantias muitas vezes excedem a suplementação anual de nutrientes aplicados na forma de fertilizantes, e sua disponibilidade depende da dinâmica dos microrganismos. Eles, portanto, representam um estoque lábil de nutrientes, além de desempenharem papel ativo na prevenção de lixiviação, através da imobilização. Apesar de sua importância, existe um número limitado de estudos do efeito do desflorestamento sobre a matéria orgânica do solo e principalmente sobre a biomassa microbiana (Luizão *et al.*, 1992; Pfenning *et al.*, 1992; Bionde *et al.*, 1991) para os solos da região amazônica.

MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA BIOMASSA MICROBIANA DO SOLO

Este trabalho está baseado na revisão de métodos de medida de biomassa microbiana-C de Martens (1995), à qual foram incorporados resultados obtidos por Feigl *et al.* (1995) em solos da Amazônia, a título de exemplo das vantagens e dificuldades encontradas na sua aplicação. O estudo procurou incluir solos com características diferentes (Tabela 2),

representativos da região, sempre da camada 0-10 cm sob floresta. Os oxissolos correspondem a latossolos amarelos argilosos na classificação brasileira, e constituem cerca de 40% da área total; os ultissolos representam um podzólico vermelho-amarelo e um podzólico vermelho-escuro (29,5%), e o alfissol é também um podzólico vermelho-escuro (10,0%).

Abordaremos alguns dos métodos bioquímicos de quantificação da biomassa microbiana, aqueles atualmente mais aceitos, baratos e fáceis de aplicar, principalmente em análises de rotina de um grande número de amostras. Dentre eles destacam-se os métodos biocidas, desenvolvidos após a observação de que tratamentos de esterilização parcial do solo com agentes fumigantes aumentavam a disponibilidade de vários elementos no solo. Constatou-se que tais elementos (C, N, P e S) eram liberados durante o processo de decomposição da população microbiana morta pelo produto tóxico, promovida principalmente pelas bactérias da nova população que se instalava. Diversos estudos (Jenkinson, 1966) foram feitos para confirmar tanto a origem microbiana dos elementos liberados quanto a eficácia da fumigação com clorofórmio (CHCl_3), em comparação com outros agentes biocidas, como irradiação, calor e vapor de CH_3Br . Todos os tratamentos resultaram numa liberação semelhante de CO_2 , mostrando que agiram sobre a mesma fração da matéria orgânica do solo. A dúvida de se os vapores do clorofórmio poderiam eventualmente estar removendo proteções físicas ou químicas do substrato (como, por exemplo, dissolvendo filmes de ácidos graxos que estivessem protegendo material decomponível) fica sanada pelo fato de que dificilmente a irradiação agiria da mesma forma. Jenkinson (1966), então, concluiu que a intensidade do fluxo de CO_2 pós-fumigação poderia fornecer uma medida da biomassa microbiana presente no solo.

TABELA 2. Características da camada 0-10 cm dos solos sob floresta nativa.

SOLOS	LOCALIZAÇÃO	%C	%N	C:N	PH	%ARGILA
Oxissol	Manaus (AM)	2.53	0.31	8.2	3.62	77.9
Oxissol	Paragominas (PA)	3.33	0.25	13.3	4.54	80.0
Ultissol	Ariquemes (RO)	1.27	0.15	8.5	6.12	17.6
Ultissol	Ariquemes (RO)	1.01	0.11	9.2	5.65	24.8
Alfissol	Ouro Preto d'Oeste (RO)	1.96	0.13	15.1	5.54	23.0

O Método da Fumigação-Incubação (FI)

A fumigação-incubação foi o método bioquímico pioneiro de quantificação da biomassa microbiana do solo, que veio para substituir os trabalhosos e imprecisos métodos de contagem direta em microscópio. Ele foi proposto por Jenkinson e Powlson em 1976. Consiste na quantificação do fluxo de CO_2 liberado por um solo durante um período de incubação de 10 dias, após fumigação com clorofórmio purificado. O procedimento experimental está ilustrado na Fig. 1.

O procedimento padrão do método de fumigação-incubação (FI) consiste na fumigação de três, de seis repetições de 25 g de cada solo, por 24 horas com clorofórmio isento de etanol. Em seguida, tanto as amostras fumigadas como os controles não-fumigados são incubados por 10 dias a 25°C em jarros herméticos de 2 litros juntamente com um becker contendo 10 ml de NaOH 1,0 M. O CO_2 evoluído é medido por titulação do NaOH residual com HCl a 0,5 N, após precipitação do carbonato com BaCl_2 , usando fenolftaleína como indicador (Cheng & Coleman, 1989).

$$\text{Biomassa-C} = \frac{\text{CO}_2\text{-C fumigado} - \text{CO}_2\text{-C controle}}{k_c}$$

sendo: $k_c = 0,41$ (22°C)

$k_c = 0,45$ (25°C)

Duas condições básicas devem ser observadas para se obter resultados satisfatórios por esse método. São elas:

- 1) A quantidade de CO_2 gerada pela decomposição dos microrganismos mortos na amostra fumigada tem que ser muito maior do que a da decomposição de microrganismos que morrem naturalmente na amostra controle durante os 10 dias de incubação.
- 2) A quantidade de CO_2 originada da mineralização da fração não-microbiana da matéria orgânica do solo deve ser igual na amostra fumigada e na amostra controle durante os 10 dias de incubação.

As principais restrições ao método derivam do fato de eventualmente não ser possível atender a essas condições. Certas características e/ou condições físicas do solo podem interferir no resultado, como por exemplo:

Umidade do solo. Em alguns casos a amostra controle pode conter um número de microrganismos mortos semelhante ao da amostra fumi-

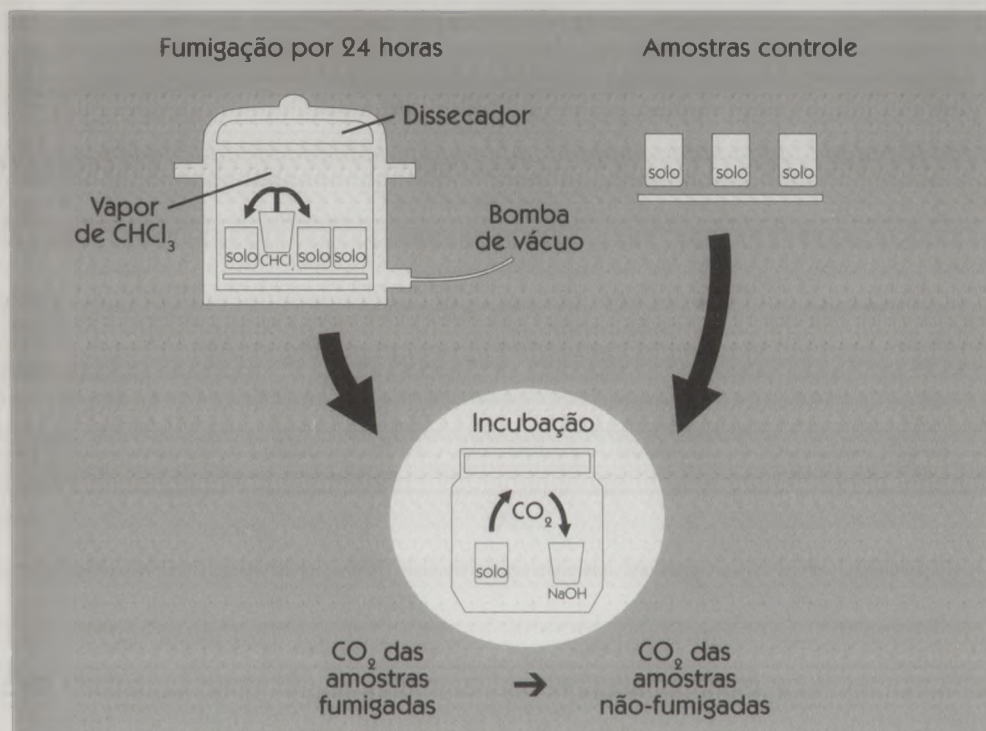


FIGURA 1. Procedimento experimental para a estimativa da biomassa microbiana-C pelo método da fumigação-incubação.

gada, como é o caso de solos muito secos. Nesse caso, uma pré-incubação de 7 dias com o solo a 50% da c.c. é recomendável (Sparling, 1990). O método também não é apropriado para solos muito úmidos, que se compactam durante os processos de peneiragem e pesagem, impedindo uma difusão uniforme do agente fumigante (Ross, 1987), devendo, então, ser seco ao ar (Ross, 1988).

pH do solo. Solos de pH considerados muito ácidos (< 4,5) não permitem o desenvolvimento da maior parte da população bacteriana nas amostras fumigadas, o que reduz a taxa de mineralização dos microrganismos mortos, interferindo na 1ª condição. Em alguns locais, entretanto, a biomassa dos solos ácidos é bem adaptada ao meio ácido, tornando o grau de inibição bastante variável.

Temperatura. A temperatura do ambiente em que a metodologia é aplicada interfere na intensidade da taxa de mineralização tanto do material microbiano como do não-microbiano, durante o período de incubação.

Entretanto, a maior dificuldade inerente ao método da FI é fazer a compensação adequada para a decomposição de matéria orgânica não-microbiana (2ª condição). Práticas agrícolas em que o solo recebe a incorporação de raízes e outros tecidos vegetais ou fertilizantes orgânicos geram as maiores polêmicas. Conforme seu teor de compostos facilmente degradáveis, podem resultar valores muito baixos ou mesmo negativos para a biomassa microbiana. Martens (1985) demonstrou que, durante pelo menos duas semanas, as amostras controle tinham maior capacidade de degradar a matéria orgânica do solo do que as amostras fumigadas. Esse efeito pode ser evitado com uma remoção manual cuidadosa do material (por exemplo, raízes). Outros autores tentaram resolver o problema usando diferentes períodos de incubação como controles (Chaussod & Nicolardot, 1982; Ross *et al.*, 1980) ou mesmo sem a subtração de um controle não-fumigado (Voroney & Paul, 1984).

O método da FI assume ainda que o fator k_c , que representa a proporção do carbono da biomassa microbiana morta convertido em CO_2 durante o período de incubação, é o mesmo para todos os solos. No entanto, sabe-se que, assim como a composição da população microbiana, também os fatores que interferem nas duas condições básicas alteram seu valor. Valores de 0,41 (Anderson & Domsch, 1978) e 0,45 (Oades & Jenkinson, 1979) são freqüentemente citados para incubações a respectivamente 22°C e 25°C. Problemas relativos à variação do k_c podem ser evitados, expressando-se apenas os valores do fluxo de C-CO_2 em $\mu\text{g.g}^{-1}\text{solo.périodo de incubação}^{-1}$.

Grande parte dos solos da região amazônica, a exemplo dos oxissolos, apresenta baixo pH e alto teor de argila, além de estar bastante úmida durante a maior parte do ano. Tais características, principalmente quando associadas à presença de muitas raízes finas, dificultam a determinação da biomassa microbiana pelo método FI por interferirem tanto na 1ª como na 2ª condição básica. Embora alguns autores tenham relatado sucesso no uso do método FI em solos ácidos sob floresta (Diaz-Raviña *et al.*, 1993, 1988), diferentes estudos, mesmo quando feitos no mesmo tipo de solo (Geraldés *et al.*, 1995; Pfenning *et al.*, 1992; Luizão *et al.*, 1992; Bonde *et al.*, 1991), apresentam resultados bastante variados, uma vez que cada autor adota um tipo de controle e um fator k_c para o cálculo da biomassa microbiana.

O método da FI teve resultados positivos em todos os solos analisados por Feigl *et al.* (1995), embora os oxissolos estivessem na faixa de

pH (< 4,5) em que se esperava uma subestimativa pelo procedimento padrão (Vance *et al.*, 1987a). A Tabela 3 mostra os resultados do cálculo do fluxo de CO₂-C feito por diferentes vias: A) CO₂-C evoluído das amostras de solo fumigadas durante os 0-10 dias pós-fumigação menos CO₂-C evoluído dos controles durante o mesmo período (Jenkinson, 1988); B) CO₂-C evoluído das amostras de solo fumigadas durante os 0-10 dias pós-fumigação menos CO₂-C evoluído das mesmas amostras durante os 10-20 dias pós-fumigação (Ross, 1990a); C) CO₂-C evoluído das amostras de solo fumigadas durante os 0-10 dias pós-fumigação sem subtração de controle (Vance *et al.*, 1987b; Voroney & Paul, 1984).

O cálculo do fluxo de C-CO₂ usando (A) um solo não-fumigado (NF₀₋₁₀) ou (B) um solo fumigado (F₁₀₋₂₀) como "controle" resultou em valores estatisticamente semelhantes, distintos de (C). A validação desses resultados foi feita pela comparação com os valores obtidos pelo método da fumigação-extração (FE) apresentado a seguir.

TABELA 3. CO₂-C respirado (μg C.g⁻¹ solo) pelas amostras de solo fumigadas (F) e não fumigadas (NF) após incubação durante os períodos de 0-10 e 10-20 dias e três formas de calcular o fluxo.

SOLOS	CO ₂ -C RESPIRADO			FLUXO	
	(C)			(A)	(B)
	F ₀₋₁₀	F ₁₀₋₂₀	NF ₀₋₁₀	(F ₀₋₁₀ - NF ₀₋₁₀)	(F ₀₋₁₀ - F ₁₀₋₂₀)
Oxissol	411±29	170±07	143±23	268±37	241±30
Oxissol	453±23	170±31	140±13	313±26	283±39
Ultissol	413±63	194±35	178±59	235±86	219±72
Ultissol	275±51	113±11	147±52	128±73	162±52
Alfissol	361±67	194±47	158±36	203±76	167±82

O Método da Fumigação-Extração (FE)

Este método também se baseia na aparente ação seletiva do fumigante (clorofórmio) sobre a biomassa microbiana do solo, com pouco efeito sobre os componentes não vivos. Entretanto, diferentemente da incubação, o fluxo de carbono proveniente da população microbiana morta

é determinado por extração química. Amostras fumigadas e não-fumigadas de 10 g de solo a 60% da c.c. são submetidas à extração em 25 ml de K_2SO_4 0,5 M em agitação rotativa por 30 minutos a 50 rpm. Uma alíquota do extrato recebe, então, $K_2Cr_2O_7$ (0,15 M) na presença de H_2SO_4 concentrado, para oxidar o carbono. O excesso de dicromato é retrotitulado contra $Fe(NH_4)(SO_4)_3$, revelando a quantidade de dicromato utilizado na oxidação e, assim, a quantidade de carbono extraída. Detalhes podem ser encontrados em Vance *et al.* (1987b).

A maior vantagem do método é o resultado não depender do bom desenvolvimento da etapa da mineralização microbiana (incubação), o que evita os problemas a ela associados, tais como a escolha do controle apropriado para calcular o fluxo (Sparling & West, 1988; Vance *et al.*, 1987c; Brookes *et al.*, 1985). O método da FE pode, portanto, ser aplicado a uma grande variedade de solos, inclusive àqueles com baixo pH, alto teor de matéria orgânica fresca ou baixo teor de umidade.

A Tabela 4 mostra os resultados obtidos por Feigl *et al.* (1995) para o fluxo de carbono dos solos da Amazônia pelo método da FE.

TABELA 4. Quantidades de C ($mg\ g^{-1}\ solo$) extraído obtidas pelo método da fumação-extração (FE) para as amostras de solo fumigadas (F) e não fumigadas (NF), seus respectivos fluxos de C.

SOLOS	C EXTRAÍDO ($mg\ g^{-1}\ solo$)		FLUXO
	F	NF	
Dxissol	841	607	234
Dxissol	686	395	291
Ultissol	232	110	122
Ultissol	165	64	101
Alfissol	226	76	150

O método também requer uma estimativa independente do C microbiano do solo para avaliação da eficiência da extração do carbono. Índices de eficiência (fator k_{FC}) foram calculados por diversos autores (Ross, 1990b; Sparling & West, 1988; Vance *et al.*, 1987c), com base em regressões entre o carbono extraído e a biomassa microbiana, estimada por outros métodos (FI, SIR, contagem em microscópio, marcação com ^{14}C e outros). Em sua grande maioria, os valores variam entre 0,30 e 0,35, embora

uma ampla gama tenha sido observada (Sparling & Ross, 1993). Ross (1990a) recomenda uma calibração preliminar do valor do fluxo de C extraível para a conversão do conteúdo de C em biomassa microbiana, quando se deseja precisão no estudo de determinado solo.

O trabalho de Feigl *et al.* (1995) procurou estabelecer um fator k_{EC} apropriado aos solos da Amazônia, uma vez que nenhuma das revisões sobre o assunto inclui amostras dessa região. Comparações com os resultados obtidos pelo método da FI não eram possíveis por estarem eles também dependentes de uma calibração. Os autores usaram, então, uma maneira alternativa de calcular o fator k_{EC} , que faz uso da marcação com ^{14}C (Gregorich *et al.*, 1990; Sparling *et al.*, 1990; Sparling & West, 1988; Voroney & Paul, 1984) e teoricamente dá uma medida independente do fator k_{EC} .

A Marcação da Biomassa Microbiana com ^{14}C

Seis repetições de 10 g (equivalente a peso seco) de cada solo receberam a adição de 1 ml de solução de glicose (10 mg ml^{-1}) com uma atividade de 50 kBq ml^{-1} com a finalidade de marcar as células microbianas *in situ* nos solos (Sparling & West, 1988). As repetições foram incubadas por 48 horas a $25^\circ C$ dentro de jarros herméticos de 1,5 litro de capacidade, juntamente com um frasco contendo 10 ml de NaOH- Na_2CO_3 para fixar o CO_2 e 5 ml de água no fundo para manter a umidade (Sparling & West, 1988). Três repetições foram extraídas imediatamente com K_2SO_4 0,5 M e as outras fumigadas por uma noite com clorofórmio purificado antes da extração. A atividade do ^{14}C da solução de NaOH- Na_2CO_3 e extrato de K_2SO_4 0,5 M foi medida por cintilação líquida, adicionando-se 0,5 ml da solução de NaOH- Na_2CO_3 ou 0,5 ml de extrato de K_2SO_4 0,5 M a 10 ml de solução cintiladora composta de 4 g de PPO, 100 mg de POPOP, 666 ml de tolueno e 333 ml de TRITON X-100 por litro. A radioatividade foi medida após 48 horas de repouso a $5^\circ C$ para evitar a quimioluminescência, em contagem por 10 minutos num contador de cintilação líquida da BECKMAN LS-230, com uma eficiência de 90,5%. O ^{14}C microbiano foi calculado de acordo com Sparling *et al.* (1990), subtraindo a quantidade de $^{14}C\text{-CO}_2$ respirado e o ^{14}C extraído antes da fumigação do total adicionado. A diferença entre a quantidade de ^{14}C extraído antes e após a fumigação dá o fluxo de ^{14}C extraível. A relação entre fluxo de ^{14}C extraível e ^{14}C microbiano resulta no fator k_{EC} específico para cada solo (Tabela 5).

TABELA 5. Distribuição do ^{14}C ($\text{Bq}\cdot\text{g}^{-1}$ solo) na forma de glicose- ^{14}C após 48 horas de incubação a 25°C e fatores k_{EC} calculados.

SOLOS	ADICIONADO COMO GLICOSE- ^{14}C	RESPIRADO COMO $^{14}\text{CO}_2$	^{14}C MICROBIANO ³	FLUXO ^{14}C ⁴	FATOR k_{EC}^5
Oxissol	4638±21 ¹	1193±130 (26%) ²	2853±234 (61%)	755±238	0.26
Oxissol	5061±31	1391±89 (27%)	3601±94 (71%)	728±68	0.20
Ultissol	4216±11	2169±196 (51%)	1955±196 (46%)	591±35	0.30
Ultissol	5061±31	2646±203 (52%)	2351±206 (46%)	596±40	0.25
Alfissol	5061±31	2093±46 (41%)	2680±70 (53%)	809±110	0.30
Média geral k_{EC}					0.26±0.04

¹ Desvio padrão da média.

² % do total adicionado ao solo.

³ Calculado como a quantidade de ^{14}C adicionado, menos o respirado, menos o extraído antes da fumigação.

⁴ Diferença entre ^{14}C extraído após e antes da fumigação.

⁵ Fluxo de $^{14}\text{C}/^{14}\text{C}$ microbiano.

Avaliação dos Métodos FI e FE na Determinação da Biomassa Microbiana de Solos da Região Amazônica

No geral, os resultados obtidos pelo método da FI foram similares aos da FE, como se pode observar na Tabela 6. No método da FI, o fator k_{EC} de 0,45, apropriado para incubações a 25°C (Jenkinson & Ladd, 1981), foi usado para calcular o C microbiano a partir do fluxo de CO_2 -C. No método FE foi usado um fator k_{EC} "padrão" de 0,35 (Sparling *et al.*, 1990) e um k_{EC} "específico" de 0,26 obtido na marcação dos solos com ^{14}C .

A estimativa do C microbiano feita pelo método da FI deve ser analisada cautelosamente. O uso de um controle não-fumigado resultou em valores de C microbiano da mesma ordem de grandeza daqueles obtidos por Diaz-Raviña *et al.* (1988) por esse método em solos sob floresta em regiões temperadas. Cerri & Jenkinson (1981) também obtiveram produção de fluxo de CO_2 -C em um oxissol ácido de Manaus. Os resultados do cálculo do fluxo usando um controle fumigado também não diferiram significativamente. Entretanto, Ross (1990a), usando solos sob pastagem de pH próximo a 6,0, sempre obteve um fluxo de CO_2 -C maior, usando um controle fumigado, assim como

Sparling & Zhu (1993), que observaram comportamento semelhante em solos cultivados de pH < 5,0 da região oeste da Austrália. Como esperado, as estimativas do C microbiano foram maiores, quando não se levou em consideração a respiração das amostras controle, em concordância com os dados publicados, entre outros, por Hassink (1993), Sparling & Zhu (1993) e Srivastava & Singh (1988). Luizão *et al.* (1992) encontraram valores de C microbiano de 1.287 e 765 $\mu\text{g C-CO}_2\text{.g}^{-1}$ solo, respectivamente, para as camadas 0-5 e 5-20 cm superficiais de um oxissol sob floresta da Amazônia, aplicando o método da FI sem o uso de controle. Tais dados são bastante semelhantes à média obtida para a camada 0-10 cm dos oxissolos estudados (961 $\mu\text{g C-CO}_2\text{.g}^{-1}$ solo). Com base na estreita correlação entre o fluxo de C-CO₂ e o C microbiano, parece que o método da FI pode ser usado na estimativa da biomassa microbiana desses solos tropicais, desde que se use um controle apropriado. Para os oxissolos, com alto teor de argila e valores de pH < 4,5, o uso de um controle parece desnecessário quando se tomam os resultados obtidos pelo método da FE como referência, enquanto que para os ultissolos e o alfissolo deve-se descontar o valor da respiração basal, podendo-se usar como controle tanto um solo não-fumigado como um fumigado.

TABELA 6. Comparação da biomassa microbiana-C (mg C.g⁻¹ solo) estimada pelos métodos da FI usando três alternativas de cálculo e FE usando fator k_{EC} padrão e específico.

SOLOS	MÉTODO FI			MÉTODO FE	
	A	B	C	D	E
Oxissol	¹ bc 596 d ²	c 536 de	a 913 d	abc 659 de	ab 889 d
Oxissol	b 695 d	bc 635 d	a 1009 d	ab 823 d	a 1108 d
Ultissol	b 522 de	b 487 de	a 918 d	b 349 f	b 470 e
Ultissol	b 284 d	ab 302 e	a 611 e	b 290 f	ab 389 e
Alfissol	b 454 de	b 447 de	a 803 de	b 429 ef	ab 578 e

$$A = F_{0-10} - NF_{0-10}/0.45$$

$$B = F_{0-10} - F_{10-20}/0.45$$

$$C = F_{0-10}/0.45$$

D = Usando fator k_{EC} padrão = 0.35 (Sparling *et al.*, 1990)

E = Usando fator k_{EC} específico = 0.26, obtido por marcação com ¹⁴C

¹Médias na mesma linha, precedidas pela mesma letra, não diferem significativamente (P ≤ 0.05 n=6).

²Médias na mesma coluna, seguidas pela mesma letra, não diferem significativamente (P ≤ 0.05 n=6).

O uso de um fator padrão pode fornecer um valor aproximado que, no entanto, está sujeito a erro de 20% ou mais, sendo considerado muito impreciso para alguns tipos de pesquisa (Ross 1990b). A aplicação do fator k_{EC} específico de 0,26 determinado pela marcação com ^{14}C destes solos, resultou em valores 35% mais elevados que os obtidos com o fator padrão de 0,35 (Sparling *et al.*, 1990), ficando mais próximos àqueles obtidos pela via de cálculo FI escolhido. Fica evidente que se deve preferir o uso do fator específico para esses solos.

A biomassa microbiana C representou 3-4% do C orgânico total dos solos estudados. Esse nível é duas vezes maior que o indicado por uma revisão de Wardle (1992), sugerindo que a biomassa microbiana imobiliza proporção maior do C orgânico total em florestas tropicais do que em florestas (especialmente coníferas) de clima temperado. O autor, no entanto, reconhece a falta de dados sobre o assunto, indicando a necessidade de mais estudos para um amplo grupo de ecossistemas. Caso nossos dados venham a ser confirmados, ficará demonstrada a importância da biomassa microbiana como fonte potencial de nutrientes nos solos da Amazônia.

A marcação *in situ* da biomassa microbiana mostrou também que os oxissolos têm uma capacidade menor de metabolizar a glicose adicionada do que os ultissolos e o alfissolo. A maior taxa de decomposição do material marcado com ^{14}C , nos solos de textura mais leve, indica uma assimilação menos eficiente da glicose e/ou uma reciclagem mais rápida da biomassa microbiana C. Os oxissolos, no entanto, incorporaram mais ^{14}C da [^{14}C]-glicose no material microbiano, fato também observado por Amato & Ladd (1992) em solos com alto teor de argila. A razão desse comportamento tem sido atribuída aos diversos fatores discutidos por Wardle (1992), incluindo a capacidade de a argila diminuir o tempo de reciclagem de produtos orgânicos e, desse modo, aumentar a retenção de biomassa microbiana.

Bonde *et al.* (1991) estudaram o mesmo oxissol em Manaus pelo método da FI, sugerindo que a biomassa microbiana da camada superficial do solo consiste de uma fração pequena e ativa, e outra, grande e dormente. O alto teor de argila desse solo poderia ser responsável pela proteção de microrganismos em micro-sítios, onde eles ficariam dormentes após completar a degradação do substrato. De acordo com Hassink *et al.* (1993), maior proporção de microrganismos encontra proteção física em microporos contra predadores em solos argilosos do que em solos arenosos, contribuindo com seu estado menos ativo.

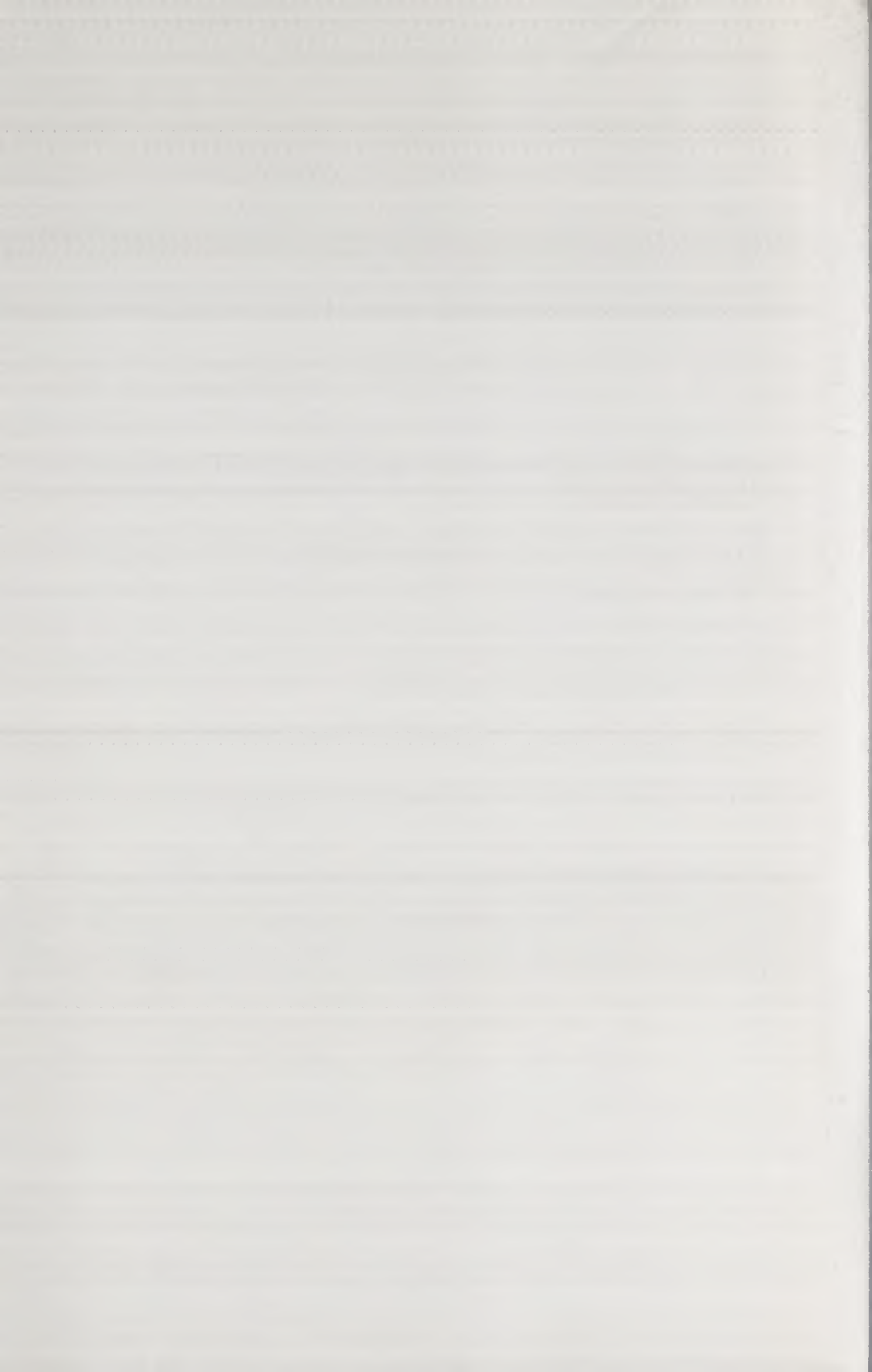
Pode-se concluir que os resultados gerais obtidos pelo método da FI foram satisfatórios para esses tipos de solo. Entretanto, o método da fumigação-extração é mais conveniente, mostrando-se útil na estimativa do C microbiano no mesmo extrato. Embora haja alguma diferença entre os fatores k_{EC} específicos encontrados para os solos, o uso de um fator comum permite uma estimativa aceitável da biomassa microbiana nesse e em outros solos tropicais semelhantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMATO, M.; LADD, J.N. Decomposition of ^{14}C -labelled glucose and legume material in soils: Properties influencing the accumulation of organic residue C and microbial biomass C. **Soil Biology & Biochemistry**. v.24, p.455-464, 1992.
- ANDERSON, J.P.E.; DOMSCH, K.H. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. **Soil Biology & Biochemistry**. v.10, p.215-221, 1978.
- BONDE, T.A.; ROSSWALL, T.; VICTORIA, R.L. The dynamics of soil organic matter and soil microbial biomass following clearfelling and cropping of a tropical rainforest soil in the Central Amazon. In: BONDE, T.A. **Size and dynamics of active soil organic matter fraction as influenced by soil management**. Linköping: Linköping University, 1991. cap.7, p.1-19.
- BROOKES, P.C.; KRAGT, J.F.; POWLSON, D.S.; JENKINSON, D.S. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: The effects of fumigation time and temperature. **Soil Biology & Biochemistry**. v.17, p.831-835, 1985.
- BROWN, I.F.; MARTINELLI, L.A.; THOMAS, W.W.; MOREIRA, M.Z.; FERREIRA, C.A.C.; VICTORIA, R.A. Uncertainty in the biomass of Amazonian forests: an example from Rondônia, Brazil. **Forest Ecology Management**. v.75, p.175-189, 1995.
- CERRI, C.C.; JENKINSON, D.S. Formation of microbial biomass during the decomposition of ^{14}C labelled ryegrass in soil. **Journal of Soil Science**. v.32, p.619-626, 1981.
- CERRI, C.C.; FELLER, C.; VICTORIA, R.; PLENECASSAGNE, A. Application du traçage isotopique naturel en ^{13}C à l'étude de la dynamique de la matière organique dans les sols. **Compte Rendus de l'Académie des Sciences de Paris**. T.300, Serie II, v.9, p.423-428, 1985.
- CERRI, C.C.; BERNOUX, M.; BLAIR, J. Carbon pools and fluxes in Brazilian natural and agricultural systems and the implications for the global CO_2 balance. In: WORLD CONGRESS OF SOIL SCIENCE, 15., Acapulco. **Transactions**. v.5A, p.399-406, 1994.
- CHAUSSOD, R.; NICOLARDO, T.B. Mesure de la biomasse microbienne dans les sols cultivés. I. Approche cinétique et estimation simplifiée du carbone facilement minéralisable. **Revue d'Ecologie et Biologie du Sol**. v.19, p.501-512, 1982.
- CHENG, W.; COLEMAN, D.C. A simple method for measuring CO_2 in a continuous air-flow system: Modifications to the substrate-induced respiration technique. **Soil Biology & Biochemistry**. v.21, p.385-388, 1989.
- DIAZ-RAVIÑA, T.; ACEA, M.T.; CARBALLAS, T. Microbial biomass and its contribution to nutrient concentrations in forest soils. **Soil Biology & Biochemistry**. v.25, p.25-31, 1993.
- DIAZ-RAVIÑA, T.; CARBALLAS, T.; ACEA, M.J. Microbial biomass and metabolic activity in four acid soils. **Soil Biology & Biochemistry**. v.20, p.817-823, 1988.
- DUXBURY, J.M.; SMITH, M.S.; DORAN, J.W. Organic matter as a source and sink of plant nutrients. In: COLEMAN, D.C.; OADES, J.M.; UEHARA, G., ed. **Dynamics of soil organic matter in tropical ecosystems**. Honolulu: University of Hawaii Press, 1989.
- FEARNSIDE, P.M. Brazil's Amazon forest and the global carbon problem. **Interciencia**. v.179-186, 1985.
- FEARNSIDE, P.M. Summary of progress in quantifying the potential contribution of Amazonian deforestation to the global carbon problem. In: ATHIÉ, D.; LOVEJOY, T.E.; OYENS, P.M., ed. **WORKSHOP ON BIOGEOCHEMISTRY OF TROPICAL RAIN FOREST, 1987**, Piracicaba. **Proceedings**. Piracicaba: CENA-USP, 1987. p.75-82.

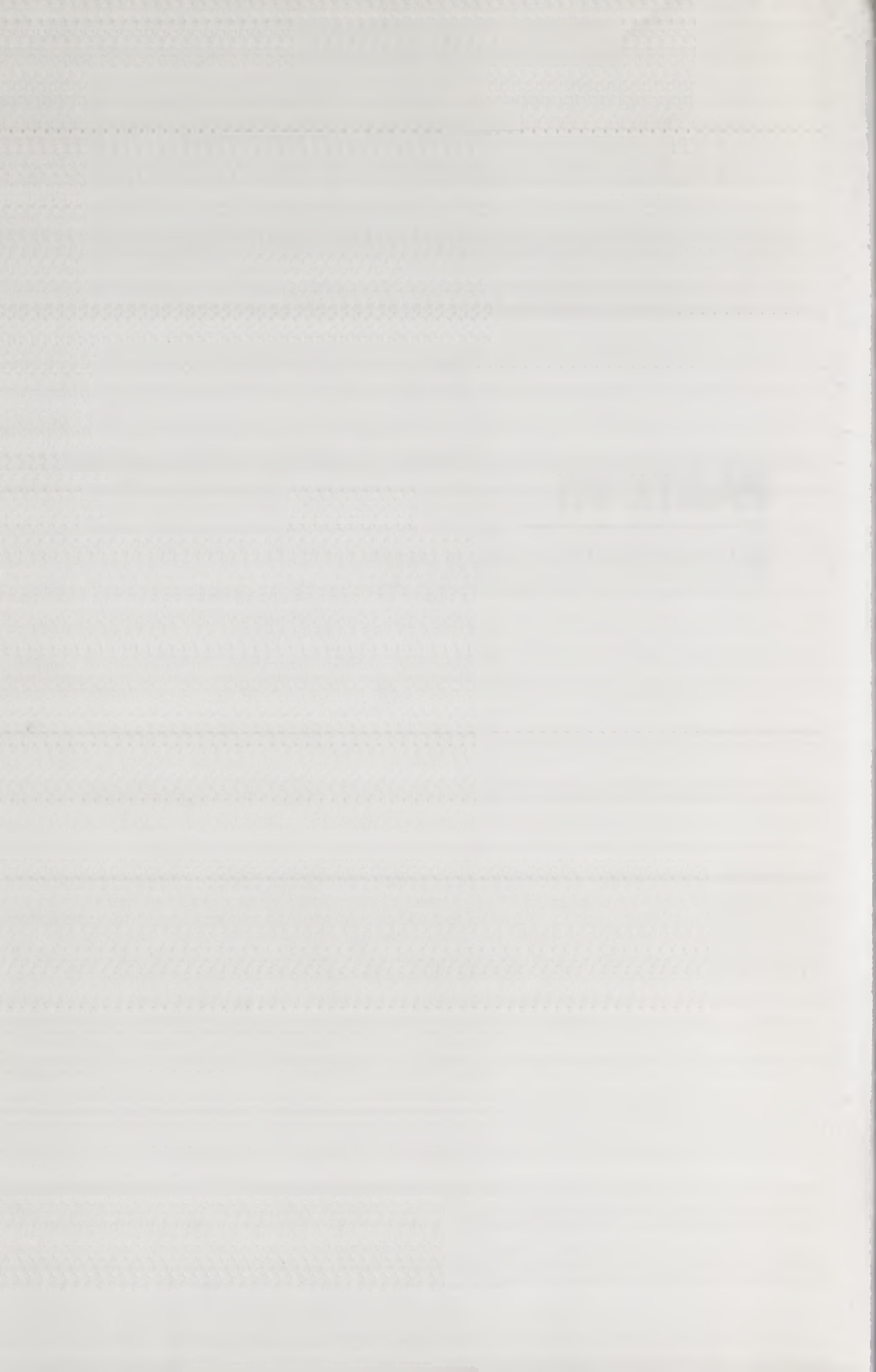
- FEARNSIDE, P.M. Forest biomass in Brazilian Amazônia: comments on the estimate by Brown and Lugo. **Interciencia**, v.17, p.19-27, 1992.
- FEARNSIDE, P.M. Deforestation in Brazilian Amazonia: the effect of population and land tenure. **Ambio**, v.22, p.537-545, 1993.
- FEARNSIDE, P.M. Amazonian deforestation and global warming: carbon stocks in vegetation replacing Brazil's Amazon forest. **Forest Ecology and Management**, v.80, p.21-34, 1995.
- FEIGL, B.J.; SPARLING, G.P.; ROSS, D.J.; CERRI, C.C. Soil microbial biomass in Amazonian soils: Evaluation of methods and estimates of pool sizes. **Soil Biology & Biochemistry**, v.27, p.1467-1472, 1995.
- GERALDES, A.P.A.; CERRI, C.C.; FEIGL, B.J. Biomassa microbiana de solo sob pastagens da Amazônia. **Revista brasileira de Ciências do Solo**, Campinas, v.19, p.55-60, 1995.
- GREGORICH, E.G.; WEN, G.; VORONEY, R.P.; KACHANOSKI, R.G. Calibration of a rapid direct chloroform extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology & Biochemistry**, v.22, p.1009-1011, 1990.
- HASSINK, J. Relationship between the amount and the activity of the microbial biomass in Dutch grassland soils: comparison of the fumigation-incubation method and the substrate-induced respiration method. **Soil Biology & Biochemistry**, v.25, p.533-538, 1993.
- JENKINSON, D.S. Studies on the decomposition of plant material in soil. II. **Journal of Soil Science**, v.17, p.280-302, 1966.
- JENKINSON, D.S. Determination of microbial biomass carbon and nitrogen in soil. In: WILSON, J.R., ed. **Advances in nitrogen cycling in agricultural ecosystems**, Wallingford: CAB International, 1988. p.368-386.
- JENKINSON, D.S.; LADD, J.N. Microbial biomass in soil: measurement and turnover. In: PAUL, E.A.; LADD, J.N., ed. **Soil Biochemistry** New York: Marcel Dekker, 1981. v.5.
- JENKINSON, D.S.; POWLSON, D.S. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil-V. A method for measuring soil biomass. **Soil Biology & Biochemistry**, v.8, p.209-213, 1976.
- LUIZÃO, R.C.C., BONDE, T.A.; ROSWALL, T. Sazonal variation of soil microbial biomass - The effects of clearfelling a tropical rainforest and establishment of pasture in the central Amazon. **Soil Biology & Biochemistry**, v.24, p.805-813, 1992.
- MARTENS, R. Limitations in the application of the fumigation technique for biomass estimations in amended soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v.17, p.57-63, 1985.
- MARTENS, R. Current methods for measuring microbial biomass C in soil: potentials and limitations. **Biology and Fertility of Soils**, v.19, p.87-99, 1995.
- MORAES, J.L. Conteúdos de carbono e nitrogênio e tipologia de horizontes nos solos da bacia amazônica. Piracicaba: CENA/USP, 1991. 84p. Tese Doutorado
- MORAES, J.L.; CERRI, C.C.; MELILLO, J.M.; KICKLIGHTER, D.; NEILL, C.; SKOLE, D.L.; STEUDLER, P. Soil carbon stocks of the Brazilian Amazon. **Soil Science Society of America Journal**, v.59, n.1, p.244-247, 1995.
- OADES, J.M.; JENKINSON, D.S. Adenosine triphosphate content of the soil microbial biomass. **Soil Biology & Biochemistry**, v.11, p.201-204, 1979.
- PARTON, W.J.; SANFORD, R.L.; SANCHEZ, P.A.; STEWART, J.W.B. Modeling soil organic matter dynamics in tropical soils. In: COLEMAN, D.C.; OADES, J.M.; UEHARA, G. ed. **Dynamics of soil organic matter in tropical ecosystems**. Honolulu: NIFTAL Project, 1989.
- PFENNING, L.; EDUARDO B.P.; CERRI, C.C. Os métodos da fumigação-incubação e fumigação-extração na estimativa da biomassa microbiana de solos da Amazônia. **Revista brasileira de Ciência do Solo**, v.16, p.31-37, 1992.
- POWLSON, D.S.; JENKINSON, D.S. A comparison of the organic matter, biomass, adenosine triphosphate and mineralizable nitrogen contents of ploughed and direct-drilled soils. **Journal of Agricultural Science**, v.97, p.713-721, 1981.
- ROSS, D.J.; TATE, K.R.; CAIRNS, A.; PANSIER, E.A. Microbial biomass estimations in soils from tussock grasslands by three biochemical procedures. **Soil Biology & Biochemistry**, v.12, p.375-383, 1980.
- ROSS, D.J. Soil microbial biomass estimated by the fumigation-incubation procedure: Seasonal fluctuations and influence of soil moisture content. **Soil Biology & Biochemistry**, v.19, p.397-404, 1987.
- ROSS, D.J. Modifications to the fumigation procedure to measure microbial biomass C in wet soils under pasture: Influence on estimates of seasonal fluctuations in the soil biomass. **Soil Biology & Biochemistry**, v.20, p.377-383, 1988.

- ROSS, D.J. Measurements of microbial biomass C and N in grassland soils by fumigation-incubation procedures: Influence of inoculum size and the control. **Soil Biology & Biochemistry**, v.22, p.289-294, 1990a.
- ROSS, D.J. Estimation of soil microbial C by a fumigation-extraction method: influence of seasons, soils and calibration with the fumigation procedure. **Soil Biology & Biochemistry**, v.22, p.295-300, 1990b.
- SALATI, E.; VOSE, P.B. Amazon Basin: A system in equilibrium. **Science**, v.225, n.4658, p.129-138, 1984.
- SERRÃO, E.A. Alternative models for sustainable cattle ranching on already deforested lands in the Amazon. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, p.97-104, 1992.
- SPARLING, G.P. Soil biomass evaluation. In: PACIFIC WORKSHOP ON THE ESTABLISHMENT OF SOIL MANAGEMENT EXPERIMENTS ON SLOPING LANDS, 1990, Bangkok. **Technical Notes** 4. Bangkok: IBSRAM, 1990. p.163-184.
- SPARLING, G.P.; WEST, A.W. A direct extraction method to estimate soil microbial C: Calibration *in situ* using microbial respiration and ^{14}C labelled cells. **Soil Biology & Biochemistry**, v.20, p.337-343, 1988.
- SPARLING, G.P.; FELTHAM, C.W.; RYNOLDS, J.; WEST, A.W.; SINGLETON, P. Estimation of soil microbial C by a fumigation-extraction method: Use on soils of high organic matter content, and a reassessment of the k_{ex} -factor. **Soil Biology & Biochemistry**, v.22, p.301-307, 1990.
- SPARLING, G.P.; ROSS, D.J. Biochemical methods to estimate soil microbial biomass: Current developments and applications. In: MULONGOY, K.; MERCKX, R., eds. **Soil organic matter dynamics and sustainability of tropical agriculture**. Leuven: Wiley-Sayce, 1993.
- SPARLING, G.P.; ZHU, C. Evaluation and calibration of biochemical methods to measure microbial biomass C and N in soils from Western Australia. **Soil Biology & Biochemistry**, v.35, p.1793-1801, 1993.
- SRIVASTAVA, S.C.; SINGH, J.S. Carbon and phosphorous in the soil biomass of some tropical soils of India. **Soil Biology & Biochemistry**, v.20, p.743-747, 1988.
- TEIXEIRA, L.B. Dinâmica de ecossistema de pastagem cultivada em área de floresta na Amazônia Central. Manaus: Universidade do Amazonas, 1987. 100p. Tese de Doutorado.
- UHL, C.; BUSCHBACHER, R.; SERRÃO, E.A.S. Abandoned pastures in eastern Amazonia. I. Patterns of plant succession. **Journal of Ecology**, v.76, p.663-681, 1988.
- VANCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. Microbial biomass measurements in forest soils: Determination of k_c values and tests of hypotheses to explain the failure of the chloroform fumigation-incubation method in acid soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v.19, p.689-696, 1987a.
- VANCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. Microbial biomass measurements in forest soils: The use of the chloroform fumigation-incubation method in strongly acid soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v.19, p.697-702, 1987b.
- VANCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology & Biochemistry**, v.19, p.703-707, 1987c.
- VORONEY, R.P.; PAUL, E.A. Determination of k_c and k_n *in situ* for calibration of the chloroform fumigation-incubation method. **Soil Biology & Biochemistry**, v.16, p.9-14, 1984.
- WARDLE, D.A. A comparative assessment of factors which influence microbial biomass carbon and nitrogen levels in soil. **Biological Reviews**, v.67, p.321-355, 1992.



PARTE VII

BIODIVERSIDADE



18

BIODIVERSIDADE MICROBIANA E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

João Lúcio Azevedo

Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Goiás, UFGO, Campus Samambaia
CEP 74001-970, Goiânia, GO

INTRODUÇÃO

A biodiversidade consiste na variação dos seres vivos, sejam eles plantas, animais ou microrganismos, provenham de ambientes terrestres, marinhos ou de outros ambientes. É, portanto, o conteúdo da variação biológica que ocorre no mundo. O termo foi usado pela primeira vez em 1986, resultado da contração das palavras “diversidade biológica” ou “diversidade biótica”, e mede, em princípio, toda a variação biológica do planeta Terra. Em outras palavras, biodiversidade é uma medida da variação ou variabilidade existente entre as espécies de seres vivos e dentro delas. Essa variabilidade tem como fonte principal as mutações, que constituem modificações na molécula que carrega as informações hereditárias e são transmitidas de ascendentes para descendentes. Dessa forma, modificações que ocorrem no ácido desoxirribonucléico — o DNA que constitui, na grande maioria dos casos, o material genético — são transmitidas através de gerações e desencadeiam o processo de variabilidade entre os seres vivos. Juntamente com a mutação, outra maneira pela qual os seres vivos ampliam a variação já existente é a recombinação.

Atualmente sabe-se que a recombinação tanto pelo processo de permutação ou "crossing-over", ou seja, troca de partes entre cromossomos homólogos, como também através de elementos transponíveis, os transposons, não acontece apenas entre indivíduos de uma mesma espécie, mas também entre espécies distintas. As publicações de Azevedo (1985, 1986), Costa (1987) e Azevedo (1996) dão mais detalhes sobre os processos de mutação, recombinação clássica e por transposons em microrganismos.

Além de processos naturais como mutação e recombinação, a variação existente entre os seres vivos pode ser aumentada, inclusive de maneira dirigida, por meio de processos artificiais em laboratório e pelo emprego das tecnologias do DNA recombinante, fusão de protoplastos e mutações "sítio dirigidas", ou seja, através de técnicas de engenharia genética. A revisão de Astolfi Filho *et al.* (1985) fornece maiores informações a respeito.

Mutação e recombinação e a existência de ambientes, que também são variados e variáveis no tempo e no espaço, fazem com que os seres vivos sejam selecionados de diferentes maneiras. Os mais aptos a determinados ambientes sobrepõem outros menos aptos. Dessa maneira surgem raças, linhagens em variedades dentro de espécies, de espécies dentro de gêneros e assim por diante. Dessa forma, o processo evolutivo nos seres vivos está ocorrendo continuamente.

Mais recentemente, entretanto, a constatação da alta biodiversidade existente e os perigos de sua redução, em decorrência de vários fatores, especialmente as atividades da espécie humana alterando de diferentes maneiras o ambiente, têm sido objeto de preocupação. Essa preocupação tem resultado na realização de reuniões e discussões sobre o assunto. Sabe-se que a manutenção da biodiversidade é considerada, nos dias de hoje, extremamente importante, e essa preocupação não envolve apenas a área de ciências biológicas mas também a economia, a religião e a ética, entre outras. São cada vez mais reconhecidos os perigos da diminuição da biodiversidade: desequilíbrios de conseqüências imprevisíveis e a extinção de espécies de seres vivos cujas propriedades e características poderiam ser de interesse não apenas para a manutenção desse equilíbrio, mas para o próprio bem-estar da humanidade. Entretanto, esse enfoque é geralmente apresentado ao grande público como se a manutenção da diversidade biológica consistisse apenas na preservação de espécies de animais e plantas superiores em extinção. Em nosso país,

o enfoque está atualmente baseado, por exemplo, na preservação do mico-leão-dourado ou da ararinha azul, animais ameaçados de extinção. Embora a luta dos ecologistas para preservar essas espécies seja necessária e até mesmo louvável, seus defensores, em geral provenientes da comunidade leiga ou zoólogos, esquecem-se que muitas espécies de seres vivos, reconhecidamente mais importantes do ponto de vista da preservação do ambiente e das outras espécies, estão sendo dizimadas sem que medidas coibidoras do extermínio sejam tomadas. Cada vez que se constrói uma represa, que se incendeia uma floresta ou que se lançam produtos químicos tóxicos no solo ou na água, além de animais e plantas superiores, microrganismos são enormemente afetados e muitos deles não têm mecanismos de locomoção tão ágeis como os encontrados em aves ou mamíferos, que lhes permitam escapar do extermínio. Entretanto, quando são tomadas medidas para salvar especialmente animais das grandes inundações, por exemplo, que ocorrem com a construção de represas, faltam os mesmos cuidados para salvar também milhares de espécies de microrganismos.

Por serem eles microscópicos e, portanto, invisíveis aos olhos do grande público e da mídia, não se leva em consideração que, se uma espécie de mamífero ou ave é extinta, os danos são bem menos importantes para o equilíbrio biológico em comparação com a perda de muitas espécies de microrganismos. Não se pode esquecer que o surgimento das plantas na Terra e, portanto, também dos animais, não seria possível sem a existência de microrganismos como bactérias e fungos (Hawksworth, 1991, 1992). Entretanto, como já foi mencionado, os programas de manutenção da diversidade biótica em andamento no mundo concentram-se muito mais em plantas e animais superiores do que em microrganismos.

Sabe-se atualmente que os microrganismos como bactérias e fungos, além de responsáveis por importantes transformações metabólicas, pelo controle biológico de doenças e pragas, pela fixação biológica do nitrogênio atmosférico, pela degradação de resíduos vegetais e outros produtos, inclusive tóxicos, são também um manancial de fármacos, corantes, enzimas e ácidos orgânicos, entre muitos outros produtos úteis e ainda inexplorados. Ou seja, além de exercerem um papel na sobrevivência de outras espécies e na manutenção do equilíbrio entre elas, são fonte de produtos que contribuem para o bem-estar da população humana, inclusive remediando o mal que a própria espécie humana

produz no ambiente. Em outras palavras, a importância dos microrganismos para a ecologia e biotecnologia é inquestionável.

No presente capítulo, a diversidade dos microrganismos será primeiramente comparada com a de outros seres vivos. Em seguida, serão vistos o potencial que têm para a biotecnologia, a forma como essa diversidade pode ser usada, preservada e as iniciativas que devem ser tomadas a respeito do assunto, especialmente no Brasil.

DIVERSIDADE NOS SERES VIVOS EM GERAL E NOS MICRORGANISMOS EM PARTICULAR

A Tabela 1 extraída das revisões de Bull *et al.* (1992) e também de Hawksworth (1991) com modificações, dá uma idéia do número conhecido de espécies de seres vivos em nosso planeta, além de fornecer uma estimativa do que ainda está por ser descoberto.

As estimativas apresentadas na Tabela 1 baseiam-se em diferentes fatores (Hawksworth, 1991) e estão sujeitas a revisões. Em geral, os dados são conservadores e subestimados. O número de 1,5 milhão de espécies atualmente descritas deve subir para cerca de 13 milhões.

Só no reino dos fungos devem existir mais espécies do que todas as espécies animais, vegetais e microbianas conhecidas atualmente. Os dados que estimam o número total de espécies de fungos existentes estão principalmente baseados no número de novas espécies que são descritas por ano, em comparação com o número de espécies de plantas vasculares existentes e as descritas, também anualmente. Como salienta Hawksworth (1991), as pesquisas com fungos estão mais restritas aos países de clima temperado, pois muito menos tem sido estudado a respeito em regiões tropicais. Com exceção de esforços esporádicos como o ocorrido na Universidade Federal de Pernambuco, em Recife, durante a existência do Instituto de Micologia, quando Chaves Batista isolou e classificou 3.500 espécies novas da região, e de dados da América Central, o potencial de fungos existentes nos trópicos é ainda uma incógnita. Entretanto, é de se supor que esse potencial seja maior do que o encontrado em outras regiões, considerando que as temperaturas e as condições de umidade nos trópicos são favoráveis ao desenvolvimento de fungos. É possível, assim, que a estimativa de cerca de 1,5 milhão de espécies de fungos existentes no mundo seja conservadora,

TABELA 1. Número de espécies de seres vivos atualmente conhecidas e estimativa de espécies existentes no mundo.

SERES VIVOS	ESPÉCIES CONHECIDAS	NÚMERO ESTIMADO DE ESPÉCIES	PORCENTAGEM DE ESPÉCIES JÁ CONHECIDAS
Bactérias	4.700	40.000	11,9
Fungos	69.000	1.500.000	4,6
Algas	40.000	60.000	66,7
Plantas	267.750	295.000	90,8
Protozoários	30.800	100.000	30,8
Porífera, cnídios e nematóides	29.000	515.000	5,6
Crustáceos, insetos e outros invertebrados	970.000	6 a 10.000.000	9,7 a 16
Outros animais	98.000	100.000	98
Vírus	5.000	130.000	3,8
TOTAL	1.414.250	8.720.000 a 12.740.000	

Obs.: Os dados correspondem à soma de certos grupos de espécies. Quando não se faz idéia de quantas outras espécies podem ainda ser descritas em determinado grupo, mantém-se a tendência conservadora de não acrescentar novas espécies.

podendo esse número chegar até a 2,4 milhões de espécies, o que é um valor maior que a soma de todos os outros seres vivos, excetuados os insetos. Apenas como exemplo, cite-se que só no período entre 1980 a 1991 foram descritas 123 novas espécies de um dos gêneros mais conhecidos e estudados de fungos, o gênero *Penicillium*, que se somaram às suas 150 espécies já conhecidas. Se for considerado ainda que pouco se explorou na área de fungos que crescem sobre outros fungos, em algas, em insetos, além dos endófitos, isto é, aqueles que vivem no interior de plantas sem aparentemente serem patógenos a elas (ver capítulo sobre microrganismos endofíticos, nesta mesma publicação), pode-se chegar com relativa facilidade ao assombroso número de mais de 2 milhões de espécies de fungos existentes e que serão descritas no futuro. De fato, se cerca de 1.700 novas espécies no Reino *Fungi* têm sido descritas anualmente e com a estimativa conservadora de 1,5 milhão de

espécies de fungos existentes, vão ser necessários mais de 800 anos para que todas se tornem conhecidas. Esses valores indicam a necessidade de um substancial esforço para aumentar pelo menos de 10 a 100 vezes a velocidade de descrição de novas espécies de fungos. Isso reduziria o tempo gasto para a descrição de todas as espécies do reino, que estaria, então, entre 10 e 100 anos.

Com relação a outros microrganismos, a situação é um pouco melhor. Entre as bactérias, o número estimado de novas espécies é bem menor e já se conhecem cerca de 11% delas. O problema é sério com os vírus, supondo-se que apenas cerca de 4% deles sejam conhecidos. Nematóides microscópicos podem ter uma situação bastante precária, tanto quanto a encontrada entre os vírus. Em situação melhor estão as algas microscópicas e protozoários, com um bom número de espécies já conhecidas e classificadas (Tabela 1). De uma maneira geral, entretanto, verifica-se que a situação dos microrganismos é de grande inferioridade, se comparada com a situação atualmente encontrada entre animais e plantas superiores. Isso era de se esperar, devido à dificuldade do próprio conceito de espécie em certos grupos microbianos, além das dificuldades inerentes ao tamanho dos microrganismos (Miller, 1995). Felizmente, os microrganismos estão sendo cada vez mais valorizados, em virtude de seu papel na manutenção do equilíbrio biológico e por seu uso cada vez mais significativo em processos biotecnológicos.

A BUSCA DA DIVERSIDADE MICROBIANA

Atualmente, 30% do solo existente em nosso planeta é constituído por terra agriculturável. É um ecossistema que não pode ser desprezado do ponto de vista biológico. É ele que sustenta a população humana e não há, no momento, condições de reverter esse quadro. Muito pelo contrário, se a explosão populacional humana continuar, e se novas tecnologias não forem implementadas para aumentar a produtividade, a porcentagem de solo agriculturável deve crescer. Assim, há necessidade de conservar a biodiversidade existente, especialmente a vida microbiana (Kennedy & Smith, 1995). Até pouco tempo, a qualidade do solo agriculturável era considerada apenas em relação aos seus atributos físicos e químicos. Os microrganismos eram estudados de forma quantitativa, importando somente sua população total. A partir dos anos 80, a situa-

ção alterou-se. Verificou-se que os microrganismos são importantes no controle biológico de doenças e pragas da agricultura, por exemplo, além de fixarem nitrogênio atmosférico, funcionarem como micorrizas, ajudando as plantas a sobreviver em condições de estresse, e protegendo-as contra patógenos, realizando transformações metabólicas, produzindo toxinas e muitos outros produtos. Atualmente, a medida da população microbiana é uma medida da degradação do solo (Keneddy & Smith, 1995). Em muitos casos, constata-se que um solo agriculturável contém igual ou maior biodiversidade que um solo não-cultivado.

O solo é, portanto, um rico manancial de diversidade microbiana. Além dele próprio, as plantas em si contém microrganismos, muitos deles de espécies ainda não descritas. São os microrganismos endofíticos dos quais existe uma dezena ou mais em cada espécie vegetal. Microrganismos podem ser ainda encontrados em insetos. Como existem milhões de espécies de insetos e cada uma delas possui microrganismos característicos, pode-se imaginar a riqueza de espécies microbianas que ainda está por ser descoberta. Enfim, são muitos os habitats onde microrganismos podem ser procurados. Isso vai resultar na descrição de numerosas novas espécies, e principalmente na descoberta de novos produtos de valor biotecnológico.

Também há uma melhoria no uso de novas armas para classificação de microrganismos e outros seres vivos, e principalmente dos primeiros, devido às dificuldades de aplicar-se o conceito de espécies aos mesmos. Essas técnicas incluem desde a eletroforese para isozimas, hibridizações DNA-DNA, técnicas de análise direta do DNA conhecidas por siglas como RFLP, PCR, RAPD, além do uso de eletroforese em campo pulsado para separar e determinar tamanho e número de cromossomos de microrganismos. A potencialidade dessas técnicas, não só como auxiliares na taxonomia microbiana como também na detecção de novos microrganismos e para estudos da diversidade microbiana, pode ser encontrada nesta mesma publicação (capítulo sobre aplicações da PCR em biologia molecular). Revisões sobre a metodologia utilizada em cada uma dessas técnicas podem ser encontradas em Fungaro (1995), Paccola-Meirelles *et al.* (1988) e Pizzirani-Kleiner & Azevedo (1989). Do ponto de vista taxonômico, o uso de sondas de RNA ribossômico e o seqüenciamento dessas moléculas levou a notáveis avanços na classificação de espécies, como salientam Bull *et al.* (1992).

Por exemplo, estudos realizados em microrganismos termofílicos nos Estados Unidos, usando seqüências de cDNA obtidas a partir de RNA ribossômico 16S usado como iniciador ou *primer*, complementar à região conservada do rRNA, indicaram a possibilidade de descoberta até de novos *Phyla*, o que demonstra o pouco conhecimento da biodiversidade existente, mesmo em locais bem estudados como as fontes termais (Ward *et al.*, 1990, 1992). Análises por meio de técnicas usando RNA ribossômico revelaram também novas facetas na taxonomia de microrganismos encontrados no rúmen (Stahl *et al.*, 1988). Outros tipos de análise, como RFLP em *Chlamydia psittaci* revelam que, dentro da espécie, a análise de 23 isolados provenientes de aves e mamíferos mostraram grande diversidade genética, o que resultou na sua separação em 4 grupos com menos de 30% de homologia em seus DNAs (Fukushi & Hirai, 1989). Uma alta diversidade também tem sido encontrada dentro de espécies de microrganismos endofíticos, como foi recentemente demonstrado em nosso laboratório com isolados de *Colleotrichum musae* e *Guignardia citricarpa* (Glienke, 1995; Longo, 1996), ou com isolados do gênero *Penicillium* provenientes de milho (Ribeiro, 1995).

Evidentemente, a aplicação de apenas uma dessas modernas técnicas para estabelecer a quantidade de diversidade microbiana dentro de um gênero ou espécie não é suficiente para a descrição de novas espécies. Entretanto, associadas a outras técnicas, no conjunto, elas são um poderoso auxiliar para a medida de diversidade existente não só em microrganismos como em outros seres vivos (Miller, 1995).

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA DIVERSIDADE MICROBIANA

Como Olembo (1995) salienta muito bem, a relação entre biodiversidade e biotecnologia é de dependência mútua. Biodiversidade é a base genética da qual a biotecnologia se vale para desenvolver processos e produtos de interesse econômico e/ou social. Por outro lado, a biotecnologia tem muito a oferecer, não só através de técnicas que auxiliem a manutenção da própria biodiversidade, como para aumentá-la ainda mais por meio de poderosos processos como os da engenharia genética.

São numerosos os processos biotecnológicos que utilizam microrganismos, seja para obtenção de produtos de valor comercial, seja para, através do próprio processo, chegar-se a um resultado de interesse, como despoluição de um ambiente por biorremediação ambiental. Pensando apenas nos fungos, estes são usados na produção de aminoácidos, antibióticos e outros fármacos; bebidas como cervejas, vinhos e destilados; na panificação; no controle biológico de pragas, doenças e plantas daninhas; na fabricação de queijos; diversas enzimas; alimentos fermentados; flavorizantes; corantes; na geração de produtos de interesse energético, como o etanol; na produção de ácidos orgânicos, como o ácido cítrico, vitaminas e muitos outros produtos. Seria extremamente difícil, hoje, fazer um levantamento de todos os produtos derivados de microrganismos. Para cada um deles, o processo empregado e outros detalhes constituiriam capítulos à parte, devido à amplitude dos dados atualmente disponíveis, que aumentam de forma rápida e constante. Apenas como exemplo, a Tabela 2 dá uma relação de enzimas de aplicação industrial e de uso clínico, produzidas por microrganismos, e a Tabela 3 apresenta exemplos de aplicação da tecnologia de biorremediação. Nessas duas áreas exemplificadas, a tendência é de que, cada vez mais, sejam encontrados microrganismos na natureza que preenchem as finalidades desejadas. Evidentemente, haverá também a possibilidade de um melhoramento genético posterior nos microrganismos dados como úteis, por meio das técnicas clássicas e modernas. O mais importante no momento é, entretanto, o desenvolvimento de processos de triagem (*screening*), que levem a uma rápida seleção dos microrganismos mais favoráveis dentre os muitos isolados de um ambiente natural. Atualmente, mais de uma dezena de empresas estão constantemente realizando essa triagem (Bills, 1995). Fontes como o solo, plantas, animais, resíduos urbanos, da agricultura e industriais, águas e muitas outras, estão sendo exploradas com o objetivo de se descobrir novos microrganismos com aplicações biotecnológicas.

É crucial o uso de meios de cultura e de técnicas de incubação apropriadas, além de técnicas de detecção rápidas e sensíveis, aliadas à robotização de todo o processo de triagem. A formulação de meios seletivos, por exemplo, permite obter, em uma placa de Petri, apenas os microrganismos que se deseja selecionar ou, pelo menos, que sejam distinguíveis dos outros por características fenotípicas.

ABELA 2. Exemplos de enzimas de aplicação biotecnológica produzidas por organismos, especialmente actinomicetos (segundo Manfio & Lemos, 1996).

ZIMAS	APLICAÇÕES	ORGANISMOS PRODUTORES
REDUTASES		
stisona reductase	Biotransformação	<i>Streptomyces hygrogenans</i>
lesterol oxidase	Análises clínicas	<i>Nocardia</i> sp., <i>Rhodococcus rhodochrous</i> , <i>Streptomyces</i> spp.
ntina desidrogenase	Biotransformação	<i>Streptomyces cyanogenus</i>
enilalanina	Indústria de alimentos	<i>Alcaligenes</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Corynebacterium</i> sp., <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>Rhodococcus</i> sp.
glutamato oxidase	Análises clínicas	<i>Streptomyces violacens</i>
to oxidase	Medicina	<i>Streptomyces cyanogenus</i> , <i>Streptomyces ganmycicus</i>
onofenol monoxidase	Biodegradação de fenol	<i>Streptomyces glaucescens</i>
ANSFERASES		
etiltransferases	Biotransformação	<i>Streptomyces spectabilis</i>
fototransferases	Biotransformação	<i>Streptomyces fradiae</i> , <i>Streptomyces griseus</i>
ucleotidiltransferases	Análises clínicas, biotransformação	<i>Streptomyces coelicolor</i>
ROLASES		
ases: específicas	Biotransformação	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Streptomyces lavendulae</i>
ases: inespecíficas	Indústria de detergentes	<i>Bacillus</i> spp.
folipases	Análises clínicas, biotransformação	<i>Streptomyces hiroshimensis</i> , <i>Streptomyces scabies</i> , <i>Streptomyces</i> spp.
donucleases	Biologia molecular	Vários gêneros de bactérias, incluindo actinomicetos, bacilos, enterobactérias e pseudomonas
ilases	Alimentos e têxtil	<i>Streptomyces</i> spp., <i>Thermoactinomyces vulgaris</i> , <i>Thermommonospora</i> spp.
ulases	Alimentos, têxtil e papel	<i>Streptomyces</i> spp., <i>Thermommonospora</i> spp., fungos
onases	Têxtil e papei	<i>Streptomyces</i> spp., <i>Thermommonospora</i> spp., fungos diversos



ENZIMAS	APLICAÇÕES	ORGANISMOS PRODUTORES
HIDROLASES		
Quitinases	Processamento de quitina	<i>Amycolatopsis orientalis</i> , <i>Streptomyces</i> spp.
N-Acetilmuramidase	Lise de parede celular bacteriana	<i>Streptomyces</i> spp.
Neuraminidase	Biologia molecular	<i>Actinomyces</i> spp., <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Corynebacterium</i> spp., <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Mycobacterium</i> spp.
a-D-Galactosidases	Biologia molecular, medicina	<i>Streptomyces</i> spp.
1,3-a e 1,3-B Glucanases	Biodegradação, medicina, biotransformação	<i>Streptomyces</i> spp.
Peptideo hidrolases (proteínases)	Biologia molecular, indústria de detergentes e têxtil	<i>Actinomadura</i> sp., <i>Bacillus</i> spp., <i>Clostridium</i> spp., <i>Streptomyces</i> spp., <i>Thermoactinomyces</i> sp., <i>Thermomonospora</i> spp.
L-Asparaginase	Medicina	<i>Escherichia coli</i> , <i>Mycobacterium</i> spp., <i>Streptomyces karnatakensis</i>
Aminoacilase (isômeros óticamente ativos de aminoácidos)	Biotransformação	<i>Mycobacterium smegmatis</i> , <i>Streptomyces</i> spp., <i>Streptoverticillium</i> spp.
LIASES		
Pectato liase	Biodegradação de pectinas, indústria de alimentos (clarificação)	<i>Streptomyces</i> spp.
L-Fenilalanina amônia liase	Biotransformação	<i>Neurospora crassa</i> , <i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>Streptomyces</i> spp.
ISOMERASES		
D-Xilose isomerase (aldose em cetose)	Biotransformação	<i>Actinoplanes missourinensis</i> , <i>Microbispora rosea</i> , <i>Micromonospora coerulea</i> , <i>Nocardia asteroides</i> , <i>Nocardiopsis dassonvillei</i> , <i>Streptomyces</i> spp.
SINTASES		
Fenoxiazinona sintase	Biotransformação (produção de actinomicina)	<i>Streptomyces antibioticus</i>

TABELA 3. Exemplos de ações microbianas na tecnologia de biorremediação (segundo Zoller, 1996).

AÇÕES MICROBIANAS	DIFICULDADES	SOLUÇÕES
<p>inibição da degradação de fenantreno em solos contaminados com óleos de alcatrão</p> <p>avés da ação de <i>Phanerochaeta</i> <i>lysosporium</i></p>	Inexistência de população especializada <i>in situ</i>	Inoculação com organismos externos
<p>inibição da mineralização de benzeno, benzopireno e carbazol</p> <p>por consórcios microbianos</p>	Baixa população de agentes degradadores <i>in situ</i>	Seleção e enriquecimento <i>in situ</i>
<p>inibição do metabolismo de PCBs pela espécie <i>Cometobacter</i> sp., estimulado pela presença do substrato primário</p> <p>enzimático</p>	Ausência de substrato para crescimento	Suplementação com o substrato primário
<p>favorecimento do metabolismo aeróbio para a ocorrência de reações de desalogenação redutiva (reações de redução de moléculas halogenadas, seguida de sua degradação)</p>	Condições físico-químicas ambientais	Alteração das condições ambientais
<p>inibição da biodegradação de compostos aromáticos pela presença de doadores de elétrons (ácidos orgânicos e álcoois)</p>	Ausência de doadores de elétrons que favorecem as reações de redução de compostos halogenados	Suplementação de compostos doadores de elétrons

Se o sucesso da descoberta de novos produtos consiste em obter microrganismos ainda não descritos, deve-se ter em conta que, além da busca em ambientes distintos como os já citados, também é importante obter várias amostras de um mesmo local em diferentes épocas do ano. Deve-se ainda lembrar que são imprescindíveis as técnicas que permitam o isolamento não só de microrganismos de rápido crescimento, como também daqueles de crescimento lento que, em geral, são mascarados pelos primeiros. Finalmente, é de grande importância considerar, durante a pesquisa, se interessa apenas o isolamento de microrganismos para finalidades aplicadas ou se há também interesse em descobrir novas taxonomias para avaliar a biodiversidade existente. Bull *et al.* (1992) citam vários exemplos de sucesso na busca seletiva de microrganismos de interesse biotecnológico, empregando-se meios seletivos e ambientes de busca apropriados.

IMPORTÂNCIA DA CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE MICROBIANA

A preservação da diversidade microbiana é pouco considerada, embora se saiba que microrganismos geram, só pela sua utilização em processos biotecnológicos, bilhões de dólares por ano. A perda dessa biodiversidade não é prejudicial apenas do ponto de vista biotecnológico, mas também para a conservação do ambiente. Entretanto, e este dado é estarrecedor, os primeiros brados de alerta para a preservação de microrganismos na natureza só surgiram por volta dos anos 80 (Bull *et al.*, 1992). Não se tem idéia, nos dias de hoje, de quanto dessa biodiversidade já se perdeu. Sabendo que florestas tropicais desaparecem na base de 2% ao ano, o que equivale ao tamanho da Suíça e Holanda juntas (Wilson, 1989), e que outras áreas como pantanais e terras agricultáveis sofrem grandes transformações com danos para a população microbiana, estima-se que milhares de espécies já estejam extintas. Os dados de Raven, citados por Hawksworth (1991), são assustadores. Nos próximos 25 anos, devem ser extintas cerca de 376.000 espécies só de fungos, se medidas não forem tomadas. A importância da preservação dessa biodiversidade é evidente. Uma das formas de preservá-la é por meio de coleções de culturas microbianas *ex situ*, isto é, manutenção por processos apropriados como sílica gel, liofilização, nitrogênio líquido e muitos outros (Azevedo, 1991). Esforços nesse sentido são realizados no mundo todo, inclusive no Brasil. Como bem salienta Canhos (1996), países em desenvolvimento ainda não perceberam a importância de conservar e explorar sua diversidade microbiana, e a preservação *ex situ* é essencial no caso. Entretanto, o número de espécies microbianas já existentes e a diversidade dentro e entre elas é tão grande que será praticamente impossível mantê-las em coleções. Existem atualmente — só considerando os fungos — cerca de 254.000 linhagens em coleções de culturas. Levando em conta a sinonímia de espécies, podemos estimar que esse número caia para 11.500 espécies distintas, o que representa menos de 17% das espécies de fungos já classificadas e menos de 1% do número total de espécies provavelmente existentes (Hawksworth, 1991). Além do mais, a conservação de microrganismos *ex situ* bloqueia, de certa maneira, a evolução, e conseqüentemente prejudica a própria manutenção da biodiversidade. Há, portanto, necessidade de conservação de locais para preservação de microrganismos *in situ*. Em-

ora difícil, isso pode ser conseguido por programas bem dirigidos, que aliem fatores como a conservação de ambientes naturais diversos e monitoramento por meio de técnicas clássicas e modernas. Mesmo assim, a poluição, através do ar como pela "chuva ácida", está constantemente colocando em risco as populações microbianas nessas regiões aparentemente preservadas.

INICIATIVAS PARA O BRASIL

Com um vasto território, climas e solos diversos, o Brasil possui um dos mais altos índices de diversidade microbiana do mundo. A Amazônia, com grande parte de sua área localizada no Brasil, além de outros países e regiões como Indonésia e Madagascar, estão entre as de maior biodiversidade (Bull *et al.*, 1992). Torna-se necessário explorar e preservar essa biodiversidade, o que resultará em benefícios não apenas para o país, mas para todo o mundo. Medidas a curto, médio e longo prazo têm que ser adotadas e entre elas salientam-se:

a) Formação de recursos humanos na área de microbiologia, especialmente em taxonomia. É surpreendente, mas, apesar de todo potencial existente em nosso país para exploração da biodiversidade microbiana, temos uma microbiologia ainda incipiente na maioria de suas linhas de pesquisa. Embora alguns programas de microbiologia do solo e controle biológico sejam reconhecidos como de bom nível, inclusive internacionalmente, grande parte da microbiologia brasileira sempre se voltou para problemas da área médica, atualmente com fraco poder de competitividade em escala mundial. Muitos programas de apoio ao desenvolvimento científico e tecnológico na área de ciências biológicas no Brasil estão, mais recentemente, voltados à resolução de problemas de fronteira como, por exemplo, aspectos diversos da biologia molecular microbiana, incluindo espécies de interesse acadêmico de importância principal para o campo da saúde. Essas pesquisas, hoje extremamente competitivas em todo o mundo, e baseadas normalmente em grandes equipes com fortes interações inter e multidisciplinares, deixam pouco espaço para que resultados significativos sejam gerados no Brasil. Os pesquisadores brasileiros na área têm a publicação de seus trabalhos em revistas de alto nível, que, por outro lado, são raramente citadas na literatura internacional. Basta verificar que o índice de citações de trabalhos publicados no Brasil não chega a 1% do número de citações totais, índice

superado por países de população muito menor, como Israel, por exemplo (Schott, 1993).

Um dos casos típicos ocorridos recentemente no Brasil é o do programa de apoio ao desenvolvimento científico e tecnológico em biotecnologia, que, investindo em grupos consolidados e com bom número de publicações científicas em revistas internacionais, do início dos anos 80 até hoje, praticamente não produziu um processo ou produto biotecnológico e muito menos um retorno financeiro ao país. Entretanto, o programa vem gerando recursos humanos qualificados, especialmente em pesquisa acadêmica, principalmente na biologia molecular, embora quase sem vinculação com a resolução de problemas de real interesse para o país, ou aproveitando a biodiversidade existente. O programa, com exceção do estabelecimento de uma coleção de culturas microbianas, olvidou que, ao nosso redor, existe uma imensa diversidade biológica que, se for bem explorada, resultará em processos e produtos que devem suplantar aqueles que eventualmente seriam obtidos utilizando apenas técnicas mais modernas. É necessário, portanto, uma urgente formação de pessoal capaz de aliar processos clássicos e modernos na utilização da biodiversidade. Infelizmente, a ênfase foi tão grande em técnicas consideradas de ponta que os taxonomistas no Brasil praticamente tornaram-se um grupo em extinção. A perda da diversidade é tão importante na natureza como nas especialidades dos pesquisadores. À semelhança do que está ocorrendo no mundo microbiano, certas categorias de pesquisadores também vêm se extinguindo, com sérios riscos para o desenvolvimento da ciência atual e futura.

b) Preservação *ex situ* de microrganismos por meio de coleções bem estruturadas e priorização de ecossistemas ameaçados para sua preservação e dos microrganismos neles existentes.

Embora existam iniciativas isoladas de sucesso, como a da Fundação André Tosello, em Campinas, e em laboratórios que tentam manter suas coleções de interesse para pesquisa própria, outras coleções de cultura sofreram ou estão sofrendo grandes perdas. Há necessidade de investimentos maiores e de continuidade na área. Continuidade nesse aspecto é extremamente importante, pois a preservação não pode ser baseada em indivíduos mas sim em instituições que resistam ao tempo.

c) Integração do Brasil a uma rede internacional, não só visando conservação de microrganismos mas também sua exploração. Atualmente não é mais possível conceber esforços locais ou

regionais para programas de âmbito internacional. A diversidade microbiana existente no país, se bem explorada por um conjunto de, por exemplo, empresas e indivíduos de instituições públicas e privadas nacionais e do exterior, resultará em benefícios para todos. Novas tecnologias estão constantemente sendo descobertas e implantadas. O intercâmbio de pessoal, de informações e de interesses é que levará a diversidade microbiana existente no Brasil ao seu uso racional e a resultados positivos. Seria ingênuo supor que vamos manter e explorar sozinhos e convenientemente nossa biodiversidade. A História é muito importante, pois ela nos ensina a construir um futuro melhor a partir dos erros e acertos do passado. Exemplos já conhecidos no Brasil, incluindo vegetais como a seringueira e forrageiras e também microrganismos, mostram que a nossa biodiversidade já foi levada para outros países e aplicada com sucesso. Mostra também que, da mesma forma, já exploramos com sucesso a biodiversidade externa, como no caso do café e de certas essências florestais. O momento atual é de interação. É pela utilização inteligente da biodiversidade, o que tem que ser feito pela integração entre diversas áreas de saber e grupos nacionais e do internacionais, que chegaremos ao desenvolvimento de novos processos e produtos de interesse global.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- OLFI FILHO, S.; AZEVEDO, J.L.; AZEVEDO, M.O. Novas técnicas de recombinação em microrganismos: a engenharia genética pela tecnologia do DNA recombinante. In: AZEVEDO, J.L. coord. **Genética de microrganismos em biotecnologia e engenharia genética** Piracicaba: FEALQ, 1985. p.43-59.
- AZEVEDO, J.L. coord. **Genética de microrganismos em biotecnologia e engenharia genética** Piracicaba: FEALQ, 1985. 173p.
- AZEVEDO, J.L. Novos sistemas de recombinação em microrganismos. **O Biológico**, v.50, p.115-125, 1986.
- AZEVEDO, J.L. Melhoramento genético e preservação de fungos utilizados no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIL, W. coord. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. p.237-251.
- AZEVEDO, J.L. **Fundamentos de genética de microrganismos**. Goiânia: Editora Universidade Federal de Goiás, 1996 (no prelo).
- CHAPMAN, G.F. Analysis of microfungus diversity from a user's perspective. **Canadian Journal of Botany**, v.73, suppl.1, p.33-41, 1995.
- CHAPMAN, G.F.; GOODFELLOW, M.; SLATER, J.H. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. **Annual Review of Microbiology**, v.46, p.219-252, 1992.
- FRANCO, V.P. Infra-estrutura científica e tecnológica. Coleções de culturas de microrganismos. In: **Biodiversidade: perspectivas e oportunidades tecnológicas**. Workshop, Campinas, 1996, 9p.
- FRANCO, S.O.P. coord. **Genética molecular e de microrganismos** São Paulo: Manóele, 1987. 559p.
- HIRAI, H.; HIRAI, K. Genetic diversity of avian *Chlamydia psittaci* strains and relation to host origin. **Journal of Bacteriology**, v.171, p.2850-2855, 1989.

- FUNGARO, M.H.P. Uso do RAPD na taxonomia. In: ENCONTRO DE GENETICISTAS DO RIO GRANDE DO SUL, 9., Caxias do Sul, 1995. **Anais**. p.61-72.
- GLIENKE, C. Variabilidade genética no fungo endófito *Guignardia citricarpa* Kiely, detectada por RAPD. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1995. 115p. Dissertação de Mestrado.
- HAWKSWORTH, D.L. The fungal dimension of biodiversity: Magnitude, significance and conservation. *Mycological Research*, 95: 641-655, 1991
- HAWKSWORTH, D.L. Fungi: a neglected component of biodiversity crucial to ecosystem function and maintenance. **Canadian Biodiversity**, v.1, p.4-10, 1992.
- KENNEDY, A.C.; SMITH, K.L. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soil. **Plant and Soil**, v.170, p.75-86, 1995.
- LONGO, A.C. Transformação genética e variabilidade detectada por RAPD em isolados endofíticos de *Colletotrichum musae*. Piracicaba: ESALQ-USP, 1996. p.101. Tese de Doutorado.
- MANFIO, G.; LEMOS, M.F. Diversidade microbiana e desenvolvimento sustentável: microrganismos e aplicações industriais: actinomicetos na indústria. In **Biodiversidade: perspectivas e oportunidades tecnológicas**. Workshop, Campinas, 1996. 9p.
- MILLER, S.L. Functional diversity in fungi. **Canadian Journal of Botany**, v.73, suppl.1, p.50-57, 1995.
- OLEMBO, R. Biodiversity and its importance to the biotechnology industry. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.21, p.1-6, 1995.
- PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; VALARINI, M.J.; AZEVEDO, J.L.; ALFENAS, A.C. **Manual de técnicas eletroforéticas em microrganismos**. Piracicaba: FEALQ, 1988. 54p.
- PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. **Técnicas eletroforéticas para separação de cromossomos de microrganismos**. Piracicaba: FEALQ, 1989. 31p.
- RIBEIRO, L.A. Variabilidade genética por RAPD em fungos endófitos do gênero *Penicillium* provenientes de *Zea mays* L. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1995. p.90. Dissertação de Mestrado.
- SCHOTT, T. **Performance, specialization and international integration of science in Brazil**. changes and comparison with other Latin America an Israel. São Paulo: Fundação Getúlio Vargas, 1993. 73p. (série Ciência e Tecnologia no Brasil).
- STAHL, D.A.; FLESHER, B; MANSFIELD, H.R.; MONTGOMERY, L. Use of phylogenetically based hybridisation probes for studies of ruminal microbial ecology. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.1079-1084, 1988.
- VAZOLER, R.F. Diversidade microbiana e desenvolvimento sustentável: Microbiologia e saneamento ambiental. In: **Biodiversidade: perspectivas e oportunidades tecnológicas**. Workshop, Campinas, 1996. 15p.
- WARD, D.M.; BATESON, M.M.; WELLER, R; RULF, R.A. RNA analysis of microorganisms as they occur in nature. **Advances in Microbial Ecology**, v.12, p.219-286, 1992.
- WARD, D.M.; WELLER, R.; BATESON, M.M. 16 S sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. **Nature**. London, v.345, p.63-65, 1990.
- WILSON, E.O. Threats to biodiversity. **Scientific American**. v.261, p.60-66, 1989.



PARTE VIII

MONITORAMENTO AMBIENTAL



O DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS SUICIDAS PARA A CONTENÇÃO DE MICRORGANISMOS RECOMBINANTES NO AMBIENTE

Andrea Balan Fernandes

Ana Clara G. Schenberg

Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo
Cidade Universitária, Caixa Postal 66208, CEP 05508-900, São Paulo, SP

INTRODUÇÃO

Durante os anos 70, o desenvolvimento das técnicas de engenharia genética teve grande impacto sobre as ciências médicas e biológicas, que passaram a utilizar diversas proteínas produzidas a partir de microrganismos geneticamente modificados ou, em linguagem comum, “engenheirados” (GEMs – Genetic Engineered Microorganisms). O interesse nessas técnicas, bem como o desenvolvimento de produtos a partir de plantas e microrganismos em geral, vem sendo grandemente influenciado pela rapidez com que os resultados de pesquisa básica têm atingido a aplicação. O primeiro resultado foi a produção, por microrganismos, de peptídeos e proteínas de origem animal. A grande quantidade de informação e experiência acumulada sobre certos microrganismos de laboratório, tais como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae*, possibilitou que fossem, de imediato, empregados como hospedeiros de genes heterólogos; hoje, o espectro de hospedeiros é praticamente ilimitado. Contudo, a própria rapidez com que esta ciência se desenvolve gera uma constante preocupação, por parte dos pesquisadores e da sociedade, com relação aos riscos inerentes à manipulação genética e a uma possível contaminação do meio-ambiente por tais GEMs.

Os próprios descobridores das novas metodologias logo reconheceram os riscos potenciais que elas apresentavam, tendo tomado a iniciativa de organizar, já em 1975, a Conferência de Asilomar sobre Moléculas de DNA Recombinante, que teve como principal objetivo discutir as maneiras de se trabalhar com microrganismos geneticamente manipulados e buscar definições e estratégias para garantir a segurança dos pesquisadores e da população (Berg *et al.*, 1975). Definiram-se, naquela ocasião, regras de conduta bastante rígidas para que o trabalho científico fosse realizado com o mínimo de riscos para o pesquisador, a população e o ecossistema. Barreiras biológicas e físicas adequadas deveriam ser criadas para conter os novos microrganismos formados a partir do DNA recombinante. Entretanto, essa regulamentação foi posteriormente abrandada para não tolher em demasia a liberdade dos pesquisadores, o que poderia vir a obstruir o progresso científico.

Em alguns casos, os GEMs foram descritos como capazes de interferir em populações microbianas e seus processos fisiológicos no solo (Austin *et al.*, 1990; Doyle *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1989). O principal ponto levantado sobre essa questão é o fato de pouco se conhecer sobre o comportamento dos organismos fora do laboratório e sobre o efeito de interferências ambientais que poderiam advir da recombinação genética ou mesmo de mutações que os GEMs viessem a sofrer depois de sua liberação na natureza (Tiedje *et al.*, 1989). Um problema adicional que se apresenta é a falta de controle da nossa parte sobre a transferência de material genético de um organismo para outro, fenômeno muito frequente principalmente entre bactérias, através de processos como conjugação, transdução e transformação (Stozky, 1989; Lorenz & Wernagel, 1993), que poderiam ocorrer entre os GEMs e os microrganismos naturais do meio-ambiente.

Embora a transformação genética de bactérias tenha sido descrita desde 1928 por F. Griffith, vindo a ser compreendida nos seus mecanismos básicos em 1944 (Avery *et al.*, 1944), só recentemente foi comprovada a ocorrência de transformação genética no ambiente, ou "natural", entre diferentes espécies bacterianas (Stewart, 1989). Na verdade, trata-se do mesmo fenômeno em que ocorre a entrada, na célula bacteriana, de fragmentos de DNA livre (cromossômico ou plasmidial), que podem incorporar-se no cromossomo da célula, de maneira que a transformação genética acaba sendo transmitida às gerações subsequentes. Esse é um dos mecanismos de transferência gênica horizontal e

depende da função de vários genes localizados no cromossomo bacteriano (revisto por Lorenz & Wackernagel, 1994).

Os resultados de estudos *in vitro* da transformação de muitas espécies bacterianas e a evidência da persistência de DNA livre no ambiente aumentaram o interesse pelo estudo do crescimento, adaptação e evolução dos microrganismos no ambiente natural e, por outro lado, do estabelecimento de sistemas capazes de degradar o material genético de microrganismos geneticamente manipulados (Molin *et al.*, 1993). Na Fig. 1, vê-se a representação esquemática do fluxo de genes por transformação, proposto para ambientes aquáticos e terrestres (Lorenz, 1992).

Fragmentos de DNA livres no ambiente são continuamente produzidos por lise celular e excreção, formando agregados de DNA. A liberação desses agregados é distribuída em superfícies de minerais e outros sedimentos, como também em partículas suspensas nos habitats aquosos. Esse DNA extracelular pode transformar células competentes ou ser degradado pela atividade de DNAses extra e intracelulares, sendo os produtos da degradação então utilizados como nutrientes (Lorenz & Wackernagel, 1993).

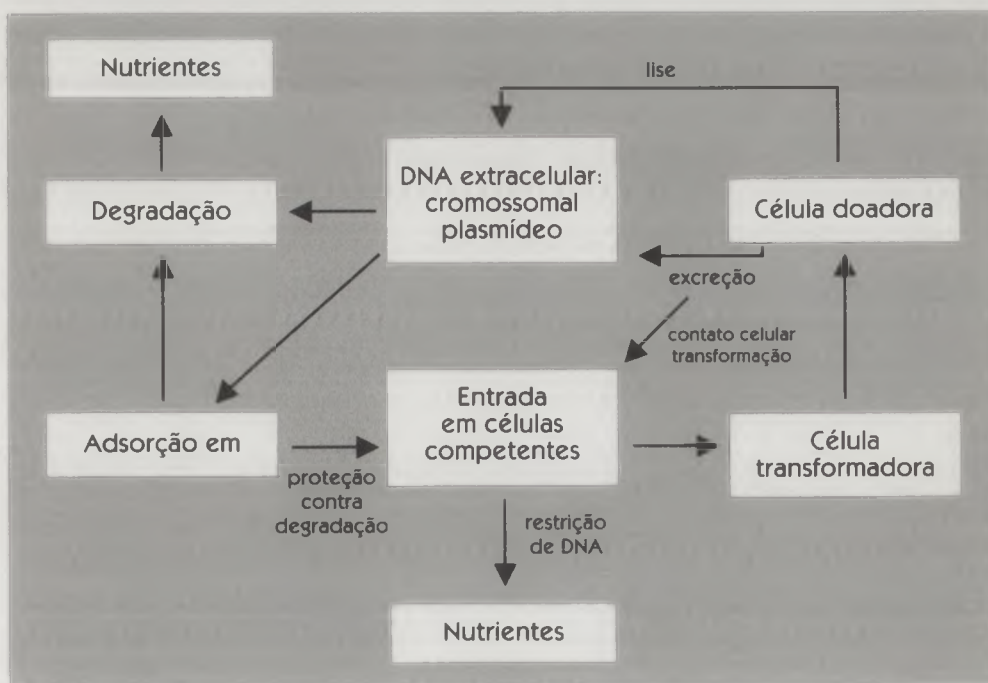


FIGURA 1. Esquema da transferência de DNA livre em ambientes aquáticos e terrestres (extraído de Lorenz & Wackernagel, 1994).

A meta principal do desenvolvimento de sistemas biológicos de contenção dos GEMs consiste na eliminação (ou, ao menos, numa redução substancial) de tais populações microbianas introduzidas nos ecossistemas, uma vez que sua função já tenha sido completada. Duas diferentes abordagens se apresentam para o estabelecimento desses sistemas de confinamento: a) um mecanismo passivo baseado na debilitação da linhagem, tornando-a incapaz de sobreviver por muito tempo fora das condições de laboratório. Assim, por exemplo, foi construída a linhagem mutante X1776 de *Escherichia coli*, que, para a constituição da rede celular, necessita do ácido diaminopimélico, molécula raramente encontrada na natureza (Curtiss *et al.*, 1977). Essa abordagem apresenta a desvantagem de que as linhagens perdem muito de seu vigor, mesmo em condições ótimas de laboratório, e evidentemente não se prestam para desenvolver algum tipo de tarefa no meio ambiente, onde não serão capazes de competir com a flora natural; b) um mecanismo ativo, pelo qual o tempo de vida da linhagem seja controlado através da indução proposital de uma proteína letal. O desempenho da linhagem é portanto normal, até o momento em que ela comete suicídio. Esse mecanismo poderia ser introduzido em qualquer linhagem sadia (Mudsssen & Karlstrom, 1991), que passaria, então, a carregar o gene e desencadearia sua própria morte.

GENES ASSASSINOS OU SUICIDAS

Para se estudar o desenvolvimento de sistemas "suicidas", foi primeiramente necessário identificar genes que codificassem proteínas, tendo como alvo de ação estruturas essenciais da célula, tais como a membrana celular, ribossomos etc. Durante estudos sobre a manutenção do plasmídeo R1 de *E. coli*, foi identificado um locus responsável pelo seu alto grau de estabilidade, que está relacionado à expressão de um pequeno polipeptídeo (52 aminoácidos), altamente tóxico para as células (Gerdes *et al.*, 1985; Gerdes *et al.*, 1986). O fenótipo da estabilidade do plasmídeo está sob controle de um "RNA antisense", sintetizado constitutivamente, que regula a expressão do peptídeo tóxico. Contudo, em células nas quais o plasmídeo não segregou, o "RNA antisense" decai rapidamente, tornando um RNA mensageiro extremamente estável, que codifica o polipeptídeo tóxico, o que irá resultar na eliminação das células livres de plasmídeo da população (Gerdes *et al.*, 1986b).

O isolamento dos dois genes, regulador e efetor, permitiu a análise molecular do mecanismo de controle da expressão gênica (Gerdes *et al.*, 1988; Gerdes *et al.*, 1990a). O gene que codifica o polipeptídeo tóxico foi denominado *hok*, (“host killing”), e o RNA antisense foi denominado *sok* (“suppression of killing”). A proteína tóxica afeta a morfologia das células, tornando-as transparentes devido à perda de substâncias celulares, relacionada à desestabilização da membrana celular, resultando na parada da respiração (Gerdes *et al.*, 1986a).

A partir da identificação dos genes *hok* e *sok* do plasmídeo R1 de *E. coli*, os pesquisadores foram à procura, em outros plasmídeos, de seqüências homólogas que pudessem apresentar a mesma função (Gerdes *et al.*, 1990b). Bech e colaboradores (1985) identificaram o gene *rel F*, a 37 minutos no cromossomo de *E. coli*, que é estruturalmente semelhante ao *hok*, mas para o qual ainda não se encontrou o significado biológico.

Um segundo homólogo do gene *hok*, o gene *gef*, foi identificado no cromossomo de *E. coli* (1 minuto no mapa) e a proteína codificada por esse gene apresenta um mecanismo de ação idêntico ao dos genes *hok* e *rel F* (Poulsen *et al.*, 1989). Dois aspectos dessa família de genes têm sido estudados: a) a regulação da expressão gênica; b) o modo de ação dessas proteínas. A partir da construção de um gene de fusão entre *gef* e *pho A*, resultando em uma fosfatase alcalina enzimaticamente ativa ligada à membrana, localizou-se a Gef, uma proteína ancorada na membrana, com a região C-terminal voltada para o periplasma (Poulsen *et al.*, 1991). Essa proteína é constituída por um dímero, que pode sofrer modificações pós-traducionais. Foi proposto um modelo de que a proteína Gef forme uma porina na membrana interna, através da qual ocorreria o transporte de várias substâncias; no caso de ser produzida em excesso, o transporte levaria à morte da célula. Uma das conseqüências da ligação da proteína na membrana é a saída do íon Mg^{++} das células e o simultâneo transporte de RNase do periplasma para o citoplasma, com capacidade de degradação de RNA ribossomal, sendo tais danos irreversíveis (Akimoto *et al.*, 1986; Ono *et al.*, 1987; Sakikawa *et al.*, 1989). As proteínas Gef, RelF e Hok têm sido usadas como “assassinas” (killers) em outras bactérias com resultados satisfatórios (Contreras *et al.*, 1991; Knudsen & Karlstrom, 1991; Molin *et al.*, 1987). Sua grande vantagem é que elas são pequenas, altamente tóxicas, mesmo quando presentes em pequenas quantidades dentro da célula, causando um efeito de reação em cascata, que se segue à sua incorporação na membrana. Também apresentam a vantagem de

eram ativas contra várias espécies bacterianas (Molin *et al.*, 1987). Um modelo de sistema suicida, construído para a contenção de GEMs, inserindo o gene *hok* (Bej *et al.*, 1988) e outros genes desta família sob o controle do promotor *lac* de *E. coli* em plasmídeos ou cromossomos de diferentes bactérias, permitiu a indução da morte, após a adição de IPTG, em todas as espécies bacterianas analisadas, embora com diferentes intensidades (Molin *et al.*, 1987).

DNA COMO ALVO DE DESTRUIÇÃO CELULAR - NUCLEASES

Apesar do sucesso dos experimentos realizados com proteínas da família Gef, um sério problema ainda continuava sendo pertinente: a liberação do material genético para o ambiente, mesmo depois da morte da célula, uma vez que as proteínas atuam na membrana, acabando por liberar conteúdo celular para o meio. Uma série de pesquisas vinha evidenciando a persistência do DNA no meio-ambiente por períodos de tempo suficientes para permitir a ocorrência de processos de recombinação ou conjugação (Roszak & Colwell, 1987). A Tabela 1 relaciona o tempo de permanência do DNA livre em diferentes ambientes. Esses resultados redirecionaram os pesquisadores, que partiram em busca de novas proteínas assassinas, capazes de atuar diretamente sobre o material genético.

As nucleases começaram, portanto, a ser consideradas para essas finalidades, já que apresentam uma vantagem muito importante sobre os Gef's: as nucleases têm a capacidade de degradar diretamente o material genético, evitando a passagem deste de uma linhagem para outra, além de destruir a fonte de todos os elementos celulares.

Um dos pioneiros na construção de sistemas baseados na degradação do material genético foi Stephen Cuskey, que utilizou a endonuclease de restrição *EcoRI*, em *E. coli* (Molin *et al.*, 1993). Mais recentemente, Ehrenholtz *et al.* (1994) desenvolveram um sistema suicida baseado na degradação do material genético de *E. coli*, através da ação da endonuclease extracelular de *Serratia marcescens*, clonada a jusante do promotor p_{λ} do fago lambda, controlado pelo repressor termossensível λ 857. A quantidade de enzima produzida após a indução foi suficiente para degradar 80% do DNA intracelular, inclusive plasmidial.

TABELA 1. Tempo de vida do DNA em vários ambientes (extraído de Lorenz & Wackernagel, 1994).

AMBIENTE	MEIA-VIDA (h)	REFERÊNCIA
AMBIENTE AQUÁTICO		
Esgotos	0,017-0,17 0,23	Phillips <i>et al.</i> , 1989 Fibi <i>et al.</i> , 1991
Águas limpas		
oligotrófico	4,2	Paul <i>et al.</i> , 1989
eutrófico	5,5	Paul <i>et al.</i> , 1989
Água do mar		
estuário	3,4-5,2	Paul <i>et al.</i> , 1989 Paul <i>et al.</i> , 1987
superfície oceânica	5,5	DeFlaun <i>et al.</i> , 1989
oligotrófica	12,8	Paul <i>et al.</i> , 1989
limitação de P	4,5	Turk <i>et al.</i> , 1992
sem limitação de P	45,0-83,0	Turk <i>et al.</i> , 1992
Sedimentos marinhos	235 140	Novitzky, 1986 Maeda & Taga, 1974
AMBIENTE TERRESTRE		
Solo		
arenosos	9,1	Romanowsky <i>et al.</i> , 1992
lodosos	15,1	Romanowsky <i>et al.</i> , 1992
barro	18,2	Romanowsky <i>et al.</i> , 1992

A maioria dos trabalhos desenvolvidos ressalta a importância da escolha do promotor e do sistema de reparação celular como fatores que podem afetar o resultado final da ação das nucleases. Para que o sistema suicida seja eficiente, a enzima deve estar presente em alto nível de concentração, de modo a competir com o sistema de reparação celular do material genético. De fato, quando se usam células portadoras da mutação *rec A*, o efeito letal das nucleases fica ainda mais evidente. Vem sendo dada preferência às nucleases extracelulares de *Serratia marcescens* e *Staphylococcus aureus*, uma vez que são extremamente ativas e capazes de digerir DNA e também RNA (Ball *et al.*, 1987; Ahrenholtz *et al.*, 1994).

A nuclease extracelular de *S. marcescens* é constituída de 264 aminoácidos, dos quais 21 correspondem à seqüência "sinal" (Ball *et al.*, 1987). A presença de 4 resíduos de cisteína é fundamental para a formação de duas pontes dissulfeto, sem as quais a atividade da enzima pode ser alterada (Ball *et al.*, 1992). A nuclease madura de *S. aureus* é formada por 149 resíduos de aminoácidos. Essa enzima não contém resíduos de cisteína e apresenta maior estabilidade (meia-vida intracelular de duas horas) do que a de *S. marcescens* (dois minutos) (Davis *et al.*, 1977; Shortle, 1983).

Bej & Molin (Molin *et al.*, 1993) examinaram a atividade dessas nucleases em sistemas suicidas. Para ambas, a estratégia de contenção envolveu a clonagem das seqüências representando as enzimas maduras, sob indução do promotor *lac*. Ao contrário do que havia sido visto com a endonuclease de restrição *EcoRI*, na ausência de indução, as células continuavam a crescer perfeitamente bem, o que mostra que níveis basais dessas nucleases não são letais. Após a indução da expressão, as células param de crescer e uma fração importante da população morre, ocorrendo degradação do DNA cromossômico.

Com relação à função suicida, as nucleases apresentam vantagens sobre as proteínas da família Gef, uma vez que atuam diretamente no DNA. As nucleases têm como alvo uma estrutura encontrada em todas as células; além de terem-se mostrado eficientes em várias espécies de bactérias, uma estratégia semelhante funcionou para plantas (Mariani *et al.*, 1990).

CONTROLE DA EXPRESSÃO GÊNICA

O ponto chave para a construção de um sistema suicida reside na regulação da expressão do gene assassino. Primeiramente, é importante que não haja "vazamento" da expressão do gene, ou seja, que só ocorra expressão após a indução, para evitar o aparecimento de resistência, como será explicado mais adiante. Em laboratório, o controle eficaz da expressão gênica pode ser facilmente obtido, existindo vários promotores disponíveis (Molin *et al.*, 1993). No meio-ambiente, porém, vários fatores ainda mal conhecidos podem alterar esse controle; num meio onde as condições variam constantemente, é difícil prever quais serão os sinais externos aos quais a célula responderá. Um problema encontrado pelos pesquisadores é a identificação da expressão dos genes

no ambiente, porque a maioria das células pode permanecer a maior parte do tempo em estado de dormência e até mesmo morrer desta forma. Seria, portanto, ideal que os sistemas suicidas fossem dotados de promotores suficientemente fortes e que permitissem a expressão da proteína, tanto em células em crescimento ativo como em período estacionário.

MECANISMO DE CONTROLE QUÍMICO

Este tipo de controle baseia-se na indução do gene suicida através de um determinado composto, como, por exemplo, o IPTG (Bej *et al.*, 1988). O problema, neste caso, é a ausência de tais produtos químicos livres no ambiente. Um modelo alternativo de regulação, em que a ausência de determinado composto é o fator desencadeante, consistiu na construção de um plasmídeo, contendo o gene *hok*, sob o controle do promotor *trp* de *E. coli* (Molin *et al.*, 1987; Molin *et al.*, 1988). Como a presença de triptofano reprime o promotor, quando a concentração de aminoácido no ambiente for reduzida em consequência do consumo pelo microrganismo, ocorrerá a desrepressão do gene e a síntese de proteína Hok, matando as células. O vínculo do sistema suicida a um repressor produzido em condições laboratoriais poderia ser útil. Assim, no laboratório, um determinado composto seria adicionado ao meio e induziria a expressão do repressor. No ambiente, como este composto não está presente, não haverá síntese do repressor e conseqüentemente a função suicida seria expressa.

MECANISMO DE CONTROLE FÍSICO

A contenção de microrganismos recombinantes por um sistema de controle físico baseia-se no sistema de expressão clássico de *E. coli*, com o grupo de promotores do fago lambda, regulados pelo repressor *cI* (Sussman & Jacob, 1962). O isolamento de uma variante termossensível desse repressor, *cI857*, permitiu o desenvolvimento de sistemas de expressão regulados pela temperatura: com o aumento da temperatura, o repressor é inativado e fica, portanto, liberada a expressão a partir dos promotores *l_pR* e *l_pL*. Contudo, o problema deste sistema seria o limite de indução vinculado a uma faixa de temperatura que não pode ultrapasar.

4

por os 40°C. Recentemente, foi também descrita a indução de genes por baixas temperaturas (Goldstein *et al.*, 1990; Jones *et al.*, 1987; Willimsky *et al.*, 1992), abrindo a possibilidade de empregar tais promotores associados a genes suicidas.

A regulação da expressão de genes bacterianos envolvidos na degradação de compostos aromáticos, que não são encontrados intracelularmente, vem também sendo explorada para a construção de sistemas suicidas (Contreras *et al.*, 1991; Duque *et al.*, 1992). Um grande número de compostos xenobióticos vem sendo introduzido no ambiente nos últimos anos, alguns dos quais são facilmente degradados por microrganismos, enquanto outros são recalcitrantes, constituindo ameaça para a preservação ambiental. A engenharia genética de rotas catabólicas mostrou-se uma eficiente tecnologia para acelerar, no laboratório, a evolução de rotas biológicas para a remoção de compostos recalcitrantes (Ramos & Timmis, 1987), e estão portanto sendo produzidos GEMs especialmente programados para a liberação no meio-ambiente. Entretanto, é desejável que tais GEMs possam ser inativados, depois de terem cumprido o seu papel despoluidor.

A família dos genes *TOL*, encontrados em *Pseudomonas putida*, é induzida pela presença de baixas quantidades de substrato (toluenos e benzoatos). A transcrição desses genes está sob o controle do promotor p_m e é dependente do substrato e da proteína reguladora XylS. A proteína XylS não tem atividade na ausência do substrato, mas, na sua presença, é ativada e estimula a transcrição de genes sob o controle do promotor p_m , a qual continua até que se esgote o substrato (Inouye *et al.*, 1983; Mermoud *et al.*, 1984; Ramos *et al.*, 1990). Tirando proveito do mecanismo, foram estabelecidos sistemas suicidas para bactérias especialmente construídas para a degradação de compostos xenobióticos. Um repressor que age sobre o promotor do gene assassino *geffoi* clonado sob o controle do promotor p_m . Assim, o repressor é sintetizado e o gene assassino não se exprime até que a bactéria consiga mineralizar o composto aromático em questão (Contreras *et al.*, 1991; Duque *et al.*, 1992).

MECANISMO DE CONTROLE POR ESTRESSE

Os mecanismos de regulação da expressão de genes envolvidos na resposta celular a condições de estresse têm sido muito estudados nos

últimos anos. No laboratório, a bactéria encontra condições ótimas para a sua sobrevivência, principalmente quando usados meios de cultura ricos, onde não há fatores limitantes. Entretanto, no ambiente, além das flutuações de disponibilidade de nutrientes, ocorrem constantes variações de outros parâmetros, tais como temperatura, pressão osmótica, PH e presença de compostos tóxicos, entre outros.

Os microrganismos, de maneira geral, desenvolveram respostas adaptativas a essas condições extremamente desfavoráveis, que incluem mudança de morfologia, esporulação, resistência a vários fatores etc., através da ativação de genes específicos. Estudos sobre os diferentes mecanismos de resposta ao estresse têm sido extensamente desenvolvidos, principalmente em *E. coli* (Matin, 1990; Matin *et al.*, 1989), *Salmonella typhimurium* (Spector, 1990) e *Vibrio* spp. (Nystrom *et al.*, 1990). A estratégia emergente destes estudos seria a fusão de promotores de genes de estresse aos genes suicidas. Entre os genes envolvidos no processo de resposta ao estresse, estão aqueles relacionados à carência de nutrientes. Uma vez que no ambiente esta é a condição mais comumente encontrada, como também facilmente reproduzida no laboratório (Molin *et al.*, 1993), a indução da expressão de genes assassinos, em resposta à carência nutricional, vem merecendo especial atenção.

MECANISMO DE ATIVAÇÃO RECOMBINACIONAL

Trata-se de sistemas suicidas baseados na resolvase do plasmídeo RP4, uma recombinase sítio-específica, cuja função normal é a de separar multímeros de moléculas de plasmídeos, através de recombinação ao nível de uma seqüência de DNA conhecida como sítio *res*. Esses sistemas apresentam a vantagem de ser funcionais para um largo espectro de bactérias (Gerlitz *et al.*, 1990). Para o estabelecimento do sistema-suicida utilizam-se dois sítios *res*, que são inseridos um de cada lado, de um fragmento de DNA contendo um gene marcador (geralmente de resistência a antibiótico) e de um terminador de transcrição. Além disso, posiciona-se um promotor forte a montante do primeiro sítio *res* e um gene suicida sem promotor a jusante do segundo sítio *res*. Nesta situação, quando ocorrer recombinação através da ação da resolvase, a porção de DNA contida entre os dois sítios *res* será excisada, de tal modo que o plasmídeo perderá o marcador de seleção e o terminador de transcrição, deixando justapostos o promotor e o gene suici-

a. Conseqüentemente, haverá expressão do gene suicida, o que levará à morte da célula hospedeira. Como o fator limitante do sistema é a resolvase, o controle sobre o suicídio deve ser exercido ao nível do gene da resolvase: substitui-se o promotor natural do gene da resolvase por um promotor que possa ser ativado no meio-ambiente.

MECANISMO DE CONTROLE "TEMPO-DEPENDENTE"

Em certos casos, é mais interessante empregar para a indução do gene assassino um sistema que dependa do tempo e não de algum sinal físico ou químico. A indução do gene consiste num modo de controle mais relevante para a população do que para a célula individual. Um exemplo desse tipo de sistema faz uso do promotor invertível, que é responsável pelo fenômeno de variação de fase das fímbrias de tipo 1 de *E. coli*. O fenômeno de variação de fase consiste na alternância, ao longo do tempo, entre células dotadas ou não de fímbrias e resulta da inversão da seqüência do DNA que contém o promotor do gene *fim*, responsável pela formação da fímbria. O promotor *fim* Ap inverte sua orientação numa freqüência de aproximadamente $2 \cdot 10^{-3}$ /célula/hora (Eisenstein, 1981). Como tais eventos recombinacionais ocorrem independentemente da taxa de crescimento, uma população estacionária pode ser gradualmente afetada, a uma taxa que dependerá apenas da freqüência de recombinação. Foram, portanto, realizadas construções moleculares em que o gene assassino *gef* foi colocado sob o comando do promotor *fim* Ap. Células de *E. coli* portadoras desse tipo de construção, seja em plasmídeos, seja integrada em cópia única no cromossomo, vão morrendo ao longo do tempo, atingindo níveis muito baixos de sobrevivência, após um período de 14 dias (Klemm *et al.*, 1995). É interessante notar que a inativação celular só fica aparente em células em fase estacionária; em culturas logarítmicas, não se detectou efeito do sistema suicida sobre a taxa de crescimento, o que sugere que a taxa de morte é insignificante em relação à taxa de crescimento (Klemm *et al.*, 1995). Esse aspecto é muito importante, uma vez que, no meio-ambiente, é comum as células se encontrarem num estado estacionário ou de dormência. Por outro lado, no processo industrial, que exige pleno vigor de crescimento das células, o sistema suicida não se fará sentir. A principal limitação do sistema reside no seu estreito espectro de ação: o fenômeno de variação de fase só é conhecido para poucas

espécies bacterianas e, até agora, só se mostrou útil para o estabelecimento de um sistema suicida para *E. coli*.

PRINCIPAIS PROBLEMAS RELACIONADOS AOS SISTEMAS SUICIDAS

Dentre os fatores que limitam a eficiência dos diferentes sistemas suicidas, destacam-se o aparecimento de mutações que tornam a célula insensível ao gene assassino e a seleção na população das células com tal fenótipo. Essa seleção será tanto mais eficiente se houver expressão basal do gene assassino, o que vai acarretar uma taxa de crescimento reduzida das células com o sistema intacto em relação às células com o sistema mutado, conferindo a estas últimas uma clara vantagem seletiva. Assim, em pouco tempo irão predominar na população as células resistentes. Com efeito, a maior dificuldade que tem sido encontrada para o estabelecimento dos sistemas suicidas é a alta proporção de células sobreviventes, que ainda permanece após a indução do gene da morte, cerca de 10^{-6} a 10^{-3} , segundo o sistema (Knudsen *et al.*, 1995).

O fenótipo "sobrevivente" pode resultar principalmente de mutações no próprio gene suicida, no seu promotor ou ainda em outros genes que inativem a função destes. Também pode decorrer de mutações que afetem outras partes da célula, tornando-a resistente à ação do gene suicida. Mutantes resistentes às Gef's foram identificados, porém esse fenótipo de resistência requer ao menos duas mutações, tornando-o de difícil ocorrência (Poulsen *et al.*, 1992). O emprego de nucleases como genes assassinos apresenta, diferentemente das Gef's, a vantagem de que o alvo não pode ser modificado. Quando as mutações ocorrem no próprio gene suicida, transferindo-se o plasmídeo para outra célula, pode-se facilmente identificar o problema. Este tem sido o tipo de mutação mais freqüentemente encontrado nos sobreviventes dos sistemas-suicidas, com taxa de aproximadamente 10^{-6} /célula/geração, no caso dos genes *gef* (Knudsen & Karlstrom, 1991). Isso pode constituir problema sério na produção em larga escala (fermentadores industriais e aplicações de campo), onde o número de células resistentes aumentará rapidamente.

No sistema desenvolvido por Ahrenholtz *et al.* (1994), usando a nuclease de *S. marcescens*, verificou-se que o fenótipo da resistência foi, na maioria das vezes, decorrente de mutações no gene repressor *cl857*.

vertendo a sensibilidade à temperatura. Uma maneira interessante de contornar o efeito das mutações consiste em se duplicar o sistema suicida no organismo, usando dois sistemas idênticos ou mesmo sistemas diferentes. A estratégia foi recentemente desenvolvida por Knudsen *et al.* (1995), empregando o gene assassino *rel F* de *E. coli*. A função suicida foi inserida em duplicata num plasmídeo, em arranjo que impedissem a inativação por deleção, recombinação ou inativação insercional, tendo sido verificada uma taxa de inativação da função suicida de menos de 10^{-10} /célula/geração.

SISTEMAS SUICIDAS EM LEVEDURAS

O uso da levedura *Saccharomyces cerevisiae* como um modelo para células eucarióticas tem sido extremamente importante na identificação das vias envolvidas nos processos celulares básicos. Entretanto, embora tal levedura venha sendo também extensivamente manipulada para produção de proteínas de importância médica, industrial e científica (Romanos *et al.*, 1992), ainda não foram desenvolvidos sistemas suicidas para esse microrganismo. Estudos procurando compreender como as leveduras se comportam no meio-ambiente demonstraram que esses organismos, quando geneticamente manipulados, não apresentam nenhuma desvantagem quanto à sobrevivência em relação às linhagens selvagens. Fujimura *et al.* (1994) analisaram a sobrevivência de leveduras geneticamente manipuladas, expressando o fator XIIIa de coagulação em humanos e células sem o plasmídeo, e não encontraram diferenças significativas, demonstrando que a ausência do plasmídeo não confere vantagem seletiva para as células de levedura no ambiente.

Linhagens recombinantes de leveduras são preferencialmente utilizadas para a produção de proteínas heterólogas com aplicações terapêuticas em humanos. Diferentemente dos microrganismos procariotos, como *E. coli*, as leveduras são capazes de expressar proteínas de origem animal com a conformação correta, além de realizar modificações pós-traducionais, muitas vezes indispensáveis à atividade biológica (Valenzuela, 1987). Alguns estudos sobre a expressão de genes heterólogos por leveduras foram desenvolvidos com o intuito de determinar a capacidade destes organismos geneticamente manipulados, desenhados para produzir compostos de relevância industrial, de consegui-

rem expressá-los no solo (Tebbe *et al.*, 1995), trazendo riscos à população devido à introdução de fenótipos alterados no ambiente. Apesar dos resultados evidenciarem queda na taxa de sobrevivência das leveduras em duas semanas, também foi verificada a ocorrência de plasmídeos segregantes ao fim do período, evidenciando a importância do desenvolvimento de sistemas suicidas para esses microrganismos.

Muitas proteínas tóxicas para células eucarióticas, com ação específica para determinadas estruturas ou organelas celulares foram descritas. Proposta interessante seria o desenvolvimento de um sistema suicida para leveduras, baseado na interferência e debilitação da síntese protéica, levando à morte celular. Uma família de toxinas de plantas, extensamente estudada e usada como suicida para células do sistema nervoso (Contestabile & Stirpe, 1993; Pangalos *et al.*, 1991; Roberts *et al.*, 1993), consiste nas proteínas conhecidas como RIPs (*ribosome inactivating proteins*), capazes de danificar ribossomos de eucariotos (Frankel *et al.*, 1990; Stirpe *et al.*, 1992). A maioria delas apresenta-se em forma de cadeia simples (RIPs do tipo I) ou cadeias duplas ligadas covalentemente (RIPs do tipo II).

As RIPs do tipo II estão entre as mais potentes toxinas conhecidas. Por estimativa, acredita-se que apenas uma molécula presente no citoplasma seja suficiente para levar a célula à morte (Eiklid *et al.*, 1980). Dessas proteínas, somente seis são conhecidas, sendo a mais estudada a ricina. Esta é uma proteína heterodimérica encontrada em sementes de mamona (*Ricinus communis*), que apresenta a cadeia A (RTA), ligada à cadeia B (RTB) através de uma ponte dissulfídica (Olsnes & Pihl, 1982). A ligação da cadeia B a resíduos de galactose expostos nas superfícies das células de mamíferos permite a internalização da ricina, liberando a cadeia A no citoplasma, onde ocorre a inibição da síntese protéica (Olsnes & Sandvig, 1988), através da remoção de um resíduo de adenina, localizado em seqüências altamente conservadas, próximas ao final 3' das subunidades 28S e 26S do rRNA (Endo *et al.*, 1987). A maioria dos ribossomos de eucariotos é susceptível à atividade de N-glicosidase da RTA, embora ribossomos de diferentes espécies apresentem graus de sensibilidade variáveis (Stirpe & Hughes, 1989).

Gould *et al.* (1991) demonstraram que transformantes de leveduras, induzidos a expressar a RTA, podem produzir toxinas altamente efetivas contra seus próprios ribossomos, levando à parada imediata do crescimento celular e subsequente à morte. Entretanto, encon-

am-se com certa freqüência mutantes resistentes à ação de toxinas que agem ao nível da síntese protéica. Outra estratégia bastante interessante foi adotada por Saxena *et al.* (1991), usando RNAses como citotoxinas e comparando a atividade destas com as RIPs α -sarcina e ricina. Os resultados demonstraram que α -sarcina e ricina são mais efetivas em abolir a síntese protéica do que as RNAses A e B, o que poderia ser explicado pela presença de inibidores de RNA espécie-específicos, além das RNAses poderem sofrer mais rapidamente efeitos de degradação da maquinaria celular do que a ricina e a α -sarcina. A estratégia emergente desses estudos seria a clonagem da cadeia A da ricina ou de outra RIP do tipo II, sob o controle de um promotor regulável de levedura.

Um segundo caminho para a construção de sistemas suicidas para leveduras consistiria na degradação do material genético por nucleases, como já foi demonstrado para bactérias. Porém, no caso das células eucarióticas, em que o material genético encontra-se compartimentado no núcleo, estratégias de sistemas suicidas, que envolvam a destruição do DNA, devem garantir que o produto tóxico seja transportado para o interior do núcleo.

O transporte nuclear é um processo ativo, que opera através dos poros nucleares, e é dependente do reconhecimento de sinais específicos pela maquinaria de importação. Seqüências de aminoácidos, denominadas "sinais de localização nuclear" (NLS), foram encontradas em vários sistemas eucarióticos e se mostraram capazes de direcionar proteínas heterólogas para dentro do núcleo de eucariotos superiores (Dingwall & Laskey, 1986; Newport & Forbes, 1987; Silver & Hall, 1988) em *Saccharomyces cerevisiae* (Silver *et al.*, 1984; Silver *et al.*, 1988). O NLS mais bem estudado é um oligopeptídeo de sete aminoácidos, capaz de dirigir um número de proteínas citoplasmáticas para o núcleo, quando fundido a estas, através das técnicas de engenharia genética, seguida pela expressão *in vivo* (Kalderon *et al.*, 1984, 1984b). Benton *et al.* (1990) utilizaram com absoluto sucesso esse NLS para dirigir a RNA polimerase do bacteriófago T7 ao núcleo de *Saccharomyces cerevisiae*.

Entretanto, Barnes e Rine (1985), estudando a expressão da endonuclease *EcoRI* na levedura, demonstraram ser essa enzima capaz de entrar no núcleo de *Saccharomyces cerevisiae* sem necessidade de uma seqüência NLS, quando esta proteína procariótica é sintetizada *in vivo* a partir do gene bacteriano clonado na levedura. Para o experimento, a seqüência de DNA codificadora da endonuclease foi clonada sob o

controle do promotor de levedura *GAL1*. Este promotor foi ideal, porque a transcrição só ocorre após indução com galactose, além de ser reprimida por glicose. Após a adição de galactose, a célula de levedura produziu a endonuclease, que foi capaz de entrar no núcleo e matar a célula. Empregando-se como hospedeira uma linhagem portadora da mutação *rad52*, que é deficiente na reparação de quebras da dupla fita do DNA, observou-se um efeito letal ainda mais pronunciado após a expressão da *EcoRI*. Uma das possíveis explicações para a entrada da *EcoRI* no núcleo da levedura hospedeira sem o NLS seria seu reduzido tamanho (62 kDa), que possibilitaria a sua difusão através dos poros da carioteca, permissíveis para proteínas de até 50-60 kDa. Assim, é de se esperar que a nuclease de *S. marcescens* expressa numa levedura consiga entrar no núcleo, pois tem apenas 28,9 kDa (Ball *et al.*, 1987).

Para a construção de sistemas suicidas para levedura baseados na degradação do material genético, duas estratégias diferentes podem, portanto, ser propostas. Em ambas, promotores fortes e facilmente reprimidos deveriam dirigir a síntese das nucleases: a) com a seqüência de localização nuclear de levedura, NLS; b) sem esta seqüência (Fig. 2). No primeiro caso, a enzima chegaria ao núcleo logo após a sua expressão e degradaria o material genético ali presente. Mesmo que não atingisse o núcleo, por ausência da seqüência NLS, uma nuclease como a de *Serratia marcescens*, que degrada também RNA de maneira inespecífica, permanecendo no citoplasma, degradaria RNAs mensageiros, afetando de forma geral a síntese de proteínas, devendo, em conseqüência, levar à morte da célula.

Como visto para outros organismos, fica evidente que os sistemas suicidas para levedura também podem apresentar problemas com relação ao uso de promotores, expressão basal ou altas taxas de sobreviventes, após a indução da morte. Mas será preciso aceitar o desafio, uma vez que as leveduras se tornaram hoje em dia um microrganismo de escolha para a expressão de genes heterólogos em fermentações industriais. Além disto, foi recentemente descrito que duas linhagens recombinantes das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Hansenula polymorpha*, quando inoculadas no solo, continuam viáveis e capazes de produzir a proteína heteróloga de mamífero durante 10 dias. É interessante notar que nenhuma dessas duas espécies de levedura pertence à microflora normal dos solos. Seu habitat natural é em flores ou superfície de frutos, onde há altas concentrações de carboidratos. De

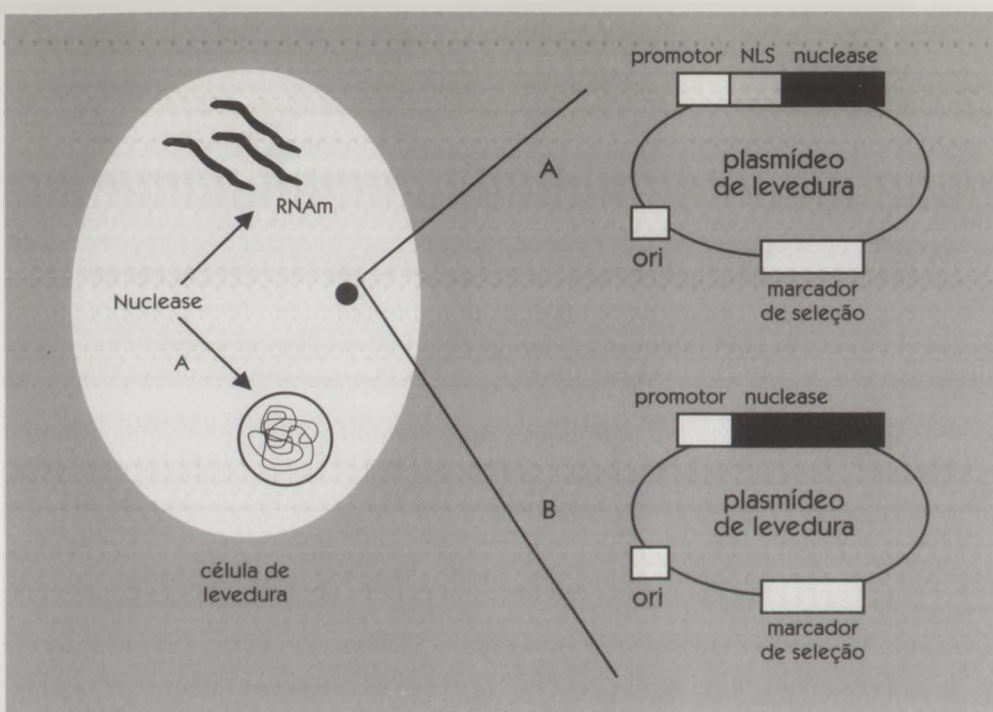


FIGURA 2. Estratégias de clonagem de uma nuclease com a finalidade de se construir um sistema suicida. A – nuclease com a seqüência NLS de levedura que deverá ser ativa no núcleo, B – nuclease sem a seqüência NLS, permanece no citoplasma e degrada RNAs.

fato, essas linhagens recombinantes não persistiram nas amostras de solo analisadas. Não se pode, entretanto, excluir a possibilidade de as leveduras encontrarem no solo micronichos com melhores condições de sobrevivência (Tebbe *et al.*, 1995).

Outro fator agravante para a promiscuidade genética que poderia ocorrer na natureza entre GEMs reside na possibilidade de conjugação direta entre organismos filogeneticamente tão distantes quanto bactérias e leveduras, descrita há alguns anos por Heinemann & Sprague (1989). Esses autores demonstraram que células de *E. coli* portadoras de um plasmídeo conjugativo são capazes de transferir em alta frequência esse plasmídeo para células de *S. cerevisiae*. O processo é tão eficiente que foi proposto como método alternativo para a transformação genética da levedura em laboratório (Heinemann & Sprague, 1991).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHRENHOLTZ, I.; LORENZ, M.G.; WACKERNAGEL, W. A Conditional Suicide-System in *Escherichia coli* Based on the Intracellular Degradation of DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.3746-3751, 1994.
- AUSTIN, H.K.; HARTEL, P.G.; COLEMAN, D.C. Effect of Genetically-Altered *Pseudomonas solanacearum* on Predatory Protozoa. **Soil Biology and Biochemistry**, v.22, p.215-217, 1990.
- AVERY, O.T.; MACLEOD, C.M.; McCARTY, M. Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation in Pneumococcal Types. **Journal of Experimental Medicine**, v.79, p.137-159, 1944.
- BALL, T.K.; SAURUGGER, P.N.; BENEDIK, M.J. The Extracellular Nuclease Gene of *Serratia marcescens* and its Secretion from *Escherichia coli*. **Gene**, v.57, p.183-192, 1987.
- BALL, T.K.; SUH, Y.; BENEDIK, M.J. Disulfide Bonds are Required for *Serratia marcescens* Nuclease Activity. **Nucleic Acids Research**, v.20, p.4971-4974, 1992.
- BARNES, G.; RINE, J. Regulated Expression of Endonuclease *EcoRI* in *Saccharomyces cerevisiae*. Nuclear Entry and Biological Consequences. Proceedings. **National Academy of Sciences, USA**, v.82, p.1354-1358, 1985.
- BECH, F.W.; JORGENSEN, S.T.; DIDERICHSEN, B.; KARLSTROM, O. Sequence of the *relB* Transcription Unit from *Escherichia coli* and Identification of the *relB* Gene. **EMBO Journal**, v.4, p.1059-1066, 1985.
- BEJ, A.K.; PERLIN, M.H.; ATLAS, R.M. Model Suicide Vector for Containment of Genetically Engineered Microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.2472-2477, 1988.
- BENTON, B.M.; ENG, W.K.; DUNN, J.J.; STUDIER, W.; STERNGLANZ, R.; FISHER, P.A. Signal-Mediated Import of Bacteriophage T7 RNA Polymerase into the *Saccharomyces cerevisiae* Nucleus and Specific Transcription of Target Genes. **Molecular and Cellular Biology**, v.10, p.353-360, 1990.
- BERG, P.; BALTIMORE, D.; BRENNER, S.; ROBLIN III, R.O.; SINGER, M.F. Asilomar Conference on Recombinant DNA Molecules. **Science**, v.188, p.991-994, 1975.
- CONTESTABLE, A.; STIRPE, F. Ribosome-Inactivating Proteins from Plants as Agents for Suicide Transport and Immunolesioning in the Nervous System. **European Journal of Neuroscience**, v.5, p.1292-1301, 1993.
- CONTRERAS, A.; MOLIN, S.; RAMOS, J.L. Conditional-Suicide Containment System for Bacteria which Mineralize Aromatics. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p.1504-1508, 1991.
- CURTISS, R.; INOUE, R.M.; PEREIRA, D.; HSU, J.C.; ALEXANDER, L.; ROCK, L. Construction and Use of Safer Bacterial Host Strains for Recombinant DNA Research. In: SCOTT, W.A.; WERNER, R., ed. **Molecular Cloning of Recombinant DNA**. New York: Academic Press, 1977. p.99-111.
- DAVIS, A.; MOORE, B.I.; PARKER, D.S.; TANIUSHI, H. A Possible Precursor of Nuclease A, an Extracellular Nuclease of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biological Chemistry**, v.18, p.6544-6553, 1977.
- DE FLAUN, M.F.; PAUL, J.H. Detection of Exogenous Gene Sequences in Dissolved DNA from Aquatics Environments. **Microbial Ecology**, v.18, p.21-28, 1989.
- DINGWALL, C.; LASKEY, R.A. Protein Import into the Cell Nucleus. **Annual Review of Cellular Biology**, v.2, p.367-390, 1986.
- DOYLE, J.D.; SHORT, K.A.; STOTSKY, G.; KING, R.J.; SEIDLER, R.; OLSEN, R.H. Ecologically Significant Effect of *Pseudomonas putida* PPO301 (pRO103), Genetically-Engineered to Degrade 2,4-dichlorophenoxy-acetate, on Microbiol Populations and Processes in Soil. **Canadian Journal of Microbiology**, v.37, p.682-691, 1991.
- DUQUE, E.; RAMOS-GONZALEZ, M.I.; DELGADO, A.; CONTRERAS, A.; MOLIN, S. Genetically Engineered *Pseudomonas* Strains for Mineralization of Aromatics: Survival, Performance, Gene Transfer, and Biological Containment. In: GALLI, E.S.; SILVER, S.; WITHOLD, B., ed. **Pseudomonas** Molecular Biology and Biotechnology. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1992. v.429-437.
- EIKLID, K.; OLSNES, S.; PHIL, A. Entry of Lethal Doses of Abrin, Ricin and Modeccin into the Cytosol of HeLa Cells. **Experimental Cell Research**, v.126, p.321-326, 1980.
- EISENSTEIN, B.I. Phase Variation of Type 1 Fimbriae in *Escherichia coli* is Under Transcriptional Control. **Science**, v.214, p.337-338, 1981.
- ENDO, Y.; MITSUI, K.; MOTIZUKI, M.; TSURUGI, K. The Mechanism of Action of Ricin and Related Toxic Lectins on Eucaryotic Ribosomes. **The Journal of Biological Chemistry**, v.262, p.5908-5912, 1987.

- FIBI, M.R.; BROKER, M.; SCHULZ, R.; JOHANNSEN, R.; ZETTLMEISSEL. Inactivation of Recombinant Plasmid DNA from Human Erythropoietin-Producing Mouse Cell Line Grown on a Large Scale. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.35, p.622-630, 1991.
- FRANKEL, A.; WELSH, P.; RICHARDSON, J.; ROBERTUS, J.D. Role of Arginine 180 and Glutamic Acid 177 of Ricin Toxin A Chain in Enzymatic Inactivation of Ribosomes. **Molecular and Cellular Biology**. v.10, p.6257-6263, 1990.
- FUJIMURA, H.; SAKUMA, Y.; AMANN, E. Survival of Genetically-Engineered and Wild-Type Strains of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Under Simulated Environmental Conditions: a Contribution on Risk Assessment. **Journal of Applied Bacteriology**. v.77, p.689-693, 1994.
- GERDES, K.; LARSEN, J.E.L.; MOLIN, S. Stable Inheritance of Plasmid R1 Requires Two Different Loci. **Journal of Bacteriology**. v.161, p.292-298, 1985.
- GERDES, K.; BECH, F.W.; JORGENSEN, S.T.; LOBNER-OLESEN, A.; RASMUSSEN, P.B. *et al.* Mechanism of Postsegregational Killing by the *bok* Gene Product of the *parB* System of Plasmid R1 and its Homology with the *relF* Gene Product of the *E. coli relB* Operon. **EMBO Journal**. v.5, p.2023-2029, 1986a.
- GERDES, K.; HELIN, K.; CHRISTENSEN, O.W.; LOBNER-OLESEN, A. Translational Control and Differential RNA Decay are Key Elements Regulating Postsegregational Expression of the Killer Protein Encoded by the *parB* Locus of Plasmid R1. **Journal of Molecular Biology**. v.203, p.119-129, 1988.
- GERDES, K.; THISTED, T.; MARTINUSSEN, J. Mechanism of Post-segregational Killing by the *hok/sok* System of Plasmid R1: The *sok* Anti-sense RNA Regulates the Formation of a *bok* mRNA Species Correlated with Killing of Plasmid-free Cells. **Molecular Microbiology**. v.4, p.1807-1818, 1990a.
- GERDES, K.; POULSEN, L.K.; THISTED, T.; NIELSEN, A.K.; MARTINUSSEN, J.; ANDREASEN, P.H. The *bok* Killer Gene Family in Gram-negative Bacteria. **New Biology**. v.2, p.946-956, 1990b.
- GERLITZ, M.; HRABAK, O.; SCHWAB, H. Partitioning of Broad Host-Range Plasmid RP4 is a Complex System Involving Site-Specific Recombination. **Journal of Bacteriology**. v.172, p.6194-6203, 1990.
- GOLDSTEIN, J.; POLLITT, N.S.; INOUE, M. Major Cold Shock Protein of *Escherichia coli*. **Proceedings National Academy of Sciences**. USA, v.87, p.283-287, 1990.
- GOULD, J.H.; HARTLEY, M.R.; WELSH, P.C.; HOSHIZAKI, D.K.; FRANKEL, A.; ROBERTS, L.M.; LORD, J.M. Alteration of an Amino Acid Residue Outside the Active Site of the Ricin A Chain Reduces its Toxicity Towards Yeast Ribosomes. **Molecular and General Genetics**. v.230, p.81-90, 1991.
- HEINEMANN, J.A.; SPRAGUE JR., G.F. Bacterial Conjugative Plasmids Mobilize DNA Transfer Between Bacteria and Yeast. **Nature**. v.340, p.205-209, 1989.
- HEINEMANN, J.A.; SPRAGUE JR., G.F. Transmission of Plasmid DNA to Yeast by Conjugation with Bacteria. **Methods in Enzymology**. v.194, p.187-195, 1991.
- INOUE, M.; NAKAZAWA, S.A.; NAKAZAWA, T. Molecular Cloning of the *xyIS* Gene of the TOL Plasmid: Evidence for Positive Regulation of the *xyIDEGF* Operon by *xyIS*. **Journal of Bacteriology**. v.148, p.413-418, 1983.
- JONES, P.G.; VAN BOGELEN, R.A.; NEIDHARDT, F.C. Induction of Proteins in Response to Low Temperature in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**. v.169, p.2092-2095, 1987.
- KALDERON, D.; RICHARDSON, W.D.; MARKHAN, A.F.; SMITH, A.E. Sequence Requirements for Nuclear Location of Simian Virus 40 large-T antigen. **Nature**. v.311, p.499-509, 1984a.
- KALDERON, D.; ROBERTS, B.L.; RICHARDSON, W.D.; SMITH, A.E. A Short Amino Acid Sequence Able to Specify Nuclear Localization. **Cell**. v.39, p.499-509, 1984b.
- KLEMM, P.; JENSEN, L.B.; MOLIN, S. A Stochastic Killing System for Biological Containment of *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**. v.61, p.481-486, 1995.
- KNUDSEN, S.M.; KARLSTROM, O.H. Development of Efficient Suicide Mechanisms for Biological Containment of Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. v.57, p.85-92, 1991.
- KNUDSEN, S.M.; SAADBYE, P.; HANSEN, L.H.; COLLIER, A.; JACOBSEN, B.L.; SCHLUNDT, J.; KARLSTROM, O.H. Development and Testing of Improved Suicide Functions for Biological Containment of Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. v.61, p.985-991, 1995.
- LORENZ, M.G. Gene Transfer via Transformation in Soil/Sediments Environments. In: GAUTHIER, M.J., ed. **Gene Transfer and Environment**. Berlin:Springer-Verlag, 1992. p.95-101.
- LORENZ, M.G.; WACKERNAGEL, W. Bacterial Gene Transfer in the Environment. In: WOHRMANN, W.; TOMIUK, J., ed. **Transgenic Organisms: Risk Assessment of Deliberate Releases**. Basel: Birkhauser, 1993. p.43-64.

- LORENZ, M.G.; WACKERNAGEL, W. Bacterial Gene Transfer by Natural Genetic Transformation in the Environment. **Microbiological Reviews**, v.58, p.563-602, 1994.
- MAEDA, M.; TAGA, N. Occurrence and Distribution of Deoxyribonucleic Acid-Hydrolyzing Bacteria in Sea Water. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.14, p.157-169, 1974.
- MARIANI, C.; DE BEUCKELEER, M.; TRUETTNER, J.; LEEMANS, J.; GOLDBERG, R.B. Induction of Male Sterility in Plants by a Chimaeric Ribonuclease Gene. **Nature**, v.347, p.737-741, 1990.
- MATTIN, A. Molecular Analysis of the Starvation Stress in *Escherichia coli*. **Microbial Ecology**, v.74, p.185-196, 1990.
- MATTIN, A.; AUGER, E.A.; BLUM, P.; SCHULTZ, J.E. Genetic Basis of Starvation Survival in Nondifferentiating Bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v.43, p.293-316, 1989.
- MERMOD, N.; LEHRBACH, P.R.; REINEKE, W.; TIMMIS, K.N. Transcription of the TOL Plasmid Toluene Catabolic Pathway Operon of *Pseudomonas putida* is Determined by a Pair of Coordinately and Positively Regulated Overlapping Promoters. **EMBO Journal**, v.3, p.2461-2466, 1984.
- MOLIN, S.; KLEMM, P.; POULSEN, L.K.; BIEHL, H.; GERDES, K.; ANDERSSON, P. Conditional Suicide System for Containment of Bacteria and Plasmids. **Bio/Technology**, v.5, p.1315-1318, 1987.
- MOLIN, S.; BOE, L.; JENSEN, L.B.; KRISTENSEN, C.S.; GIVSKOV, M. Suicidal Genetics Elements and Their Use in the Biological Containment of Bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v.47, p.139-166, 1993.
- MOLIN, S.; KLEMM, P.; POULSEN, L.K.; BIEHL, H.; GERDES, K.; ANDERSSON, P. Biological Containment of Bacteria and Plasmids to be Released to the Environment. In: KLINGMULLER, W., ed. **Risk Assessment for Deliberate Releases**. Berlin: Springer-Verlag, 1988. p.127-136.
- NEWPORT, J.; FORBES, D.J. The Nucleus: Structure, Function and Dynamics. **Annual Reviews of Biochemistry**, v.56, p.535-565, 1987.
- NYSTROM, T.; ALBERTSON, N.H.; FLARDH, K.; KJELLEBERG, S. Physiological and Molecular Adaptation to Starvation and Recovery from Starvation by the Marine *Vibrio*. **Microbial Ecology**, v.74, p.129-140, 1990.
- NOVITZKY, J.A. Degradation of Dead Microbial Biomass in a Marine Sediment. **Applied and Environmental Microbiology**, v.52, p.504-509, 1986.
- OLSNES, S.; PIHL, A. Toxic Lectins and Related Proteins. In: COHEN, P.; van HEYNINGEN, S., ed. **The Molecular Action of Toxins and Viruses**. Amsterdam: Elsevier/Biomedical Press, 1982. p.51-105.
- OLSNES, S.; SANDVIG, K. How Protein Toxins Enter and Kill Cells. In: FRANKEL, A.E., ed. **Immunotoxins**. Norwell: Kluwer Academic Pub., 1988. p.39-74.
- ONO, K.; AKIMOTO, S.; OHNISHI, Y. Nucleotide Sequence of the *pwd* Gene in Plasmid R483 and Role of the *pwd* Gene Product in Plasmolysis. **Microbiology and Immunology**, v.31, p.1071-1083, 1987.
- PANGALOS, M.N.; FRANCIS, P.T.; PEARSON, R.C.A.; MIDDLEMISS, D. N.; BOWEN, D.M. Destruction of a Sub-Population of Cortical Neurones by Suicide Transport of Volkensin, a Lectin from *Adenia volkensii*. **Journal of Neuroscience Methods**, v.40, p.17-29, 1991.
- PAUL, J.H.; JEFFREY, W.H.; De FLAUN, M.F. Dynamics of Extracellular DNA in the Marine Environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, p.170-179, 1987.
- PAUL, J.H.; JEFFREY, W.H.; DAVID, A.W.; DE FLAUN, M.F.; CAZARES, L.H. Turnover of Extracellular DNA in Eutrophic and Oligotrophic Freshwater Environments of Southwest Florida. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, p.1823-1828, 1989.
- PHILLIPS, S.J.; DALGARN, D.S.; YOUNG, S.K. Recombinant DNA in Wastewater: pBR322 Degradation Kinetics. **Journal of Water Pollution Control Federation**, v.61, p.1588-1595, 1989.
- POULSEN, L.K.; LARSEN, N.W.; MOLIN, S.; ANDERSSON, P. A Family of Genes Encoding a Cell-Killing Function May be Conserved in All Gram-Negative Bacteria. **Molecular Microbiology**, v.3, p.1463-1472, 1989.
- POULSEN, L.K.; REFN, A.; MOLIN, S.; ANDERSSON, P. Topographic Analysis of the Toxic Gef Protein from *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v.5, p.1627-1637, 1991.
- POULSEN, L.K.; LARSEN, N.W.; MOLIN, S.; ANDERSSON, P. Analysis of an *Escherichia coli* Mutant Strain Resistant to the Cell-Killing Function Encoded by the *gef* Gene Family. **Molecular Microbiology**, v.6, p.895-905, 1992.
- RAMOS, J.L.; MICHÁN, C.; ROJO, F.; DWYER, D.; TIMMIS, K.N. Signal-Regulator Interactions. Genetic Analysis of the Effector Binding Site of *xyfS*, the Benzoate-Activated Positive Regulator of *Pseudomonas* TOL Plasmid Meta-Cleavage Pathway Operon. **Journal of Molecular Biology**, v.211, p.373-382, 1990.

- RAMOS, J.L.; TIMMIS, K.N. Experimental Evolution of Catabolic Pathways of Bacteria. **Microbiological Sciences**, v.4, p.228-237, 1987.
- ROBERTS, R.C.; HARRISON, M.B.; FRANCIS, S.M.N.; WILEY, R.G. Differential Effects of Suicide Transport Lesions of the Striatonigral or Striatopallidal Pathways on Subsets of Striatal Neurons. **Experimental Neurology**, v.124, p.242-252, 1993.
- ROMANOS, M.A.; SCORER, C.A.; CLARE, J.J. Foreign Gene Expression in Yeast: a review. **Yeast**, v.8, p.423-488, 1992.
- ROMANOWSKY, G.; LORENZ, M.G.; SAYLER, G.; WACKERNAGEL, W. Persistence of Free Plasmid DNA in Soil Monitored by Various Methods, Including a Transformation Assay. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.3012-3019, 1992.
- ROSZAK, D.B.; COLWELL, R.R. Survival Strategies of Bacteria in the Natural Environment. **Microbiological Reviews**, v.51, p.365-379, 1987.
- SAKIKAWA, T.; AKIMOTO, S.; OHNISHI, Y. The *pnd* Gene in *E. coli* Plasmid R16: Nucleotide Sequence and Gene Expression Leading to Cell Mg^{2+} Release and Stable RNA Degradation. **Biochimica and Biophysica Acta**, v.1007, p.158-166, 1989.
- SAXENA, S.K.; RYBAK, S.M.; WINKLER, G.; MEADE, H.M.; McGRAY, P.; YOULE, R.J.; ACKERMAN, E.J. Comparison of RNAses and Toxins Upon Injection into *Xenopus* Oocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v.266, p.21208-21214, 1991.
- SHORTLE, D. A Genetic System for Analysis of Staphylococcal Nuclease. **Gene**, v.22, p.181-189, 1983.
- SILVER, P.A.; HALL, M.N. Transport of Proteins into the Nucleus. In: DAS, R.C.; ROBBINS, P.W., ed. Protein Transfer and Organelle Biogenesis. New York: Academic Press, 1988. p.744-769.
- SILVER, P.; KEEGAN, L.; PTASHNE, M. Amino Terminus of the Yeast GAL4 Gene Product is Sufficient for Nuclear Localization. **Proceedings National Academy of Sciences**, USA, v.81, p.5951-5955, 1984.
- SPECTOR, M.P. Gene Expression in Response to Multiple Nutrient-Starvation Conditions in *Salmonella typhimurium*. **Microbial Ecology**, v.74, p.175-184, 1990.
- STEWART, G.J. The Mechanism of Natural Transformation. In: LEVY, S.B.; MILLER, R.V., ed. **Gene Transfer in the Environment**. New York: McGraw-Hill, 1989. p.139-164.
- STIRPE, F.; BARBIERI, L.; BATELLI, M.G.; SORIA, M.; LAPPI, D.A. Ribosome-Inactivating Proteins From Plants: Present Status and Future Prospects. **Bio/Technology**, v.10, p.405-412, 1992.
- STIRPE, F.; HUGHES, R.C. Specificity of Ribosome Inactivated by Proteins with RNA N-Glycosidase Activity. **Biochemistry**, v.262, p.1001-1002, 1989.
- STOTZKY, G. Gene Transfer Among Bacteria in Soil. In: LEVY, S.B.; MILLER, R.V., ed. **Gene Transfer in the Environment**. New York: McGraw-Hill, 1989. p.165-222.
- SUSSMAN, R.; JACOB, F. Sur un Système de Répression Thermosensible Chez le Bactériophage λ d'*Escherichia coli*. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v.254, p.1517, 1962.
- TEBBE, C.C.; WENDEROTH, D.F.; VAHJEN, W.; LUBKE, K.; MUNCH, J.C. Direct Detection of Recombinant Gene Expression by Two Genetically Engineered Yeasts in Soil on the Transcriptional and Translational Levels. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.4296-4303, 1995.
- TIEDJE, J.M.; COLWELL, R.R.; GROSSMAN, Y.L.; HODSON, R.E.; LENSKI, R.E.; MACK, R.N.; REGAL, P.J. The Planned Introduction of Genetically Engineered Microorganisms: Ecological Considerations and Recommendations. **Ecology**, New York, v.70, p.298-315, 1989.
- VALENZUELA, P. Synthesis and Secretion of Pharmaceutical Products by Yeast. **Biotech**, v.1, p.11-19, 1987.
- WANG, Z.; CRAWFORD, D.; PROMETTO III, A.L.; RAFFI, F. Survival and Effects of Wild-Type, Mutant, and Recombinant *Streptomyces* in a Soil Ecosystem. **Canadian Journal of Microbiology**, v.35, p.535-543, 1989.
- WILLIMSKY, G.; BANG, H.; FISCHER, G.; MARAHIEL, M.A. Characterization of *cspB*, a *Bacillus subtilis* Inducible Cold Shock Gene Affecting Cell Viability at Low Temperatures. **Journal of Bacteriology**, v.174, p.6326-6335, 1992.

EMBRAPA

AINFO / CNPMA



EMBRAPA 576.15 M528e
Autor: MELO, I.S. de et al., ed.
Título: ~~Ecologia microbiana. e.2~~
14.06.99 *Flora Funária*
03/08/99 *Resenha mais bonita*
A. M. Moreira



Impressão e Acabamento

HAMBURG
GRÁFICA
EDITORA

Rua Epitácio, 90 - V. Arapua
04257-170 - São Paulo - SP
Fone (011) 6946-0233
Telefax (011) 6948-1555
E-mail hamburg@uol.com.br

com filmes fornecidos pelo editor

Itamar Soares de Melo é engenheiro agrônomo, formado pela UFAL. Fez seu mestrado e doutorado na Universidade de São Paulo/ESALQ, na área de Genética da Resistência de Plantas a Doenças. Tem pós-doutorados pela Universidade de Londres/Birkbeck College e King's College na área de Biologia Molecular. É pesquisador científico da Embrapa Meio Ambiente e professor de cursos de pós-graduação na USP, UNESP (campi de Botucatu, Jaboticabal e Rio Claro) e UFSCar, nas áreas de Controle Biológico e Biodegradação de Pesticidas.

João Lúcio de Azevedo é engenheiro agrônomo, formado pela Universidade de São Paulo/ESALQ. Fez seu doutorado na USP, na área de Genética de Fungos e Ph.D. pela Universidade de Sheffield, Grã-Bretanha. Tem pós-doutorado pela Universidade de Manchester na área de Biologia Molecular. É professor de cursos de graduação ou pós-graduação na USP, UNICAMP, UFG, UFPr, UNESP, UFRJ, UFPe, UCS e UMC nas áreas de Genética de Microrganismos e Biotecnologia.



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental
Ministério da Agricultura e do Abastecimento

Este livro, escrito de maneira acessível a leitores sem muita experiência no vasto campo da ecologia microbiana, apresenta princípios básicos de ecologia entre microrganismos e plantas (bactérias diazotróficas, fungos micorrízicos), métodos clássicos (técnicas nucleares) e técnicas modernas de biologia molecular aplicadas à ecologia microbiana. Discorre também sobre biodiversidade, biossíntese de antibióticos peptídicos, microrganismos endofíticos, balanço de carbono na Amazônia, isolamento de actinomicetos, plasmídeos suicidas, rizobactérias promotoras de crescimento de plantas etc.

Ecologia Microbiana é uma obra que despertará interesse, principalmente dos estudantes universitários e secundaristas, carentes de textos dessa natureza em língua portuguesa.

Ministério da Agricultura e do Abastecimento

ISBN 85-85771-01-1



9 788585 771010