

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS A BROMÉLIAS DO PARQUE
ESTADUAL DE ITAPUÃ/RS

Tânia Simone da Costa Reginatto
Bióloga - UNISINOS

Porto Alegre
2008

Catálogo na Publicação
UFRGS/ICBS/Biblioteca Setorial

R335d Reginatto, Tânia Simone da Costa

Diversidade de bactérias associadas a bromélias do Parque Estadual de Itapuã/RS / Tânia Simone da Costa Reginatto. – 2008.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre, BR-RS, 2008.

Orientação: Prof^a Marisa da Costa

1. Bactérias. 2. Bromélias. 3. Parque Estadual de Itapuã (Viamão, RS)
I. Costa, Marisa da, orient. II. Título.

CDU 579.8(043)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS A BROMÉLIAS DO PARQUE
ESTADUAL DE ITAPUÃ/RS

Tânia Simone da Costa Reginatto
Bióloga - UNISINOS

Dissertação apresentada como requisito
para obtenção do grau de mestre
em Microbiologia Agrícola e do Ambiente
Orientador: Prof. Dra. Marisa da Costa

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
março, 2008.

AGRADECIMENTOS

À prof^a. Dra. Marisa da Costa por sua orientação, paciência e amizade constantes ao longo destes dois anos.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente à prof^a Dra. Gertrudes Corção e em especial à prof. Dra. Patrícia Valente por permitir participar de seu projeto no Parque Estadual de Itapuã e proporcionar as coletas das bromélias.

Aos colegas de curso e de laboratório Karen Campos, Claiton José Pens, Albino Magalhães Neto, Margaroni Fialho Oliveira, Sabrina Salamoni e Suelen Rabello pelo apoio, amizade e por todos os momentos de descontração que tornaram estes dois anos inesquecíveis.

À colega Melissa Fontes Landell pelo seu auxílio na identificação das espécies de bromélias e por sua companhia nas saídas de campo.

À minha família, em especial minha mãe, meu pai (*in memorian*), minha irmã e sobrinhos.

Ao meu esposo, Ticiano Reginatto, pelo seu constante incentivo e compreensão e minha amada filha, Mariana, por fazer todo esforço valer a pena.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, minha eterna gratidão.

À CAPES pelo apoio financeiro.

" Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas eu não teria saído do lugar.....

As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito." Francisco Cândido Xavier

DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS A BROMÉLIAS DO PARQUE ESTADUAL DE ITAPUÃ/RS

Autor: Tânia Simone da Costa Reginatto¹
Orientadora: Dra. Marisa da Costa

RESUMO

O Parque Estadual de Itapuã, RS, Brasil, é considerado um dos últimos refúgios da Mata Atlântica ainda preservados na região metropolitana de Porto Alegre, local escolhido para as coletas de bromélias. O objetivo deste trabalho foi realizar um levantamento da diversidade de bactérias, tanto endofíticas quanto daquelas presentes na água das cisternas de bromélias. Foram coletadas 38 amostras de folhas e 26 amostras de água das cisternas de sete espécies de bromélias em vários locais do Parque, no período de março de 2006 a maio de 2007. As amostras foram cultivadas após diluições seriadas em ágar para contagem. Os isolados foram identificados através da análise da morfologia colonial, celular, comportamento bioquímico e fisiológico. Das folhas foram isoladas 76 bactérias endofíticas e da água das cisternas 124 bactérias com predomínio dos gêneros *Bacillus*, *Burkholderia*, *Staphylococcus* e *Streptomyces*. As bactérias Gram positivas apresentaram um maior número de cepas produtoras de enzimas extracelulares comparadas às Gram negativas. As Gram positivas isoladas das folhas foram melhores produtoras de celulase, pectinase e lipase, enquanto que as isoladas da água de cisterna foram melhores produtoras para celulase, amilase e protease. Pôde se observar que a maioria das bactérias endofíticas isoladas das bromélias produz algum tipo de promotor de crescimento. Com exceção da fixação de nitrogênio, que foi detectada somente entre as bactérias Gram negativas, pode-se observar que a produção desses promotores está amplamente disseminada entre as bactérias endofíticas. A análise da biodiversidade foi realizada através do índice de Shannon-Weaver, onde foi encontrado nas folhas ($H=3,070$) e nas cisternas ($H=3,449$) evidenciando que as cisternas abrigam uma biodiversidade um pouco mais elevada em relação ao interior da planta.

¹ Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brasil. (80p) Março, 2008.

DIVERSITY OF BACTERIA ASSOCIATED TO THE BROMELIADS OF THE STATE PARK OF ITAPUÃ/RS

Author: Tânia Simone da Costa Reginatto²

Adviser: Dra. Marisa da Costa

ABSTRACT

The State Park of Itapuã, RS, Brazil, is considered one of the latest refuges of the Atlantic Forest still preserved in the metropolitan area of Porto Alegre, where seven bromeliads samples were collected. The objectives of this study were carry out a survey on the diversity of the endophytic bacteria and those present in the water tanks of bromeliads. Thirty eight samples of leaves and 26 samples of water from the water tanks of bromeliads were collected from many places of the Park, between the period of March, 2006 and May, 2007. Samples were cultivated in plate count agar after serial decimal dilutions. Bacteria were identified through analysis of their colonial and cellular morphology, physiological and biochemical characteristics. From leaves it was obtained 76 strains of endophytic bacteria and from water tanks it was obtained 124 strains, with the predominance of *Bacillus*, *Burkholderia*, *Staphylococcus* and *Streptomyces* genera. The Gram positive bacteria presented a great number of strains producing extra-cellular enzymes compared to Gram negative strains. The Gram positive strains isolated from the leaves were better in the production of cellulase, pectinase and lipase, and those isolated from water tanks were better in the production cellulase, amylase and protease. It was observed that the majority of the endophytic strains produce one kind of promoting growth. With the exception of fixing nitrogen, observed only with Gram negative strains, it was observed that the production of promoting growth substance is disseminated between endophytic bacteria. The analysis of biodiversity was carried out with the Shannon-Weaver index, that demonstrated ($H=3.449$) and ($H=3.070$). These results showed that there are a little higher biodiversity in the water tanks than in the leaves.

² Master of Science dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Basic Sciences of the Health Institute, Federal University of the Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (80p) March, 2008.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Parque Estadual de Itapuã.....	3
2.2. Família <i>Bromeliaceae</i>	5
2.2.1. Características gerais.....	5
2.2.2. Classificação taxonômica.....	6
2.3. Microrganismos associados à plantas.....	7
2.4. Potencialidade da interação bactéria-planta.....	9
2.5. Importância biotecnológica das enzimas produzidas pelas bactérias.....	10
2.5.1. Enzimas extracelulares.....	10
2.5.1.1. Amilases.....	11
2.5.1.2. Celulases.....	11
2.5.1.3. Esterases.....	12
2.5.1.4. Lipases.....	13
2.5.1.5. Pectinases.....	14
2.5.1.6. Proteases.....	15
2.5.2. Mecanismos de promoção do crescimento em plantas.....	16
2.5.2.1. Produção de fitormônio AIA (ácido indol acético).....	16
2.5.2.2. Capacidade de solubilização de fosfatos inorgânicos.....	17
2.5.2.3. Capacidade de fixação biológica de nitrogênio atmosférico.....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1. Amostragem das folhas e água das cisternas.....	20
3.2. Isolamento bacteriano.....	21
3.2.1. Isolamento de bactérias endofíticas.....	21
3.2.2. Isolamento a partir da água das cisternas.....	21
3.3. Contagem total de bactérias.....	22
3.4. Identificação bioquímica das bactérias isoladas.....	22
3.5. Análise da biodiversidade.....	23
3.6. Determinação do perfil enzimático das bactérias.....	24
3.6.1. Degradação de amido.....	24
3.6.2. Atividade celulolítica.....	24
3.6.3. Avaliação da esterase.....	25
3.6.4. Atividade lipolítica.....	25
3.6.5. Atividade pectinolítica.....	25
3.6.6. Atividade proteolítica.....	26
3.7. Avaliação da promoção do crescimento vegetal por bactérias endofíticas.....	26
3.7.1. Produção de fitormônio AIA (ácido indol acético).....	26
3.7.2. Avaliação do potencial de solubilização de fosfatos inorgânicos.....	27
3.7.3. Avaliação da capacidade de fixação do nitrogênio atmosférico.....	27

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 Isolamento das bactérias endofíticas.....	29
4.2 Isolamento das bactérias da água das cisternas.....	32
4.3. Contagem Total de Bactérias.....	34
4.4. Perfil enzimático das bactérias.....	40
4.5. Produção de promotores de crescimento.....	48
4.5.1. Solubilização de fosfato inorgânico pelas bactérias endofíticas.....	48
4.5.2. Produção de ácido indol acético pelas bactérias endofíticas	50
4.5.3. Capacidade de fixação biológica de nitrogênio pelas bactérias endofíticas	55
5. CONCLUSÃO	57
6. PERSPECTIVAS	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

RELAÇÃO DE TABELAS

TABELA 1 - Contagem total de bactérias nos diferentes pontos de coleta e as espécies de bromélias terrestres coletadas	28
TABELA 2 - Contagem total de bactérias nos diferentes pontos de coleta e as espécies de bromélias epífitas coletadas.....	29
TABELA 3 - Bactérias endofíticas isoladas e espécies de bromélias relacionadas	31
TABELA 4 - Bactérias Gram-positivas isoladas da água das cisternas e espécies de bromélias relacionadas	33
TABELA 5 - Bactérias Gram-negativas isoladas da água das cisternas e espécies de bromélias relacionadas	34
TABELA 6 - Índice de diversidade entre comunidades bacterianas endofíticas e da água das cisternas de bromélias	38
TABELA 7 - Perfil enzimático das bactérias endofíticas Gram-positivas	40
TABELA 8 - Perfil enzimático das bactérias endofíticas Gram-negativas	41
TABELA 9 - Perfil enzimático das bactérias Gram-positivas isoladas da água das cisternas de bromélias	43
TABELA 10 - Perfil enzimático das bactérias Gram-negativas isoladas da água das cisternas de bromélias	44
TABELA 11 - Percentagem de cepas positivas para as enzimas analisadas	46
TABELA 12 – Resultados da capacidade das bactérias endofíticas Gram-positivas em solubilizar fosfatos	47
TABELA 13 - Resultados da capacidade das bactérias endofíticas Gram-negativas em solubilizar fosfatos	49
TABELA 14 - Resultados da produção de ácido indol acético pelas bactérias endofíticas Gram-positivas	50
TABELA 15 - Resultado da produção de ácido indol acético pelas bactérias endofíticas Gram-negativas	52
TABELA 16 - Resultado do potencial das bactérias endofíticas em fixar nitrogênio	54

RELAÇÃO DE FIGURAS

FIGURA 1 – Localização do Parque Estadual de Itapuã e dos pontos de coleta
.....4

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ATCC = American Type Culture Collection

AIA = ácido indol acético

BHI = Brain Heart Infusion (caldo cérebro-coração)

DNA = ácido desoxirribonucléico

°C = graus Celsius

mL = mililitro

M = molar

(-) = negativo

pH = potencial hidrogeniônico

(+) = positivo

sp. = espécie

UFC = Unidade Formadora de Colônias

UV = ultravioleta

μL = microlitro

1. INTRODUÇÃO

O Parque Estadual de Itapuã, dentre os parques estaduais do Rio Grande do Sul, apresenta a maior diversidade de ecossistemas, abrigando um número significativo de espécies animais e vegetais ameaçados de extinção; o que o coloca numa posição privilegiada, no contexto estadual, no que diz respeito à preservação ambiental.

Entre a diversidade da flora desse parque destacamos as bromélias. Estas plantas são endêmicas das florestas tropicais e apresentam um alto índice de diversidade de espécies, onde no Brasil podem ser encontradas na Mata Atlântica. Esta família é caracterizada por plantas terrestres, saxícolas ou epífitas que, em geral, apresentam a disposição de suas folhas num caule diminuto formando uma roseta. Esta roseta acumula água e detritos orgânicos e constituem um microhabitat para inúmeras espécies de animais, plantas e microrganismos.

A descrição de microrganismos associados à plantas existe há muito tempo, no entanto, somente nas últimas décadas estes microrganismos

despertaram maior interesse, em decorrência de seu potencial biotecnológico, por apresentarem uma íntima associação com a planta hospedeira. Em especial as bactérias endofíticas no qual têm despertado grande interesse agrônomo nas últimas décadas.

O presente trabalho teve por objetivos: 1) estimar a diversidade bacteriana encontrada na água das cisternas de bromélias, bem como a comunidade bacteriana endofítica isolada de folhas de bromélias, 2) avaliar sua capacidade na produção de fitormônios, 3) da fixação biológica de nitrogênio, 4) da habilidade em solubilizar fosfatos e 5) produção de enzimas extracelulares.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Parque Estadual de Itapuã

O Parque Estadual de Itapuã, dentre os parques estaduais do Rio Grande do Sul, apresenta a maior diversidade de ecossistemas, abrigando um número significativo de espécies raras e ameaçadas de extinção, o que o coloca numa posição privilegiada, no contexto estadual, no que diz respeito à preservação ambiental (Rio Grande do Sul, 1997).

O parque foi criado em 1973, a fim de proteger a última amostra dos ambientes originais da região metropolitana de Porto Alegre como área núcleo da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica. É uma das poucas áreas onde está representada, e conservada, a fisionomia original da região que outrora ocorriam na orla do lago Guaíba e nos morros graníticos de Porto Alegre. E que hoje, são raras devido à expansão urbana (Rio Grande do Sul, 1997; Ferreira, 2005).

O Parque Estadual de Itapuã permaneceu fechado, durante dez anos à visitação pública o que permitiu que o ecossistema tivesse condições de se recuperar e, assim, fornecer condições favoráveis ao desenvolvimento de projetos científicos e educacionais. (Figura 1)

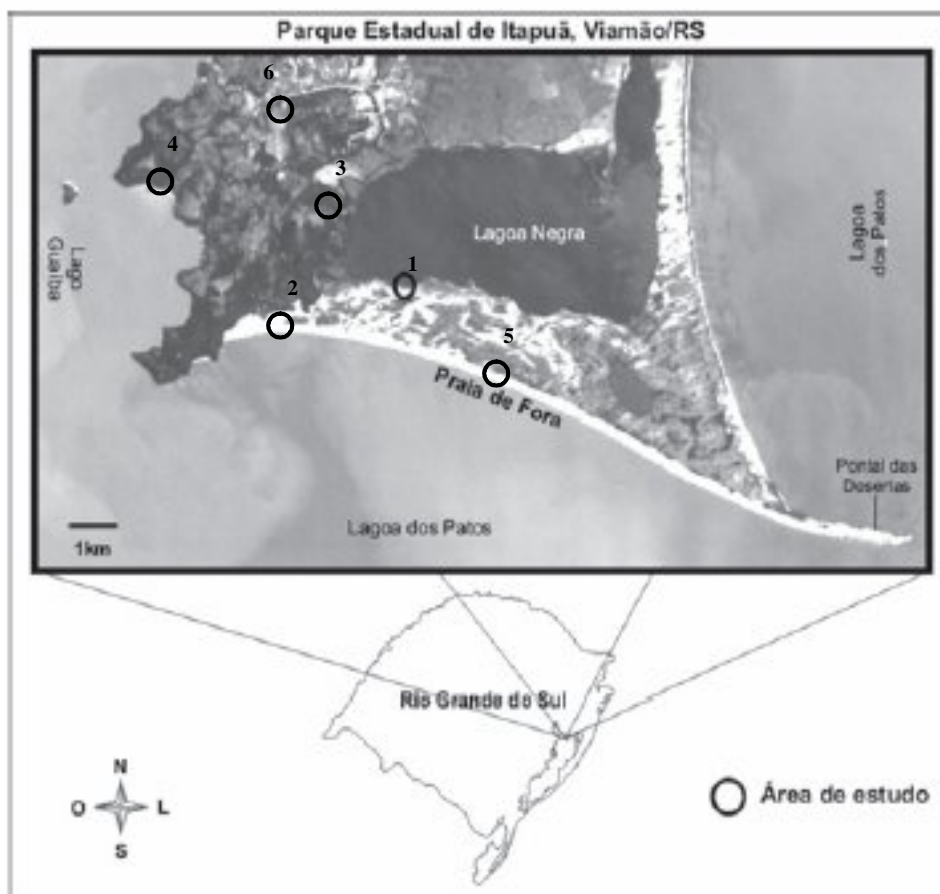


Figura 1 – Localização do Parque Estadual de Itapuã e dos pontos de coleta
 1 = Trilha da Lagoinha, Morro da Grotta; 2 = Praia da Pedreira, Trilha do Araçá; 3 = Trilha da Mariana, Morro do Araçá; 4 = Praia da Pedreira; 5 = Trilha da Betânia, Praia de Fora; 6 = Trilha da Fortaleza, Praia da Pedreira.

(Fonte da imagem de satélite Landsat: CEP SRM, 2008)

O Parque Estadual de Itapuã está localizado entre as coordenadas 50°50', 51°05'W 30°20' e 30°27'S, no município de Viamão, RS, Brasil, abrangendo uma área de 5.566,50 hectares. É composto por quatro praias, a praia de Fora, a praia do Tigre, a praia das Pombas e a praia da Pedreira, sendo as duas últimas liberadas para visitação pública. Cinco morros graníticos, o morro da Grotta, o morro do Araçá, o morro da Pedreira, o morro da Fortaleza e morro do

Campista, além da lagoa Negra e o farol de Itapuã compõem também o parque (SEMA, 2007).

Dentre as inúmeras espécies de bromélias descritas, aproximadamente 76 delas ocorrem no Parque Estadual de Itapuã, como *Aechme recurvata*, *Vriesea friburgensis*, *Vriesea gigantea* e *Tillandsia* sp. são as mais abundantes (Waldemar & Irgang, 2003; Paggi, 2006).

2.2. Família *Bromeliaceae*

2.2.1. Características gerais

A família *Bromeliaceae*, endêmica das florestas tropicais, apresenta um grande número de diversidade de espécies, sendo que no Brasil podem ser encontradas na Mata Atlântica (Reitz *et al.*, 1983). Esta família é caracterizada por plantas terrestres, saxícolas (fixadas em rochas) ou epífitas (fixas em troncos de árvores) que, em geral, apresentam a disposição de suas folhas em um caule diminuto formando uma roseta, possibilitando a acumulação de água e detritos orgânicos (Leme, 1993).

Devido à característica das bromélias de acumularem água em sua roseta foliar (cisternas ou tanques), constituem um microhabitat para inúmeras espécies de animais, plantas e microrganismos (Mestre *et al.*, 2001). Sabe-se que diversas espécies animais utilizam as bromélias para forrageamento, reprodução e refúgio contra predadores (Oliveira *et al.*, 1994; Oliveira & Rocha, 1997). Mestre *et al.* (2001) encontrou uma fauna bastante diversa associada às bromélias, onde foi

possível agrupar 23 grupos taxonômicos, como besouros, vespas, abelhas, formigas e mosquitos dos gêneros *Culex* spp., *Aedes* spp. e *Anopheles* spp.

As bromélias são utilizadas como plantas ornamentais em ambientes externos ou internos, sendo apreciadas no mundo todo (Paula & Silva, 2000) Além disso, podem ser utilizadas na fruticultura, como no caso do acabaxi (*Ananas comosus*), e na produção de xaropes, como no caso de *Bromelia antiacantha*, a “bananinha-do-mato”. Mais de 90 espécies de bromélias são utilizadas para os mais diversos fins, como fibras, forragens, alimentação humana, entre outros (Bennett, 2000).

2.2.2. Classificação taxonômica

Segundo APGII (Angiosperm Phylogeny Group, 2003) a família *Bromeliaceae* pertence à divisão Magnoliophyta, classe Liliopsida, subclasse *Zingiberidae*, ordem Bromeliales. A família *Bromeliaceae* encontra-se dividida em três sub-famílias, *Bromelioideae*, *Pitcairnioideae* e *Tillandsioideae*. Nas últimas décadas, novas coletas e descrições elevaram em aproximadamente 55% o número de espécies para a família *Bromeliaceae*, que atualmente conta com cerca de 56 gêneros e 3.270 espécies (Grant & Zijlstra, 1998).

As bromélias constituem um grupo de plantas particularmente adaptadas à vida epifítica. Muitas espécies brasileiras de bromélias ocupam territórios definidos de distribuição sendo que a Mata Atlântica é o ecossistema onde apresenta sua maior riqueza (Leme, 1993; Fontoura, 1995, Reitz, 1983).

2.3. Microrganismos associados à plantas

As plantas, durante seu estabelecimento no habitat, desenvolvem a capacidade de interagir com diferentes espécies de seres vivos. Dentre essas associações, pode-se destacar as interações mutualísticas com microrganismos como fungos e bactérias (Neto *et al.*, 2003).

Nas bromélias a interação com os organismos pode ocorrer tanto externa, através da água de suas cisternas, como internamente por microrganismos endofíticos. Mas estudos já realizados com essa planta, procuraram analisar predominantemente a presença de leveduras e coliformes fecais na água e no filoplano das folhas (Hagler *et al.*, 1993; Araújo *et al.*, 1998; Ruivo *et al.*, 2005; Landell *et al.*, 2006).

Há poucos relatos de microrganismos endofíticos isolados de folhas de bromélias, podendo tais bactérias auxiliar a planta no seu desenvolvimento (Weber *et al.*, 1999; Cruz *et al.*, 2001). Muitas bromélias apresentam hábito epifítico (fixadas em troncos de árvores), sem nenhum contato com o solo, e suas raízes servem apenas para fixação. Sua nutrição se dá apenas por tricomas (pêlos especializados na captação da umidade) localizados nas folhas (Reitz, 1983).

Portanto, os microrganismos endofíticos que habitam o interior das plantas e provavelmente nas bromélias podem ser encontrados em órgãos e tecidos vegetais, como folhas, ramos e raízes. Tais microrganismos podem desempenhar um papel importante na saúde da planta, uma vez que podem atuar como agentes controladores de microrganismos patogênicos, além de funcionar no controle de insetos e contra herbivoria (Neto *et al.*, 2003).

São considerados endofíticos, os microrganismos que vivem pelo menos um período de seu ciclo de vida no interior da planta, sem causar danos, podendo ser isolados de tecidos desinfetados superficialmente. Estes microrganismos podem residir dentro das células, no espaço intercelular ou no sistema vascular da planta (Zinniel *et al.*, 2002).

O estudo dos microrganismos endofíticos é de grande importância devido a falta de informações para elucidação da base biológica das interações endofítico-planta. Também por serem potencialmente vantajosos em diversos aspectos, tais como: controle de pragas, controle de fitopatógenos, produção de metabólitos de interesse farmacológico, promotores de crescimento vegetal, vetores para introdução de genes em plantas hospedeiras, fixação biológica de nitrogênio, entre outros (Chen *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1995; Sturz *et al.*, 1997; Reinhold-Hurek & Hurek, 1998; Sturz & Nowak, 2000;).

Os microrganismos endofíticos podem ser isolados dos mais diferentes tecidos e órgãos vegetais. Normalmente, o isolamento de microrganismos endofíticos é realizado a partir de folhas, ramos, caule e raízes. O importante é conseguir uma amostragem da comunidade do interior da planta, que realmente represente as diferentes populações cultiváveis presentes naquele hospedeiro (Assis *et al.* 1998). Uma vez que os microrganismos endofíticos convivem com microrganismos epifíticos e patógenos, o isolamento dos mesmos deve ser feito a partir do interior de tecidos e órgãos saudáveis, evitando-se assim os microrganismos patogênicos. Deve ser feita uma desinfecção da superfície do fragmento da planta eliminando-se os microrganismos epifíticos (Araújo *et al.* 2002a).

Também podemos encontrar actinomicetos como endofíticos em plantas, sendo que estas bactérias Gram-positivas são bastante conhecidas pela sua habilidade em produzir antibióticos e enzimas que degradam principalmente celulose, lignocelulose e lignina (Lacey, 1997; Araújo *et al.*, 2000).

2.4. Potencialidade da interação bactéria-planta

Os microrganismos endofíticos, por definição, podem viver no espaço intercelular dos tecidos de plantas, sendo que alguns podem estar envolvidos em relações endofítico-hospedeiro e, como resultado direto desta interação, está a produção de metabólitos secundários. Estes metabólitos afetam a interação da planta hospedeira com o meio ambiente, onde estas moléculas produzidas podem possuir atividade de hormônios, antibióticos, antitumorais, entre outras funções biológicas (Strobel, 2003). Também apresentam grande interesse industrial e biotecnológico, despertando o interesse de pesquisadores e alvo de importantes pesquisas no mundo inteiro (Hallmann *et al.*, 1997; Sturz & Nowak, 2000; McCully, 2001).

A diversidade de metabólitos secundários produzidos por um único microrganismo endofítico, ainda não foi totalmente estimada. A expectativa é de que esta diversidade seja alta, devido à conhecida versatilidade adaptativa de fungos e bactérias. Além da produção de metabólitos secundários que conferem à planta proteção contra doenças, pragas e herbívoros, os microrganismos endofíticos podem, também, causar modificações morfológicas e fisiológicas no

hospedeiro e atuar como promotores efetivos de crescimento vegetal (Azevedo *et al.*, 2002).

2.5. Importância biotecnológica das enzimas produzidas pelas bactérias

A utilização de microrganismos para fins industriais e biotecnológicos nas últimas décadas tem aumentado significativamente. Através da engenharia genética e técnicas de biologia molecular abrem-se várias possibilidades para o aperfeiçoamento de processos de produção com vistas ao desenvolvimento de novas enzimas (Steele & Stowers, 1991).

As enzimas microbianas são as mais utilizadas em processos industriais por apresentarem vantagens, como custos de produção mais baixos, produção em larga escala, possibilidade de manipulação genética e por representarem um recurso renovável (Steele & Stowers, 1991; Omura, 1992).

2.5.1. Enzimas extracelulares

As enzimas são, na sua grande maioria, proteínas que catalisam com grande eficiência as reações biológicas. Elas aceleram várias reações metabólicas importantes para a vida. As enzimas extracelulares atuam no exterior da célula bacteriana para degradar substratos estruturalmente grandes para que possam ser transportados para o interior da célula e metabolizados. Estas enzimas extracelulares são importantes na biodegradação de várias macromoléculas orgânicas (Van Beilen, 2002).

2.5.1.1. Amilases

O amido é uma das reservas de carboidrato em plantas e a maior fonte de energia para organismos não-fotossintéticos. Este elemento é composto por dois polímeros de glicose, a amilose e a amilopectina (Nielsen & Borchert, 2000). O primeiro é um polímero linear com mais de 6000 unidades de glicose e formado por ligações glicosídicas alfa-1,4. Já a amilopectina é um polímero muito ramificado com ligações do tipo alfa-1,6 (Maarel *et al.*, 2002). O amido requer uma combinação de enzimas para sua completa hidrólise, como as alfa-amilase, glicoamilase e as beta-amilase, que vão atuar sinergicamente nas diferentes ligações moleculares do amido (Hagihara *et al.*, 2001).

As amilases microbianas são amplamente empregadas nas indústrias de panificação, sendo utilizadas para melhorar o volume do pão, sua cor e maciez; na indústria de papel sendo utilizada no branqueamento do produto e na indústria têxtil atuando na organização das fibras do tecido (Bella & Altosaar, 1985; Gupta *et al.*, 2003; Steele & Stowers, 1991; Vihinem & Mantsala, 1989). Até o momento, os gêneros *Bacillus*, *Aspergillus* e *Rhizopus* são considerados como sendo as melhores fontes de amilase industrial (Gupta *et al.*, 2003; Pandey *et al.*, 2001).

2.5.1.2. Celulases

A celulose é um homopolímero de ligações beta-1,4 de glicose, que devido ao seu tamanho molecular e também por ser insolúvel em água, não é assimilada diretamente pelos microrganismos. É preciso ser hidrolisada em pequenos carboidratos por enzimas extracelulares que podem ser produzidas por

microrganismos. Celulases são enzimas que hidrolisam polímeros de celulose em pequenos oligosacarídeos como a celobiose e a glicose (Lynd *et al.*, 2002).

Celulases e outras enzimas microbianas implicadas em processos de mineralização da celulose têm um papel essencial no ciclo do carbono nos ecossistemas florestais (Criquet, 2002). Uma característica importante da celulose é sua conformação estrutural cristalina, no qual permite que as fibras sejam empacotadas muito próximas entre si, prevenindo a penetração de ataques enzimáticos e impedindo até a passagem de moléculas muito pequenas como a água. As celulases são um sistema enzimático formado por três enzimas: endo-beta-1,4-glicanases, exo-beta-1,4-glicanases e beta-glicosidases. Só o efeito sinérgico deste complexo enzimático provoca quebras no polímero de celulose (Lynd *et al.*, 2002).

As celulases microbianas são utilizadas na indústria têxtil sendo empregadas na remoção do excesso de cor dos tecidos, para estonagem de jeans e amaciamento das fibras. Na indústria de alimentos são utilizadas na clarificação de sucos de frutas, extração de óleos de sementes, no tratamento de papéis é usada para a remoção ou hidrólise parcial de resíduos de xilana e no branqueamento do produto (Fuglsang *et al.*, 1995; Bhat & Bhat, 1997).

2.5.1.3. Esterases

As esterases compõem um grupo de carboxiester hidrolases que hidrolisam ligações éster de ácidos graxos de cadeias curtas (até oito carbonos) e que são solúveis em água (Verger, 1997).

Esterases são importantes em várias aplicações biotecnológicas, devido as suas características peculiares de estabilidade em solventes orgânicos, ampla especificidade de substrato e não requerem cofatores (Jaeger & Eggert, 2002). As esterases microbianas têm aplicações na indústria farmacêutica na síntese de compostos opticamente puros, perfumes e antioxidantes (Panda & Gowrihankar, 2005; Bornscheuer, 2002).

2.5.1.4. Lipases

As lipases (triglicerol acil-hidrolases) são classificadas como hidrolases que atuam preferencialmente sobre as ligações éster presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol, no qual constitui um grupo especial de esterases (Jaeger *et al.*, 1999). A diferença entre lipase e esterase, reside no fato de que a lipase catalisa reações com substratos insolúveis em água e a esterase age em substratos solúveis em água (Alvarez-Macarie *et al.*, 1999).

As lipases catalizam a hidrólise de triglicerídeos insolúveis, de cadeia longa e outros ésteres insolúveis de ácidos graxos, no qual apresentam uma variada especificidade de comprimento de cadeia (Paiva *et al.*, 2000; Bhandarkar & Neau, 2000).

As lipases podem ser obtidas a partir de tecidos de animais e plantas ou por fermentação usando uma grande variedade de espécies de microrganismos, como os fungos *Aspergillus* sp., *Mucor* sp., *Rhizopus* sp., *Penicillium* sp., *Geotrichum* sp., *Tulopsis* sp. e *Candida* sp. e por bactérias como

Pseudomonas sp., *Achromobacter* sp. e *Staphylococcus* sp. entre outros (Jaeger & Reetz, 1998).

Do ponto de vista industrial e econômico, é preferível o emprego de lipases produzidas por microrganismos do que as lipases de fontes animais e plantas, devido ao alto custo de isolamento (Castro & Anderson, 1995).

As aplicações industriais de lipases são bastante abrangentes onde incluem seu uso na indústria de alimentos (na modificação de aromas e texturas), na química fina (na síntese de ésteres), em detergentes (visando a hidrólise de gorduras), no tratamento de efluentes (decomposição e remoção de substâncias oleosas), no couro (remoção de lipídeos da pele dos animais), na indústria farmacêutica (medicamentos, digestivos e enzimas para diagnósticos) (Burket *et al.*, 2004; Hasan *et al.*, 2006; Jaeger & Reetz, 1998;).

As lipases provenientes de microrganismos constituem um grupo de valiosas enzimas de aplicação biotecnológica, isto se deve principalmente às suas propriedades versáteis, especificidade de substrato e facilidade de produção em larga escala, constituindo portanto, um grupo enzimático mais utilizado no segmento industrial (Gandhi, 1997; Houde *et al.*, 2004).

2.5.1.5. Pectinases

Pectinases são um grupo complexo de enzimas capazes de degradar substâncias pécticas. Tais substâncias são complexos coloidais de polissacarídeos com um esqueleto de ácido galacturônico unidos por ligações glicosídicas do tipo alfa 1-4 (Gummadi & Kumar, 2005).

Pectinases são enzimas de grande importância industrial e de grande significância na área da biotecnologia com extensa área de aplicação, como: processamento têxtil, tratamento de esgotos, fabricação de papel e na fermentação de chás e café (Hoondal *et al.*, 2002; Da Silva *et al.*, 1997).

As enzimas pectinases estão amplamente distribuídas na natureza e podem ser produzidas por bactérias, fungos, leveduras, insetos, nematóides e protozoários. A pectinase microbiana tem um papel importante na invasão de plantas, simbiose e decomposição de plantas. Assim, o ataque de patógenos aos tecidos da planta são normalmente iniciados por pectinases devido às substâncias pectínicas presentes na parede celular vegetal (Sakai *et al.*, 1993).

2.5.1.6. Proteases

Enzimas proteolíticas hidrolizam as ligações peptídicas de proteínas (Rao *et al.* 1998).

A produção de proteases por microrganismos é influenciada por diversos fatores, entre eles estão os componentes do meio como carbono, nitrogênio e íons metálicos, como fatores físicos estão pH, temperatura e tempo de incubação (Puri *et al.*, 2002; Herrmann *et al.*, 1991).

As enzimas proteolíticas são utilizadas na síntese de pequenos peptídeos, como aspartame e outros. As proteases mais utilizadas industrialmente são produzidas por bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Staphylococcus* e *Pseudomonas* (Kimura *et al.*, 1990; Monter *et al.*, 1991).

2.5.2. Mecanismos de promoção do crescimento em plantas

A promoção do crescimento vegetal mediada por bactérias endofíticas pode ocorrer através de mecanismos diretos (fixação biológica de nitrogênio, produção de fitormônios, solubilização de fosfatos e aceleração dos processos de mineralização) e por mecanismos indiretos (produção de sideróforos, produção de antibióticos, antagonismo a fitopatógenos, entre outros) (Oliveira *et al.*, 2003).

A promoção do crescimento vegetal pelas bactérias ocorre tanto pela transferência de moléculas sintetizadas pela bactéria para a planta, pelo incremento na absorção ou aumento da disponibilidade de certos elementos nutricionais (Brooks *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1995; Nejad & Johnson, 2000).

Podemos salientar que as bactérias endofíticas podem estar envolvidas em vários mecanismos ao mesmo tempo auxiliando no desenvolvimento da planta.

2.5.2.1. Produção do fitormônio (ácido indol acético)

As plantas produzem normalmente substâncias reguladoras de seu crescimento vegetal, denominados fitormônios. No entanto, as bactérias endofíticas através do seu metabolismo são capazes de produzir algumas destas substâncias e promover um estímulo ao crescimento vegetal (Bashan & Holguim, 1998).

Além do estímulo ao crescimento vegetal, os microrganismos podem exercer a função de detoxificação celular causada por níveis elevados de triptofano (Manulis *et al.*, 1998). As bactérias endofíticas do gênero *Gluconobacter*,

Acinetobacter, *Actinomyces*, *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Curtobacterium*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, e *Xanthobacter* são bastante conhecidas por promoverem o crescimento vegetal (Patten & Glick, 1996; Costacurta & Vanderleyden, 1995).

2.5.2.2. Capacidade de solubilização de fosfatos inorgânicos

O fósforo é um elemento importante para o crescimento das plantas, mas no solo podem ocorrer reações que os tornam compostos insolúveis. Este elemento pode ser seqüestrado por mecanismos de precipitação e absorção com íons como alumínio ou cálcio, formando compostos fosforados insolúveis e indisponíveis para as plantas (Harris *et al.*, 2006).

O principal mecanismo de ação na solubilização de fósforo mineral se dá através da atuação de ácidos orgânicos sintetizados por microrganismos, que promovem a acidificação da célula microbiana e do ambiente ao seu entorno. Entre os ácidos empregados, o ácido glucônico aparece como o agente mais freqüente de solubilização (Raghothama, 1999; Gupta *et al.* 1994).

Os microrganismos têm um papel central no ciclo natural do fósforo. Este ciclo ocorre devido a processos de oxi-redução e/ou acidificação de compostos fosforados. Diferentes espécies de bactérias foram identificadas como capazes de solubilizar compostos fosfatados inorgânicos, como os fosfatos di e tricálcico, hidroxapatitas e rochas fosfatadas. São conhecidos como solubilizadores de fosfatos os gêneros *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*,

Burkholderia, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* e *Rhizobium* (Glick, 1995; Rodríguez & Fraga, 1999).

2.5.2.3. Habilidade para fixação biológica de nitrogênio atmosférico

O mecanismo mais estudado de promoção do crescimento vegetal por bactérias é a fixação biológica de nitrogênio. A contribuição de bactérias para a nutrição de plantas através da fixação biológica do nitrogênio é mais conhecida em leguminosas (Baldani & Baldani, 2005; Reis *et al.*, 2000).

Na natureza, a incorporação do nitrogênio ao ecossistema é feita, naturalmente, pelas bactérias fixadoras de nitrogênio, conhecidas como bactérias diazotróficas. A reação de assimilação do nitrogênio pelas bactérias diazotróficas é catalisada pela nitrogenase, que é um complexo enzimático, o qual converte o nitrogênio gasoso (N_2) em íons amônio (NH_4^+), que é sua forma mais reduzida. Só então pode ser utilizado pelos seres vivos para a formação de seus compostos nitrogenados (Reis *et al.*, 2000; James, 2000).

Apesar da abundância de nitrogênio na atmosfera, apenas uma pequena fração dos organismos do grupo procariotos consegue converter ou reduzir enzimaticamente o nitrogênio da atmosfera em amônio, podendo assim ser incorporada no crescimento e manutenção das células (Peoples & Craswell, 1992).

Segundo Bohlool *et al.*, (1992) as bactérias fixadoras de nitrogênio (ou diazotróficas) são divididas em três grupos: diazotróficas de vida livre onde fixam o

nitrogênio somente para seu uso próprio; diazotróficas associativas no qual contribuem para o crescimento da planta proporcionando um aporte de nitrogênio, mas sem a formação de estruturas diferenciadas; e diazotróficas simbióticas que apresentam uma interação muito íntima com a planta e, em alguns casos, são formadas estruturas diferenciadas denominadas nódulos.

Podemos citar como exemplos de diazotróficas de vida livre a *Beijerinckia fluminensis* e *Beijerinckia indica*, as bactérias do gênero *Azotobacter*, *Azomonas*, *Enterobacter* e *Klebsiella*. Como bactérias diazotróficas associativas temos o *Azospirillum* como endofítico facultativo e *Acetobacter diazotrophicus*, *Alcaligenes faecalis*, *Azoarcus sp.*, *Burkholderia sp.*, *Enterobacter sp.*, *Erwinia sp.*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pantoea agglomerans* entre outras como endofíticos. E por fim, como diazotróficas simbióticas temos o *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* e *Rhizobium* (Marin *et al.*, 1999).

A maioria das bactérias envolvidas no processo de fixação biológica de nitrogênio são Gram-negativas porém podemos encontrar algumas bactérias do grupo das Gram-positivas envolvidas neste processo que são as do gênero *Paenibacillus* e do gênero *Frankia* (Benson & Silvester, 1993).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostragem das folhas e água das cisternas

Foram amostradas 38 folhas de diferentes espécies de bromélias coletadas no parque Estadual de Itapuã. Para obtenção das amostras, foram escolhidas folhas aparentemente saudáveis (sem manchas, murchas ou amareladas), sendo que tais amostras eram extraídas com cuidado para que não houvesse prejuízo maior para a planta. Após a coleta, as folhas foram acondicionadas em sacos estéreis e mantidas refrigeradas em caixas isotérmicas até sua chegada ao laboratório.

As amostras da água das cisternas de 26 bromélias-tanque foram coletadas com auxílio de seringas estéreis, acondicionadas em tubos de ensaio estéreis e mantidas refrigeradas em caixas isotérmicas até a chegada ao laboratório.

3.2. Isolamento bacteriano

3.2.1. Isolamento de bactérias endofíticas

Para a etapa de desinfecção superficial das folhas foram realizadas segundo Araújo *et al.* (2002a). As folhas foram lavadas vigorosamente em água destilada estéril para reduzir ao máximo a microflora epífita e as sujidades do ambiente. Logo em seguida foram imersas por um minuto em etanol 70%, três minutos em hipoclorito de sódio a 2% (v/v) e 30 segundos em etanol 70%. Por fim, foram lavadas por mais duas vezes em água destilada estéril para retirar resquícios das soluções anteriores.

Logo em seguida, fragmentos de 10cm² das folhas foram cortados assepticamente e triturados em 10mL de solução salina 0,85%, com auxílio de cadinho e pistilo. Após a maceração do tecido vegetal, foram efetuadas diluições decimais seriadas até a diluição 10⁻³. Após as diluições, alíquotas de 0,1mL foram inoculadas, em duplicata, em ágar para contagem e incubadas em aerobiose a 30°C, sendo observadas de 24h a 15 dias.

Para confirmar que o procedimento de desinfecção foi bem sucedido, alíquotas de 0,1mL de água destilada, utilizada na última lavagem, foram semeadas em ágar para contagem e incubadas em aerobiose a 30°C, sendo observadas até 15 dias.

3.2.2. Isolamento a partir da água das cisternas

Nas amostras de água das cisternas foram efetuadas diluições

decimais seriadas até a diluição 10^{-5} . Sendo que a semeadura foi feita, em duplicata, com volume de 0,1mL de inóculo, utilizando ágar para contagem. As placas foram incubadas em aerobiose a 30°C, observadas de 24h a 15 dias.

3.3. Contagem total de bactérias

Após o período de incubação, em média de 48 a 72h, foram realizadas as contagens das unidades formadoras de colônias (UFC). As contagens das colônias foram, primeiramente, multiplicadas por 10 (pois o inóculo foi de 0,1mL) e depois foi multiplicada pelo fator de diluição correspondente e os resultados expressos em UFC/cm².

Nas amostras de água das cisternas foram escolhidas as placas nas diluições que continham entre 30 e 300 colônias e efetuadas as contagens. As contagens das colônias foram multiplicadas, primeiramente por 10 (pois o inóculo foi de 0,1mL) e depois foi multiplicada pelo fator de diluição correspondente e os resultados expressos em UFC/mL.

3.4. Identificação bioquímica das bactérias isoladas

As colônias observadas foram agrupadas de acordo com suas características coloniais, como presença de pigmento, forma, bordas, superfície, consistência e odor. Após esta classificação as culturas foram isoladas através de dois isolamentos consecutivos, no mínimo em Tryptic Soy Agar (TSA). Os isolados foram submetidos a testes bioquímicos e morfológicos, segundo MacFaddin (2000) e Holt *et al.* (2001).

Podemos detalhar os testes bioquímicos realizados neste trabalho, onde toda identificação bacteriana deve começar pela separação dos grupos em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas através da coloração de Gram. Após esta divisão há vários testes bioquímicos a serem realizados, conforme exemplificado no esquema descrito abaixo.

Coloração de Gram a partir de colônias bacterianas puras			
Gram positivas		Gram negativas	
Cocos	Bastonetes	Crescimento no ágar MacConkey	
		Positivo	Negativo
Catalase	Catalase	O/F	O/F
O/F	Motilidade	Nitrato	Nitrato
Teste CAMP	O/F	Motilidade	Motilidade
Motilidade	Nitrato	Gelatina	Urease
Nitrato	Fenilalanina	Esculina	Esculina
Glicose	Voges-Proskauer	Urease	Catalase
Voges-Proskauer			

3.5. Análise da biodiversidade

A riqueza de espécies bacterianas foi calculada através do número de espécies microbianas diferentes por nicho, ou seja, interior da planta (endofíticos) ou na água das cisternas das bromélias. O índice de Shannon-Wiener (H) assume que os indivíduos são coletados aleatoriamente dentre uma grande e infinita

população. Já o índice de riqueza de espécies (d) leva em conta o número de espécies obtidas e o número total de indivíduos que compõem a amostra e refere-se a abundância numérica de uma determinada comunidade. O índice de Equitabilidade de Shannon (E) utiliza o resultado obtido pelo índice de Shannon-Weaver e o número de espécies envolvidas na amostra (Shannon & Weaver, 1963; Atlas & Bartha, 1997; Magurran, 1988).

3.6. Determinação do perfil enzimático das bactérias

Todos os isolados bacterianos foram inoculados nos meios de cultivo apropriados para cada análise enzimática, em duplicata, através de inoculação por picada em meio sólido ou inoculação em meio líquido. O período de incubação foi de 48 horas, exceto para os actinomicetos, cujo período de incubação aumentava para 10 dias.

3.6.1. Degradação de amido

Determinação da capacidade das bactérias em hidrolisar o amido através da enzima amilase, num meio de cultivo contendo 0,1% de amido. Foi utilizada a metodologia descrita em MacFaddin (2000). A formação de uma zona clara ao redor das colônias é considerado resultado positivo para o teste, após a adição do reativo lugol.

3.6.2. Atividade celulolítica

A atividade celulolítica foi analisada num meio de cultivo contendo 0,5%

de carboximetilcelulose, conforme descrito por Teather & Wood (1984). Para visualização do halo de hidrólise adicionou-se uma solução de vermelho congo 0,1% por 15 minutos. Resultados positivos foram evidenciados pela formação de halos claros de hidrólise ao redor das colônias.

3.6.3. Avaliação da esterase

Foi utilizado o método descrito por Haba *et al.* (2000), suplementado com 0,01% de CaCl₂ e Tween 80, que foi adicionado numa concentração de 1%. Para análise dos resultados, foram considerados positivos os isolados que produziram halos opacos ao redor das colônias, observados visualmente nas placas.

3.6.4. Atividade lipolítica

Para verificação da atividade lipolítica foi utilizado o método descrito por Haba *et al.* (2000), suplementado com solução de Rhodamina B (0,001%). O meio, após ser autoclavado, foi resfriado até a temperatura de 60°C para a adição de óleo de oliva, previamente esterilizado por filtração, numa concentração final de 2,5%. Os resultados foram identificados através da formação um halo laranja fluorescente ao redor das colônias sob luz UV 350nm.

3.6.5. Atividade pectinolítica

A atividade pectinolítica foi verificada num meio de cultivo contendo 1% de pectina cítrica, conforme descrito por Cao & Chen (1992) com modificações segundo Soares *et al.* (1999) onde foi adicionado um reagente contendo iodo, com

o qual tornou-se evidente os isolados positivos pela produção de um halo claro ao redor das colônias.

3.6.6. Atividade proteolítica

A atividade da protease foi verificada utilizando-se ágar suplementado com uma solução de leite em pó desnatado a 10%, de acordo com método de Dunn *et al.* (1997), no qual os halos translúcidos de degradação foram observados diretamente nas placas após o período de incubação.

3.7. Avaliação da promoção do crescimento vegetal por bactérias endofíticas

3.7.1. Produção de fitormônios (ácido indol acético - AIA)

Para avaliar a produção do fitormônio (ácido indol acético - AIA) foram utilizadas duas metodologias distintas, sendo ambas apenas qualitativas.

Segundo metodologia descrita por Bric *et al.* (1991), as bactérias endofíticas foram inoculadas em ágar tríptico de soja suplementado com 5mM de L-triptofano, imediatamente cobertas com membrana de nitrocelulose estéril e incubadas por 48h a 30°C. Após o período de incubação, a membrana era removida e tratada com 10mL do reagente de Salkowski. A reação era mantida no escuro e à temperatura ambiente por 10 minutos. A formação de um halo róseo ao redor das colônias indicava a presença do ácido indol-acético na membrana.

A segunda metodologia utilizada foi a descrita por Glickmann & Dessaux, (1995), na qual utilizou-se o caldo Lúria enriquecido com 5mM de

triptofano e duas diferentes formulações do reagente de Salkowski, denominadas como R1 (12g/L FeCl_3 em 7,9M de H_2SO_4) e R2 (4,5g/L FeCl_3 em 10,8M H_2SO_4).

As bactérias endofíticas foram inoculadas nos tubos contendo o caldo Luria e incubadas a 30°C por 48h. Após o período de incubação, foram adicionados alíquotas de 1mL de cada reagente (R1 e R2) nos tubos de ensaio separadamente. A reação foi mantida no escuro por 15 minutos e os resultados positivos foram evidenciados pela presença de coloração rosa nos tubos.

3.7.2. Avaliação do potencial de solubilização de fosfatos inorgânicos

Para verificar o potencial das bactérias endofíticas em solubilizar fosfatos inorgânicos foi utilizada a metodologia descrita por Sylvester-Bradley *et al.*, 1982. no qual o meio de cultivo foi suplementado com fosfato de cálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), o qual torna o meio opaco e os resultados positivos são evidenciados por halos transparentes ao redor das colônias.

3.7.3. Avaliação da capacidade de fixação do nitrogênio atmosférico

Para a avaliação da fixação de nitrogênio utilizou-se a metodologia descrita por Baldani *et al.* (1996) e complementada com informações morfológicas descritas por Döbereiner *et al.* (1995). As bactérias endofíticas foram inoculadas em meio sólido e caso apresentassem as características posteriormente em meio semi-sólido.

Três meios de cultivo foram utilizados para identificação da fixação de nitrogênio, denominados meios JMV, JNFb e LGI-P, sendo que estes apresentam basicamente a mesma formulação química, onde apenas é substituída a fonte de carbono, como no meio JMV foi adicionado 0,5% de manitol, no meio JNFb adicionou-se 0,5% de ácido málico e, no meio LGI-P foi adicionado 10% de sacarose.

No meio sólido JMV nota-se a formação de colônias côncavas, redondas e úmidas. Já no meio JMV semi-sólido, uma película grossa é formada na superfície do meio no período de 4 a 5 dias de incubação a 30°C.

No meio sólido JNFb, formam-se colônias pequenas com centro azul escuro e no meio JNFb semi-sólido espera-se a formação de uma película fina como véu e o meio torna-se azul.

No meio sólido LGI-P as colônias formadas são de cor laranjas e pequenas. No entanto, no meio semi-sólido há formação de uma película amarelada entre 7 a 10 dias após a inoculação.

Os isolados foram repicados primeiramente para os meios sólidos e os isolados que apresentaram o crescimento esperado, conforme descrito acima, foram repicados para os tubos contendo os respectivos meios semi-sólidos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Isolamento das bactérias endofíticas

Das bromélias epífitas, foram coletadas 23 amostras de quatro espécies de todos os locais amostrados do parque, já das bromélias terrestres foram coletadas 15 amostras, perfazendo um total de 38 amostras de folhas de bromélias coletadas no Parque Estadual de Itapuã.

Foram coletadas seis amostras de três espécies de bromélias que não acumulam água em suas cisternas ou são muito pequenas (*B. antiacantha*, *T. gardneri* e *T. stricta*). Na Tabela 1 é possível visualizar as espécies de bactérias endofíticas isoladas das bromélias.

Tabela 1 - Bactérias endofíticas isoladas e espécies de bromélias relacionadas

Espécies bromélias / Bactérias endofíticas	<i>Aechmea recurvata</i> (11) ⁽¹⁾	<i>Bromelia antiacantha</i> (3)	<i>Vriesea friburgensis</i> (13)	<i>Vriesea gigantea</i> (7)	<i>Vriesea procera</i> (1)	<i>Tillandsia gardneri</i> (1)	<i>Tillandsia stricta</i> (2)
Gram-positivas							
<i>Arcanobacterium pyogenes</i> (1) (10FI)[*]		1 ⁽²⁾					
<i>Bacillus pumilus</i> (3) (6FIX/16FVI/16FIX)	1				1	1	
<i>Bacillus sphaericus</i> (2) (4FI/7FX)			2				
<i>Bacillus macerans</i> (1) (29FIX)	1						
<i>Bacillus megaterium</i> (1) (6FIV)		1					
<i>Bacillus subtilis</i> (2) (29FIII/36FV)					1	1	
<i>Brevibacterium casei</i> (1) (8FI)			1				
<i>Brevibacterium epidermidis</i> (4) (2FI/3FII/16FIII/16FX)	4						
<i>Brevibacterium linens</i> (29FIV)	1						
<i>Brevibacterium linens</i> (36FVIII)							1
<i>Jonesia denitrificans</i> (1) (10FII)		1					
<i>Micrococcus luteus</i> (6) (1FI/1FIII/3FIII/10FIV/22FII/36FXIII)	3	1		1			1
<i>Micrococcus lylae</i> (5) (3FI/16FV/36FXVI/36FXVII/36FXVIII)	2		1		1	1	
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (13) (10FVII/10FIX/15FI/22FIII/25FVIII/28FI/22FIV/29FVI/16FIV/19FII/19FIII)	1	2	6	3			1
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (4) (6FX/14FII/22FVI/26FI)	2			1	1		
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (2) (10FVII/10FVIII)		2					
<i>Streptomyces</i> sp. (4) (33FI/33FII/36FVII/36FXI)	1	1	1		1		
Gram-negativas							
<i>Acidovorax facilis</i> (3) (35FII/36FX/20FII)			3				
<i>Bartonella bacilliformis</i> (2) (20FVI/36FIV)			1		1		
<i>Burkholderia cepacia</i> (4) (29FVIII/36FXII/36FXIV/36FXV)	1			1		1	1
<i>Burkholderia gladioli</i> (3) (6FXIV/20FIV/29FI)	1	1	1				
<i>Citrobacter werkmanii</i> (1) (5FII)			1				
<i>Enterobacter cloacae</i> (1) (20FX)			1				
<i>Klebsiella mobilis</i> (1) (5FI)			1				
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1) (5FIII)			1				
<i>Oligella ureolytica</i> (1) (36FVI)					1		
<i>Ralstonia picketti</i> (2) (25FII/6FVI)		1		1			
<i>Xanthobacter autotrophicus</i> (1) (25FIII)						1	
<i>Xanthomonas campestris</i> (1) (36FI)				1			
Total isolados (76)	18	11	20	10	8	5	4

⁽¹⁾número de amostras de bromélias coletadas; ⁽²⁾número de cepas isoladas; [*] código de identificação das cepas

As bromélias epífitas apresentaram uma média de 2,4 de espécies bacterianas por folha, enquanto que as de hábito terrestre apresentaram uma média de 4,4 de espécies bacterianas diferentes. Independentemente da espécie de bromélia amostrada predominou o isolamento de bactérias Gram-positivas.

É possível observar que as espécies de bromélias *Aechmea recurvata* e *Vriesea friburgensis* apresentaram um maior número de bactérias isoladas de suas folhas, onde têm-se 16 bactérias Gram-positivas e 2 bactérias Gram-negativas em *Aechmea recurvata* e 11 bactérias Gram-positivas e 9 bactérias Gram-negativas em *Vriesea friburgensis*. No entanto observou-se que em *Vriesea procera* o número de bactérias isoladas também foi elevado, sendo que esta foi coletada apenas uma vez.

Na bromélia *Vriesea friburgensis* notou-se a presença de 11 bactérias Gram-positivas e nove bactérias Gram-negativas, evidenciando que nesta amostra há um equilíbrio entre os isolados dos dois grupos bacterianos.

Em *Bromelia antiacantha* apesar de terem sido coletadas poucas amostras (apenas 3 exemplares) apresentou um número elevado de isolados, sendo nove bactérias Gram-positivas e 2 bactérias Gram-negativas.

Notou-se que a bactéria Gram-positiva *Brevibacterium epidermidis* ocorreu somente em *Aechmea recurvata*, sendo esta bactéria considerada um patógeno oportunista de humanos e animais podendo ser isolada de inúmeros habitats.

Dentre as 55 bactérias Gram-positivas isoladas das folhas de bromélias os gêneros *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Micrococcus* e *Staphylococcus* foram as

espécies mais freqüentes. Já entre os 21 isolados Gram-negativos, *Burkholderia* foi o gênero mais encontrado.

Várias dessas espécies já foram encontradas como endofíticas de outras plantas como em citrus, banana, algodão, milho, cenoura, soja, entre outros (Araújo *et al.*, 2002b; Martinez *et al.*, 2003; Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004; McInroy & Kloepper, 1995b; Surette *et al.*, 2003). Mas sua contribuição para a planta continua inexplorada.

As bactérias *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia gladioli*, *Ralstonia picketti* e *Xanthomonas campestris* são relatadas como possíveis bactérias fitopatogênicas. No entanto, encontramos tais bactérias em plantas aparentemente saudáveis (Araújo *et al.*, 2002b).

4.2. Isolamento das bactérias da água das cisternas

Foram amostradas 26 amostras de água das cisternas das espécies de bromélias encontradas no parque e estas apresentaram uma contagem total de bactérias de cerca de $1,2 \times 10^6$ UFC/mL.

Em comparação com os resultados obtidos entre as bromélias terrestres e epífitas observamos que na água das cisternas das bromélias terrestres tinham 10 vezes mais colônias bacterianas do que nas epífitas.

Nas tabelas 2 e 3 encontram-se listadas as bactérias isoladas da água das cisternas e as espécies de bromélias em que foram coletadas as amostras. Pode-se observar, além da maior quantidade de isolados, um número mais equilibrado entre Gram-positivas e Gram-negativas.

Foram coletadas quatro espécies de bromélias-tanque, onde em todas observou-se uma média maior na quantidade de UFC na água de cisterna comparada às folhas e também em número de espécies bacterianas. Fato esperado devido à maior interação com o ambiente da cisterna, estando mais sujeita à colonização microbiana e de outros organismos.

Tabela 2 - Bactérias Gram-positivas isoladas da água das cisternas e espécies de bromélias relacionadas

Espécies bromélias / bactérias água	<i>Aechmea recurvata</i> (10) ⁽¹⁾	<i>Vriesea friburgensis</i> (8)	<i>Vriesea gigantea</i> (7)	<i>Vriesea procera</i> (1)
<i>Aureobacterium saperdae</i> (1) (19AVII) [*]			1 ⁽²⁾	
<i>Aureobacterium terregens</i> (1) (24AXII)		1		
<i>Bacillus pumilus</i> (7) (5AIX/10AVII/16AI/16AII/16AIII/16AIV/19AIII)	4	1	2	
<i>Bacillus sphaericus</i> (3) (20AIX/5AVII/5AVIII)	1	2		
<i>Bacillus cereus</i> (2) (13AVI/13AVII)		1	1	
<i>Bacillus subtilis</i> (2) (16AVIII/16AXII)	2			
<i>Brevibacterium casei</i> (2) (20AVIII/18AI)	1	1		
<i>Brevibacterium epidermidis</i> (1) (15AIII)	1			
<i>Brevibacterium linens</i> (2) (26AVII/26AXI)	1		1	
<i>Brevibacterium linens</i> (1) (16AVI)			1	
<i>Microbacterium arborescens</i> (2) (5AV/17AIII)		2		
<i>Micrococcus luteus</i> (4) (10AIV/14AIII/14AV/25AVIII)	1	1	2	
<i>Micrococcus lylae</i> (2) (3AII/24AXI)		2		
<i>Micrococcus roseus</i> (1) (15AVIII)	1			
<i>Nocardia</i> sp. (5) (1AI/1AX/11AII/16AVII/11AI)	3		2	
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (9) (2AI/2AIII/3AI/21AI/21AX/26AXII/27AI/27AIII/14AIX)	2	7		
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (6) (4AXIII/9AV/24AIII/25AVI/17AIX/29AIII)		2	2	2
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (1) (20AII)		1		
<i>Streptomyces</i> sp. (7) (7AVI/11AVI/19AI/19AII/23AV/23AVI/29AIV)	1	1	4	1
Total isolados (64)	18	27	16	3

⁽¹⁾número de amostras de bromélias coletadas; ⁽²⁾número de cepas isoladas;

Tabela 3 - Bactérias Gram-negativas isoladas da água das cisternas e espécies de bromélias relacionadas

Espécies bromélias / bactérias água	<i>Aechmea recurvata</i> (10) ⁽¹⁾	<i>Vriesea friburgensis</i> (8)	<i>Vriesea gigantea</i> (7)	<i>Vriesea procera</i> (1)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (3) (1AVIII/3AIX/15AI) [*]	3 ⁽²⁾			
<i>Burkholderia cepacia</i> (3) (20AI/24AIX/17AVII)	1	2		
<i>Burkholderia gladioli</i> (1) (25AI)		1		
<i>Burkholderia mallei</i> (6) (11AIII/19AIV/19AV/12AV/18AIII)	1		5	
<i>Capnocytophaga sputigena</i> (1) (13AII)			1	
<i>Chromobacterium violaceum</i> (2) (15AIX/15AX)	2			
<i>Enterobacter cloacae</i> (4) (6AVIII/11AIV/13AVIII/22AIII)		1	3	
<i>Enterobacter sakazaki</i> (4) (14AVII/21AIX/20AX/28AII)	2		2	
<i>Escherichia coli</i> (8) (1AII/1AVII/7AIII/9AIII/9AIV/10AV/20AIII/29AI)	2	2	4	
<i>Flavimonas oryzae</i> (2) (1AIII/17AVIII)	1	1		
<i>Kingella denitrificans</i> (1) (10AIII)			1	
<i>Methylobacterium radiotolerans</i> (2) (17AII/9AVI)		1		1
<i>Methylobacterium rhodesianum</i> (1) (14AVIII)	1			
<i>Oligella ureolytica</i> (3) (19AVIII/25AV/25AXIII)		1	2	
<i>Pantoea agglomerans</i> (5) (6AXIII/14AXII/22AV/29AII/27AII)	2	1	2	
<i>Pseudomonas oryzae</i> (5) (9AI/27AIV/27AVII/27AVIII/27AIX)	1	2	2	
<i>Roseomonas fauriae</i> (1) (11AV)			1	
<i>Serratia mascerans</i> (1) (24AX)		1		
<i>Xanthobacter agilis</i> (1) (5AVI)		1		
<i>Xanthomonas axonopodis</i> (1) (6AII)			1	
<i>Xanthomonas campestris</i> (4) (22AI/22AII/8AV/14AI)	1	2		1
<i>Xanthomonas fragariae</i> (1) (6AVII)	1			
Total isolados (60)	18	16	24	2

⁽¹⁾número de amostras de bromélias coletadas; ⁽²⁾número de cepas isoladas
[*] código de identificação das cepas

Staphylococcus aureus subsp. *aureus* foi a bactéria Gram-positiva mais abundante isolada na água das cisternas de *Vriesea friburgensis*, no entanto a bactéria *Aureobacterium terregens* foi isolada somente da cisterna desta bromélia.

Os isolados do gênero *Bacillus* foram isolados de quase todas as cisternas amostradas, exceto em *Vriesea procera*.

Em *Achmea recurvata* notou-se a presença das bactérias Gram-negativas *Acinetobacter calcoaceticus*, *Chromobacterium violaceum* e *Methylobacterium rhodesianum* isoladas somente das cisternas desta espécie de bromélia.

Observou-se que as bactérias Gram-negativas *Burkholderia gladioli*, *Serratia macerans* e *Xantobacter agilis* foram isoladas apenas na água das cisternas de *Vriesea friburgensis*. Enquanto que *Xanthomonas axonopodis* foi isolada apenas na cisterna de *Vriesea gigantea*.

Das amostras de água das cisternas de bromélias foram isoladas 19 espécies de bactérias Gram-positivas classificadas dentro nove gêneros. Os gêneros mais freqüentes foram *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Staphylococcus* e *Streptomyces*.

Resultado semelhante em termos de número de espécies isolou-se 15 espécies de bactérias Gram-negativas distribuídas em 9 gêneros com predomínio dos gêneros *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Pantoea* e *Xanthomonas*.

Ficou evidenciada a presença nas amostras da água das cisternas de alguns gêneros e espécies que não foram isolados como endofíticos: *Bacillus cereus*, *Microbacterium arborescens*, *Micrococcus roseus*, *Nocardia* sp., *Acinetobacter calcoaceticus*, *Chromobacterium violaceum*, *Enterobacter sakazakii*, *Escherichia coli*, *Flavimonas oryzihabitans*, *Kingella denitrificans*,

Methylobacterium radiotolerans, *Methylobacterium rhodesianum*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas oryzihabitans*, *Roseomonas fauriae*, *Serratia mascerans*, *Xanthobacter agilis*, *Xanthomonas axonopodis* e *Xanthomonas fragariae*. Mas algumas espécies descritas acima foram encontradas no interior de outras plantas (Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004; Zinniel *et al.*, 2002; Carrim *et al.*, 2006; Stamford *et al.*, 1998).

Notou-se também a presença de *Escherichia coli*, bactéria pertencente à microbiota animal, demonstrando a influência da interação animal na população de microrganismos desta planta.

Outra bactéria relevante isolada foi *Chromobacterium violaceum* que tem sido encontrada causando alguns casos de infecções oportunistas em humanos e também é produtora de antimicrobianos (Lee *et al.*, 1999).

4.3. Contagem Total de Bactérias

As bactérias, em geral, apresentaram um crescimento no período de 48 a 72h, exceto os actinomicetos (*Nocardia* sp. e *Streptomyces* sp.) que cresceram entre 7 a 10 dias de incubação. Os controles das lavagens não apresentaram crescimento microbiano, indicando que o procedimento de desinfecção superficial foi bem sucedido.

Os resultados obtidos na contagem total de bactérias, da água das cisternas e das endofíticas, dos diferentes pontos de coleta e nas espécies de bromélias coletadas encontram-se nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4 - Contagem total de bactérias nos diferentes pontos de coleta nas espécies de bromélias terrestres coletadas

Espécie bromélia	Local coleta	Folhas (UFC/cm²)	Água (UFC/mL)
<i>Aechmea recurvata</i>	1 ⁽¹⁾	2,0x10 ²	2,9x10 ⁵
<i>A. recurvata</i>	1	2,0x10 ²	1,0x10 ⁵
<i>A. recurvata</i>	2	0	1,5x10 ⁵
<i>A. recurvata</i>	3	1,0x10 ³	1,6x10 ⁵
<i>A. recurvata</i>	2	4,0x10 ²	1,0x10 ⁵
<i>A. recurvata</i>	2	0 ⁽²⁾	-- ⁽³⁾
<i>A. recurvata</i>	4	0 ⁽²⁾	5,3x10 ⁴
<i>A. recurvata</i>	4	0 ⁽²⁾	8,0x10 ⁴
<i>A. recurvata</i>	4	0 ⁽²⁾	1,0x10 ⁵
<i>A. recurvata</i>	5	9,0x10 ²	8,0x10 ⁴
<i>A. recurvata</i>	1	3,0x10 ²	2,5x10 ⁵
<i>Bromelia antiacantha</i>	2	4,0x10 ²	-- ⁽⁴⁾
<i>B. antiacantha</i>	5	3,0x10 ²	-- ⁽⁴⁾
<i>B. antiacantha</i>	6	3,0x10 ²	-- ⁽⁴⁾
<i>Vriesea procera</i>	3	0 ⁽²⁾	1,9x10 ⁵

⁽¹⁾1 = Trilha da Lagoinha, Morro da Grotta; 2 = Praia da Pedreira, Trilha do Araçá; 3 = Trilha da Mariana, Morro do Araçá; 4 = Praia da Pedreira; 5 = Trilha da Betânia, Praia de Fora; 6 = Trilha da Fortaleza, Praia da Pedreira. ⁽²⁾não houve crescimento microbiano nestas amostras, ⁽³⁾não houve coleta de água das cisternas, ⁽⁴⁾esta espécie não forma cisterna.

Das folhas obteve-se uma média de 2,6x10² UFC/cm² de bactérias endofíticas e, da água das cisternas de 100 a 1000 vezes mais colônias bacterianas, com média de 1,2x10⁵ UFC/mL. Este fato é esperado pela maior disponibilidade de nutrientes e umidade nas cisternas comparada à folha, independente de espécies de bromélias amostradas.

As coletas foram efetuadas em todas as estações do ano e não foi observada a influência da estação em relação à quantidade de bactérias presentes nas folhas. Os períodos mais quentes causavam um dessecamento da cisterna e conseqüentemente levavam a ausência de água e impossibilitavam a amostragem.

Tabela 5 - Contagem total de bactérias nos diferentes pontos de coleta nas espécies de bromélias epífitas coletadas

Espécie bromélia Epífitas	Local coleta	Folhas (UFC/cm ²)	Água (UFC/mL)
<i>Vriesea friburgensis</i>	1 ⁽¹⁾	1,0x10 ²	-(³)
<i>V. friburgensis</i>	5	1,3x10 ³	-(³)
<i>V. friburgensis</i>	5	6,0x10 ²	-(³)
<i>V. friburgensis</i>	2	3,0x10 ²	1,0x10 ⁴
<i>V. friburgensis</i>	2	0 ⁽²⁾	-(³)
<i>V. friburgensis</i>	2	5,0x10 ²	-(³)
<i>V. friburgensis</i>	2	1,0x10 ²	1,0x10 ⁴
<i>V. friburgensis</i>	4	1,0x10 ²	1,8x10 ⁵
<i>V. friburgensis</i>	5	0 ⁽²⁾	2,1x10 ⁵
<i>V. friburgensis</i>	6	0 ⁽²⁾	1,4x10 ⁵
<i>V. friburgensis</i>	6	5,0x10 ²	1,2x10 ⁵
<i>V. friburgensis</i>	6	0 ⁽²⁾	5,0x10 ⁴
<i>V. friburgensis</i>	5	0 ⁽²⁾	1,4x10 ⁵
<i>Vriesea gigantea</i>	2	1,0x10 ²	7,0x10 ⁴
<i>V. gigantea</i>	2	0 ⁽²⁾	8,0x10 ⁴
<i>V. gigantea</i>	3	0 ⁽²⁾	3,0x10 ⁴
<i>V. gigantea</i>	3	0 ⁽²⁾	4,0x10 ⁴
<i>V. gigantea</i>	4	1,0x10 ²	5,0x10 ⁴
<i>V. gigantea</i>	5	0 ⁽²⁾	1,0x10 ⁵
<i>V. gigantea</i>	6	0 ⁽²⁾	2,0x10 ⁴
<i>Tillandsia gardneri</i>	5	1,0x10 ²	-(³)
<i>Tillandsia stricta</i>	3	1,0x10 ²	-(³)
<i>T. stricta</i>	2	0 ⁽²⁾	-(³)

(¹)1 = Trilha da Lagoinha, Morro da Grota; 2 = Praia da Pedreira, Trilha do Araçá; 3 = Trilha da Mariana, Morro do Araçá; 4 = Praia da Pedreira; 5 = Trilha da Betânia, Praia de Fora; 6 = Trilha da Fortaleza, Praia da Pedreira. (²) não houve crescimento microbiano nestas amostras, (³) não houve coleta de água das cisternas.

A diversidade e a riqueza de espécies foram analisadas nas bactérias endofíticas isoladas nas folhas e nas bactérias presentes na água das cisternas de bromélias. Há vários índices utilizados para mensurar a diversidade que são baseados na abundância relativa das espécies, tendo sido escolhido o índice de Shannon-Wiever. Os resultados podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6 - Índices de diversidade entre comunidades bacterianas endofíticas e da água das cisternas de bromélias

Local / Índices	d	H	E
Endofíticas	14,83	3,070	0,912
Água das cisternas	19,58	3,449	0,923

d= riqueza de espécies; H= índice de Shannon-Weaver; E= equitabilidade

Observou-se que o índice de diversidade de Shannon-Weaver (H), foi superior nas bactérias isoladas da água das cisternas (H=3.449) em relação ao das bactérias endofíticas (H=3.070). O índice de Equitabilidade (igualdade) refere-se ao padrão de distribuição de indivíduos entre as espécies, sendo proporcional a sua diversidade. Seu valor máximo é 1, quanto mais próximo deste valor maior é a igualdade entre as comunidades observadas (Magurran, 1988). Portanto podemos concluir que a comunidade bacteriana endofítica e a comunidade presente na água das cisternas apresentam uma boa equitabilidade entre si, ou seja, sua diversidade é bastante proporcional.

Segundo Magurran (1988), os valores de diversidade usualmente variam em torno de 1,5 a 3,5, raramente ultrapassam 4,5. Quanto maior a diversidade de um ambiente maior sua plasticidade funcional e maior sua estabilidade, de modo que perturbações externas teriam pouco efeito na funcionalidade do mesmo.

A cisterna de bromélias é um local de contato permanente com o ambiente sendo visitado por inúmeros organismos, contribuindo para o aumento de sua diversidade microbiana. Já o interior das plantas, onde encontramos

bactérias endofíticas, é um local de difícil acesso, onde os microrganismos necessitam de um aparato enzimático para penetrar nos tecidos da planta o que torna sua diversidade mais restrita.

4.4. Perfil enzimático das bactérias

Os resultados dos ensaios enzimáticos realizados com as bactérias endofíticas isoladas de bromélias estão listadas nas Tabelas 7 e 8.

Analisando cada espécie testada notou-se que houve variação na capacidade enzimática entre elas, tanto entre gêneros como dentro de uma mesma espécie. O gênero *Streptomyces* apresentou resultados positivos para todas as enzimas analisadas, confirmando o que já se tem descrito na literatura sobre o gênero ser bom produtor de enzimas extracelulares (McCarthy & Williams, 1992). O gênero *Staphylococcus* apresentou resultados positivos principalmente para a produção de celulase, esterase, pectinase e lipase. A maioria das cepas foram positivas para lipase. Este gênero apresentou uma média de duas enzimas presentes por cepa. Outros autores têm isolado *Staphylococcus* como endófitos de outras plantas e verificado a capacidade enzimática delas (Carrim *et al.*, 2006; Stamford *et al.*, 1998; Sessitsch *et al.*, 2004).

Dentre as cepas testadas do gênero *Bacillus* foi possível encontrar sempre uma cepa capaz de produzir, no mínimo, uma das enzimas testadas, sendo observada uma média de três enzimas diferentes por cepa.

Já as cepas do gênero *Micrococcus* analisadas apresentaram um número menor de enzimas, apresentando, em média, uma enzima por cepa.

Tabela 7 - Perfil enzimático das bactérias endofíticas Gram-positivas

Bactérias endofíticas	amilase	Protease	celulase	esterase	pectinase	lipase
<i>Arcanobacterium pyogenes</i> (10FI) [*]	-	+	-	+	-	-
<i>Bacillus pumilus</i> (6FIX)	-	+	+	-	+	+
<i>Bacillus pumilus</i> (16FVI)	-	-	-	-	+	-
<i>Bacillus pumilus</i> (16FIX)	-	+	+	-	+	-
<i>Bacillus sphaericus</i> (4FI)	+	+	+	-	+	+
<i>Bacillus sphaericus</i> (7FX)	-	-	+	-	-	-
<i>Bacillus megaterium</i> (6FIV)	+	+	-	-	+	+
<i>Bacillus mascerans</i> (29FIX)	+	+	+	+	+	-
<i>Bacillus subtilis</i> (29FIII)	+	+	+	+	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> (36FV)	+	-	-	-	-	+
<i>Brevibacterium casei</i> (8FI)	-	+	+	+	-	+
<i>Brevibacterium epidermidis</i> (2FI)	-	+	-	+	+	+
<i>Brevibacterium epidermidis</i> (3FII)	-	+	-	-	+	+
<i>Brevibacterium epidermidis</i> (2) [**] (16FIII/16FX)	+	-	+	+	+	+
<i>Brevibacterium linens</i> (2) (29FIV/36FVIII)	+	+	+	-	+	+
<i>Jonesia denitrificans</i> (10FII)	-	+	-	+	+	-
<i>Micrococcus luteus</i> (1FI)	-	-	-	+	-	-
<i>Micrococcus luteus</i> (2) (1FIII/3FIII)	-	-	-	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i> (10FIV)	-	+	-	-	-	+
<i>Micrococcus luteus</i> (22FII)	-	-	-	-	-	+
<i>Micrococcus luteus</i> (36FXIII)	+	-	-	-	+	+
<i>Micrococcus lylae</i> (3FI)	-	-	-	+	-	-
<i>Micrococcus lylae</i> (3) (36FXVI/36FXVII/36FXVIII)	+	-	-	-	+	-
<i>Micrococcus lylae</i> (16FV)	-	-	+	-	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus (10FVI)	-	+	+	-	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus (10FIX)	-	-	+	+	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus (5) (15FI/16FIV/19FII/19FIII/20FIII)	-	-	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus (22FIII)	-	-	-	-	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus (25FVIII)	-	-	-	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus (28FI)	-	+	+	-	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus (22FIV)	-	+	-	+	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus (29FVI)	-	-	-	-	-	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (6FX)	-	-	+	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (2) (14FII/22FVI)	-	-	-	+	+	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (26FI)	-	-	+	-	-	-
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (2) (10FVII/10FVIII)	-	-	+	+	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. (4) (33FI/33FII/36FVII/36FXI)	+	+	+	+	+	+
Total isolados (55)	17	18	28	25	29	29

[*] código de identificação das cepas; [**] número de isolados com resultados idênticos
 (+) resultados positivos; (-) resultados negativos

Tabela 8 - Perfil enzimático das bactérias endofíticas Gram-negativas

Bactérias endofíticas	amilase	protease	celulase	esterase	pectinase	lipase
<i>Acidovorax facilis</i> (35FII) [*]	-	+	-	-	-	-
<i>Acidovorax facilis</i> (36FX)	+	+	+	+	-	-
<i>Acidovorax facilis</i> (20FII)	+	-	+	-	-	+
<i>Bartonella bacilliformis</i> (20FVI)	-	-	-	-	-	-
<i>Bartonella bacilliformis</i> (36FIV)	+	+	-	-	-	-
<i>Burkholderia cepacia</i> (29FVIII)	+	+	+	-	+	-
<i>Burkholderia cepacia</i> (36FXII)	+	-	-	-	+	-
<i>Burkholderia cepacia</i> (36FXIV)	+	+	+	+	+	-
<i>Burkholderia cepacia</i> (36FXV)	+	-	+	-	-	+
<i>Burkholderia gladioli</i> (6FXIV)	-	+	+	-	-	-
<i>Burkholderia gladioli</i> (20FIV)	-	+	-	-	+	-
<i>Burkholderia gladioli</i> (29FI)	-	-	-	-	-	-
<i>Citrobacter werkmanii</i> (5FII)	-	-	-	-	+	-
<i>Enterobacter cloacae</i> (20FX)	-	-	-	-	-	+
<i>Klebsiella mobilis</i> (5FI)	+	-	-	-	+	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (5FIII)	-	-	-	-	-	-
<i>Oligella ureolytica</i> (36FVI)	-	-	-	-	-	+
<i>Ralstonia picketti</i> (2)[**] (25FII/6FVI)	+	-	+	+	-	-
<i>Xanthobacter autotrophicus</i> (25FIII)	+	-	+	-	-	-
<i>Xanthomonas campestris</i> (36FI)	+	+	+	-	+	-
Total isolados (21)	12	8	10	4	7	4

[*] código de identificação das cepas; [**] número de isolados com resultados idênticos; (+) resultados positivos; (-) resultados negativos

Entre o grupo das bactérias Gram-negativas os gêneros *Burkholderia*, *Ralstonia* e *Xanthomonas* foram os que apresentaram melhores resultados. Todas as cepas de *Burkholderia* foram positivas para amilase e apresentaram uma média de três enzimas produzidas por cepa. Apesar de haver uma diferença entre o número de isolados de bactérias endofíticas Gram-positivas (55) e de Gram-negativas (21) observou-se que metade dos isolados Gram-positivas apresentaram mais resultados positivos para celulase, pectinase e lipase. Mais da metade dos isolados Gram-negativas foram positivas para a presença da enzima amilase, notando-se uma possível preferência de substrato por parte dos

diferentes grupos bacterianos.

O gênero *Brevibacterium* apresentou pelo menos quatro das seis enzimas testadas. Sabe-se que este gênero tem uma aplicação industrial importante na maturação de queijos e outros alimentos derivados de leite (Ratray & Fox, 1999).

Os resultados dos ensaios enzimáticos realizados com as bactérias isoladas da água das cisternas encontram-se nas Tabelas 9 e 10.

Pode-se perceber que os resultados obtidos com as bactérias isoladas da água das cisternas de bromélias foram bastante semelhantes aos encontrados nas análises com as bactérias endofíticas, uma vez que muitas espécies isoladas como endófitas também foram encontradas nas amostras de água.

Entre as bactérias Gram-positivas encontradas na água das cisternas, as cepas testadas dos gêneros *Bacillus*, *Staphylococcus* e *Streptomyces* apresentaram resultados positivos para quase todos os ensaios enzimáticos, resultados semelhantes ao observado com as cepas obtidas da folhas.

Ressalta-se a presença do gênero *Nocardia*, outro actinomiceto, na água das cisternas de bromélias, que também apresentou todos os resultados positivos para os substratos testados.

Entre as bactérias Gram-negativas observou-se bons resultados quanto a presença de enzimas para as espécies *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas oryzae* e *Xanthomonas*, porém *Chromobacterium violaceum* e *Escherichia coli* não apresentaram nenhum resultado positivo para as enzimas analisadas.

Tabela 9 - Perfil enzimático das bactérias Gram-positivas isoladas da água das cisternas

Bactérias da água	amilase	protease	celulase	esterase	pectinase	lipase
<i>Aureobacterium saperdae</i> (19AVII) [*]	+	+	-	+	+	+
<i>Aureobacterium terregens</i> (24AXII)	-	-	-	+	-	-
<i>Bacillus pumilus</i> (5) [**] (5AIX/10AVII/16AI/16AII/16AIII)	.	-	+	-	+	+
<i>Bacillus pumilus</i> (2) (16AIV/19AIII)	.	+	+	-	+	+
<i>Bacillus sphaericus</i> (20AIX)	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus sphaericus</i> (5AVII/5AVIII) (2)	+	+	+	-	-	+
<i>Bacillus cereus</i> (13AVI)	+	+	-	-	-	+
<i>Bacillus cereus</i> (13AVII)	+	+	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> (16AVIII)	+	+	+	+	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> (16AXII)	+	+	-	-	-	-
<i>Brevibacterium casei</i> (20AVIII)	-	-	-	-	-	-
<i>Brevibacterium casei</i> (18AI)	-	-	+	-	-	-
<i>Brevibacterium epidermidis</i> (15AIII)	-	-	+	-	-	+
<i>Brevibacterium linens</i> (16AVI)	+	-	+	-	-	-
<i>Brevibacterium linens</i> (26AVII/26AXI) (2)	+	-	-	-	-	-
<i>Cellulomonas flavigena</i> (19AX/20AIV/25AII/26AVIII) (4)	+	-	+	-	-	-
<i>Cellulomonas flavigena</i> (3AIII)	-	-	+	-	-	-
<i>Microbacterium arborescens</i> (5AV/17AIII) (2)	+	+	-	-	+	-
<i>Micrococcus luteus</i> (14AIII/14AV) (2)	+	+	+	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i> (10AIV)	-	-	+	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i> 25AVIII)	-	-	-	-	-	-
<i>Micrococcus lylae</i> (3AII/24AXI) (2)	+	-	+	-	-	-
<i>Micrococcus roseus</i> (15AVIII)	+	-	+	-	-	-
<i>Nocardia</i> sp. (5) (1AI/1AX/11AII/16AVII/11AI)	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (2AI/2AIII/3AI) (3)	-	+	+	-	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (21AI/21AX) (2)	-	+	-	-	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (26AXII/27AI/27AIII) (3)	-	+	+	-	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (14AIX)	-	-	-	-	-	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (4AXIII/9AV/24AIII) (3)	-	-	+	-	+	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (25AVI)	-	-	+	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (17AIX/29AIII) (2)	-	-	+	-	+	-
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> (20AII)	-	-	+	+	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. (7AVI/11AVI/19AI/19AII/23AV/23AVI/29AIV) (7)	+	+	+	+	+	+
Total isolados (64)	34	34	50	17	28	27

[*] código de identificação das cepas; [**] número de isolados com resultados idênticos

(¹) resultados positivos; (²) resultados negativos

Como observado com as bactérias endofíticas, os isolados Gram-positivas provenientes da água das cisternas, também apresentaram grande versatilidade na produção de enzimas.

Tabela 10 - Perfil enzimático das bactérias Gram-negativas isoladas da água das cisternas

Bactérias da água	amilase	protease	celulase	esterase	pectinase	lipase
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (3)[**] (1AVIII/7AXI/10AII) [*]	-	-	-	+(1)	-(2)	+
<i>Burkholderia cepacia</i> (2) (20AI/24AIX)	+	-	+	-	+	-
<i>Burkholderia cepacia</i> (17AVII)	+	-	-	-	+	-
<i>Burkholderia gladioli</i> (25AI)	-	-	+	-	-	-
<i>Burkholderia mallei</i> (4) (11AIII/19AIV/19AV)	-	-	+	-	-	-
<i>Burkholderia mallei</i> (2) (12AV/18AIII)	-	-	-	-	-	-
<i>Capnocytophaga sputigena</i> (13AII)	-	+	-	-	-	-
<i>Chromobacterium violaceum</i> (2) (15AIX/15AX)	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i> (4) (6AVIII/11AIV/13AVIII/22AIII)	-	+	-	-	-	+
<i>Enterobacter sakazakii</i> (4) (14AVII/21AIX/20AX/28AII)	-	-	-	-	-	+
<i>Escherichia coli</i> (8) (1AII/1AVII/7AIII/9AIII/9AIV/10AV/20AIII/29AI)	-	-	-	-	-	-
<i>Flavimonas oryzihabitans</i> (2) (1AIII/17AVIII)	+	-	+	-	+	-
<i>Kingella denitrificans</i> (10AIII)	-	+	-	-	-	-
<i>Methylobacterium radiotolerans</i> (2) (17AII/9AVI)	+	+	-	-	-	-
<i>Methylobacterium rhodesianum</i> (14AVIII)	+	+	-	-	-	-
<i>Oligella ureolytica</i> (3) (19AVIII/25AV/25AXIII)	-	-	-	-	-	+
<i>Pantoea agglomerans</i> (3) (6AXIII/14AXII/22AV)	+	+	+	-	+	-
<i>Pantoea agglomerans</i> (2) (29AII/27AII)	+	+	+	-	-	-
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i> (9AI)	+	+	+	-	+	-
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i> (4) (27AIV/27AVII/27AVIII/27AIX)	+	+	+	-	+	+
<i>Roseomonas fauriae</i> (11AV)	-	-	-	-	-	-
<i>Serratia mascerans</i> (24AX)	+	-	+	-	+	+
<i>Xanthobacter agilis</i> (5AVI)	+	-	+	-	-	-
<i>Xanthomonas axonopodis</i> (6AII)	-	+	+	-	-	-
<i>Xanthomonas campestris</i> (4) (22AI/22AII/8AV/14AI)	+	+	+	-	-	-
<i>Xanthomonas fragariae</i> (6AVII)	-	-	+	-	-	+
Total isolados (60)	23	24	26	3	13	19

[*] código de identificação das cepas; [**] número de isolados com resultados idênticos

(+) resultados positivos; (-) resultados negativos

Foi isolado também outra espécie do gênero *Micrococcus* que não havia sido encontrada como endofítica, *Micrococcus roseus*. Essa espécie apresentou poucos resultados enzimáticos positivos, o que sugere que o gênero não deve ter muita afinidade pelos substratos analisados.

No teste da celulase e pectinase, muitos gêneros Gram-positivos e

Gram-negativos apresentaram resultados positivos para essas enzimas, como *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Cellulomonas*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Burkholderia*, *Flavimonas*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Xanthobacter* e *Xanthomonas*. A produção de celulase e pectinase pelas bactérias favoreceria a colonização inter e intracelular em plantas (Verma *et al.*, 2001).

Enzimas como a amilase, celulase, lipase e proteinase, além de atuarem na quebra de moléculas para a nutrição dos microrganismos, podem estar associadas a processos de patogênese em plantas e penetração ativa no hospedeiro (Lu *et al.*, 2005).

Os resultados obtidos demonstram a potencialidade de obtenção de bactérias produtoras de enzimas pelo estudo de cepas ambientais. As cepas com resultados positivos podem, a partir deste estudo, serem pesquisadas sobre sua capacidade qualitativa ou quantitativa de produção dessas enzimas.

Na maioria dos testes enzimáticos, um número maior de isolados Gram-positivos foram produtoras das enzimas testadas conforme pode ser observado na Tabela 11.

Notou-se que as bactérias Gram-positivas isoladas das folhas apresentaram resultados mais expressivos para as enzimas pectinase, lipase e celulase. Já entre as bactérias Gram-negativas os melhores resultados foram com os testes de amilase, celulase e protease. Sabe-se que algumas destas enzimas podem ser utilizadas pelas bactérias para sua nutrição, mas também podem estar associadas aos processos de invasão nas plantas (Verma *et al.*, 2001).

Tabela 11 – Percentagem de cepas positivas para as enzimas pesquisadas

	Nº cepas	amilase	protease	celulase	esterase	pectinase	lipase
Bactérias endofíticas							
Gram positivas	55	31%	33%	51%	45%	53%	53%
Gram negativas	21	58%	39%	48%	19%	33%	19%
Bactérias da água							
Gram positivas	64	53%	53%	78%	27%	44%	42%
Gram negativas	60	39%	40%	43%	5%	22%	32%

Foram observados resultados muito semelhantes nas bactérias isoladas da água das cisternas onde as bactérias Gram-positivas obtiveram resultados melhores para celulase, protease e amilase, enquanto que as bactérias Gram-negativas apresentaram melhores resultados com celulase, protease e amilase.

4.5. Produção de promotores de crescimento

4.5.1. Solubilização de fosfato inorgânico pelas bactérias

endofíticas

Os resultados dos testes de solubilização de fosfato inorgânico encontram-se listados nas Tabelas 12 e 13.

Tabela 12 - Resultados da capacidade das bactérias endofíticas Gram-positivas em solubilizar fosfato inorgânico	
	Resultados
<i>Arcanobacterium pyogenes</i> (10FI) [*]	-
<i>Bacillus pumilus</i> (6FIX)	-
<i>Bacillus pumilus</i> (2) [**] (16FVI/16FIX)	+
<i>Bacillus sphaericus</i> (2) (4FI/7FX)	-
<i>Bacillus megaterium</i> (6FIV)	-
<i>Bacillus mascerans</i> (29FIX)	-
<i>Bacillus subtilis</i> (2) (29FIII/36FV)	-
<i>Brevibacterium casei</i> (8FI)	-
<i>Brevibacterium epidermidis</i> (3) (2FI/16FIII/16FX)	-
<i>Brevibacterium epidermidis</i> (3FII)	+
<i>Brevibacterium linens</i> (2) (29FIV/36FVIII)	-
<i>Jonesia denitrificans</i> (10FII)	-
<i>Micrococcus luteus</i> (2) (1FI/1FIII)	-
<i>Micrococcus luteus</i> (4) (10FIV/22FII/3FIII/36FXIII)	+
<i>Micrococcus lylae</i> (3FI)	-
<i>Micrococcus lylae</i> (4) (36FXVII/16FV/36FXVII/36FXVIII)	+
<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> (11) (15FI/16FIV/19FII/19FIII/20FIII/22FIII/25FVIII/28FI/22FIV/29FIV/35FI)	+
<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> (2) (10FVI/10FIX)	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (4) (14FII/22FVI/6FX/16FI)	+
<i>Staphylococcus saprophyticus subsp. saprophyticus</i> (2) (10FVII/10FVIII)	+
<i>Streptomyces</i> sp. (4) (33FI/33FII/36FVII/36FXI)	+
Total isolados (55)	34

[*] código de identificação das cepas; [**] número de isolados com resultados idênticos
(+) resultados positivos; (-) resultados negativos

Da mesma forma, como foi observado para a produção de outras enzimas extracelulares observamos que há mais cepas Gram-positivas envolvidas na solubilização de fosfato inorgânico que cepas Gram-negativas, apesar do número de espécies ser semelhante.

De um total de 55 isolados de bactérias Gram-positivas encontramos 34 isolados solubilizando fosfato como os gêneros *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Cellulomonas*, *Micrococcus*, *Staphylococcus* e *Streptomyces*. Porém somente com ensaios em casa de vegetação seria possível comprovar que tal fato ocorra na natureza como demonstrado *in vitro*.

Também foi possível observar que há uma variação nos resultados entre isolados da mesma espécie, como por exemplo entre *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*.

Dos 21 isolados de bactérias Gram-negativas, onze isolados expressaram resultados positivos para os testes de solubilização de fosfatos, entre eles encontramos os gêneros *Acidovorax*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Oligella*.

Os gêneros mais freqüentemente descritos em processos de solubilização de fosfato tem sido *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Rhizobium*, *Staphylococcus*, *Agrobacterium*, *Micrococcus* e *Erwinia*, sendo que vários desses gêneros foram observados neste trabalho (Rodríguez & Fraga, 1999; Sessitsch *et al.*, 2004; Harris *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008).

As bactérias solubilizadoras de fosfato tem um papel importante na nutrição das plantas e seu uso em lavouras. Seu uso como biofertilizante nas lavouras apresenta-se como uma importante contribuição para diminuição na utilização de compostos fosforados. Porém há poucos estudos sobre a eficiência de tais bactérias neste processo e dos mecanismos envolvidos na interação destas com as plantas (Bashan & Holguin, 1998; Vessey, 2003).

Tabela 13 - Resultados da capacidade das bactérias endofíticas Gram-negativas em solubilizar fosfatos inorgânicos

Bactérias endofíticas (*)	Resultados
<i>Acidovorax facilis</i> (2)[**] (35FII/26FX) [*]	+
<i>Acidovorax facilis</i> (20FII)	-
<i>Bartonella bacilliformis</i> (2) (20FVI/36FIV)	-
<i>Burkholderia cepacia</i> (4) (29FVIII/36FXII/36FXIV/36FXV)	+
<i>Burkholderia gladioli</i> (6FXIV)	+
<i>Burkholderia gladioli</i> (2) (20FIV/29FI)	-
<i>Citrobacter werkmanii</i> (5FII)	+
<i>Enterobacter cloacae</i> (20FX)	+
<i>Klebsiella mobilis</i> (5FI)	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (5FIII)	-
<i>Oligella ureolytica</i> (36FVI)	+
<i>Ralstonia picketti</i> (2) (25FII/6FVI)	-
<i>Xanthobacter autotrophicus</i> (25FIII)	-
<i>Xanthomonas campestris</i> (36FI)	-
Total isolados (21)	(11)

[*] código de identificação das cepas; [**] número de isolados com resultados idênticos
(+) resultados positivos; (-) resultados negativos

4.5.2. Produção de ácido indol acético pelas bactérias

endofíticas

Os resultados dos testes de detecção da produção de ácido indol acético pelas bactérias endofíticas estão nas Tabelas 14 e 15.

Os resultados obtidos na detecção da produção de ácido indol acético foram divididos conforme as metodologias utilizadas. Portanto, dos 55 isolados de bactérias Gram-positivas, obtivemos 31 cepas bacterianas com a produção do ácido indol acético evidenciado na utilização do reativo R1, onde temos *Bacillus pumilus*, *Bacillus sphaerius*, *Bacillus macerans*, *Bacillus subtilis*, *Brevibacterium epidermidis*, *Brevibacterium linens*, *Cellulomonas flavigena*, *Jonesia denitrificans*, *Micrococcus luteus*, *Micrococcus lylae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus*

epidermidis, *Staphylococcus saprophyticus* e *Streptomyces* sp.

Com a utilização do reativo R2 temos 26 isolados apresentando resultados positivos para o teste, como *Bacillus pumilus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus macerans*, *Bacillus subtilis*, *Brevibacterium epidermidis*, *Brevibacterium linens*, *Cellulomonas flavigena*, *Micrococcus luteus*, *Micrococcus lylae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Streptomyces* sp.

Quando foi empregada a membrana de nitrocelulose para detecção da produção de ácido indol acético foram identificados 20 isolados expressando resultados positivos, como *Arcanobacterium pyogenes*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus macerans*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus subtilis*, *Brevibacterium epidermidis*, *Jonesia denitrificans*, *Micrococcus lylae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Streptomyces* sp.

Encontramos apenas 13 isolados que tiveram a detecção da produção do fitormônio nas duas metodologias empregadas, como *Bacillus pumilus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus macerans*, *Bacillus subtilis*, *Brevibacterium epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Streptomyces* sp.

Tabela 14 - Resultados da produção de ácido indol acético pelas bactérias endofíticas Gram-positivas

	(R1) ^a	(R2) ^a	Membrana ^b
<i>Arcanobacterium pyogenes</i> (10FI) [*]	-	-	+
<i>Bacillus pumilus</i> (6FIX)	+	-	-
<i>Bacillus pumilus</i> (16FVI)	+	+	-
<i>Bacillus pumilus</i> (16FIX)	+	+	+
<i>Bacillus sphaericus</i> (7FX)	+	+	+
<i>Bacillus sphaericus</i> (4FI)	-	-	-
<i>Bacillus megaterium</i> (6FIV)	-	+	-
<i>Bacillus mascerans</i> (29FIV)	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i> (2) [**] (36FV/29FIII)	+	+	+
<i>Brevibacterium casei</i> (8FI)	-	-	-
<i>Brevibacterium epidermidis</i> (2FI)	-	+	-
<i>Brevibacterium epidermidis</i> (3FII)	+	+	+
<i>Brevibacterium epidermidis</i> (16FII)	+	+	-
<i>Brevibacterium epidermidis</i> (16FX)	-	-	-
<i>Brevibacterium linens</i> (36FVIII)	+	+	-
<i>Brevibacterium linens</i> (29FIV)	-	-	-
<i>Jonesia denitrificans</i> (10FII)	+	-	+
<i>Micrococcus luteus</i> (3) (1FI/1FIII/3FIII)	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i> (3) (10FIV/22FII/36FXIII)	+	+	-
<i>Micrococcus lylae</i> (2) (3FI/16FV)	+	+	-
<i>Micrococcus lylae</i> (36FXVI)	-	-	+
<i>Micrococcus lylae</i> (2) (36FXVII/36FXVIII)	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (2) (10FVII/10FIX)	-	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (15FI)	+	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (7) (16FIV/19FII/19FIII/28FI/20FIII/25FV/22FIII)	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (2) (35FI/22FIV)	+	+	-
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (29FVI)	+	+	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (26FI)	+	+	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (14FII)	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (22FVI)	+	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (6FX)	-	-	+
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (10FVII)	+	+	+
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (10FVIII)	+	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. (4) (33FI/33FII/36FVII/36FXI)	+	+	+
Total isolados (55)	31	26	20

^a método descrito por Glickmann & Dessaux, (1995); ^b método descrito por Bric *et al.*, (1991); [*] código de identificação das cepas; [**] número de isolados com resultados idênticos

Tabela 15 - Resultados da produção de ácido indol acético pelas bactérias endofíticas Gram-negativas

	(R1) ^a	(R2) ^a	Membrana ^b
<i>Acidovorax facilis</i> (2) [**] (35FII/36FX) [*]	+	+	+
<i>Acidovorax facilis</i> (20FII)	-	-	-
<i>Bartonella bacilliformis</i> (36FIV)	+	+	-
<i>Bartonella bacilliformis</i> (20FVI)	+	+	+
<i>Burkholderia cepacia</i> (3) (36FXII/36FXIV/36FXV)	-	-	-
<i>Burkholderia cepacia</i> (29FVIII)	-	+	-
<i>Burkholderia gladioli</i> (29FI)	-	+	-
<i>Burkholderia gladioli</i> (6FXIV)	+	+	+
<i>Burkholderia gladioli</i> (20FIV)	+	-	-
<i>Citrobacter werkmanii</i> (5FII)	+	+	+
<i>Enterobacter cloacae</i> (20FX)	+	+	-
<i>Klebsiella mobilis</i> (5FI)	+	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (5FIII)	+	+	+
<i>Oligella ureolytica</i> (36FVI)	-	-	-
<i>Ralstonia pickettii</i> (25FII)	+	+	-
<i>Ralstonia pickettii</i> (6FVI)	-	-	-
<i>Xanthobacter autotrophicus</i> (25FIII)	-	-	-
<i>Xanthomonas campestris</i> (36FI)	+	+	-
Total isolados (21)	12	12	6

^a método descrito por Glickmann & Dessaux, (1995); ^b método descrito por Bric *et al.*, (1991); (+) resultados positivos; (-) resultados negativos; [*] código de identificação das cepas; [**] número de isolados com resultados idênticos

Dentre os 21 isolados de bactérias Gram-negativas foi observado 12 cepas produzindo ácido indol acético e sendo detectados pelos reativos R1 e R2, onde temos *Acidovorax facilis*, *Bartonella baciliformis*, *Burkholderia gladioli*, *Citrobacter werkmanii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella mobilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Ralstonia pickettii* e *Xanthomonas campestris*.

Já quando foi empregada a metodologia da membrana de nitrocelulose foi observado apenas seis cepas expressando resultados positivos para a produção de ácido indol acético, como *Acidovorax facilis*, *Bartonella baciliformis*, *Burkholderia gladioli*, *Citrobacter werkmanii*, *Klebsiella mobilis* e *Klebsiella*

pneumoniae.

Glickmann & Dessaux (1995) observaram que o reativo R1 seria mais eficiente na detecção do ácido indol acético, pois detecta, além do ácido indol acético, os seus intermediários como o ácido indol pirúvico (IPyA) e ácido indolacetamida (IAM). Isto quer dizer que a transformação de triptofano a ácido indol acético pode estar em andamento. Segundo os mesmos autores, a concentração de ácido sulfúrico de 10,8M do reativo R2 poderia interferir nos resultados, oxidando o ácido indol acético, promovendo com isso um resultado falso negativo. Porém, notamos que em algumas cepas foi detectada a produção de ácido indol acético somente com este reativo.

Já a metodologia com menor detecção foi a descrita por Bric *et al.* (1991), onde utilizou-se uma membrana de nitrocelulose. Esta metodologia apresentou várias limitações, pois caso a colônia cresça muito em tamanho, o ácido indol acético espalha-se na membrana e dificultando a interpretação do resultado.

Em todas as metodologias utilizadas foi detectado um número maior de bactérias Gram-positivas que produziam ácido indol acético do que bactérias Gram-negativas. Pode-se verificar que todas as cepas de *Bacillus pumilus* testadas foram positivas para o teste, enquanto que as outras espécies testadas variaram de acordo com a cepa.

As bactérias endofíticas produtoras de ácido indol acético descritas no presente trabalho já foram encontradas em outras plantas com resultados semelhantes (Li *et al.*, 2008; Verma *et al.*, 2001; Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2005).

4.5.3. Capacidade de fixação biológica de nitrogênio pelas bactérias endofíticas

Os resultados dos testes para verificação da capacidade de fixação biológica do nitrogênio estão apresentados na Tabela 16.

Dos 21 isolados de bactérias Gram-negativas foram encontradas 13 cepas com habilidade para crescer no meio isento de nitrogênio denominado LGI-P, onde temos *Acidovorax facilis*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia gladioli*, *Citrobacter werkmanii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella mobilis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Xanthobacter autotrophicus*. Já no meio denominado JMV obtivemos oito isolados bacterianos apresentando crescimento neste meio como *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia gladioli*, *Citrobacter werkmanii*, *Enterobacter cloacae* e *Klebsiella mobilis*.

No entanto no meio JNFb não houve nenhuma cepa apresentando resultados positivos. Talvez pelo fato deste meio de cultivo ter sido desenvolvido para detectar cepas do gênero *Herbaspirillum* fixadoras de nitrogênio, podendo ser muito específico para esta espécie e portanto não permitir a detecção de outras bactérias.

São descritos como bactérias diazotróficas os gêneros *Frankia*, *Paenibacillus*, *Clostridium*, *Gluconacetobacter*, *Beijerinckia*, *Xanthobacter*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Pantoea* e *Serratia*.

Tabela 16 - Resultado do potencial das bactérias endofíticas em fixar nitrogênio atmosférico

Bactérias endofíticas	LGI-P	JMV	JNFb
<i>Acidovorax facilis</i> (2)[**] (20FII/36FX) [*]	-	-	-
<i>Acidovorax facilis</i> (35FII)	+	-	-
<i>Bartonella bacilliformis</i> (36FIV)	-	-	-
<i>Bartonella bacilliformis</i> (20FVI)	-	-	-
<i>Burkholderia cepacia</i> (4) (36FXV/36FXIV/29FVIII/36FXII)	+	+	-
<i>Burkholderia gladioli</i> (20FIV)	+	+	-
<i>Burkholderia gladioli</i> (6FXIV)	+	-	-
<i>Burkholderia gladioli</i> (29FI)	-	-	-
<i>Citrobacter werkmanii</i> (5FII)	+	+	-
<i>Enterobacter cloacae</i> (20FX)	+	+	-
<i>Klebsiella mobilis</i> (5FI)	+	+	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (5FIII)	+	-	-
<i>Oligella ureolytica</i> (36FVI)	-	-	-
<i>Ralstonia picketti</i> (2) (6FVI/25FII)	-	-	-
<i>Xanthobacter autotrophicus</i> (25FIII)	+	-	-
<i>Xanthomonas campestris</i> (36FI)	-	-	-
Total isolados (22)	13	8	-

[*] código de identificação das cepas; [**] número de isolados com resultados idênticos
 (+) resultados positivos; (-) resultados negativos; (*) número de isolados com mesmo resultado;
 (**) código de identificação das cepas;

Algumas espécies do gênero *Burkholderia* fixadoras de nitrogênio têm sido descritas como associativas, outras como simbióticas, outras como severos patógenos humanos e/ou promotoras de crescimento em plantas e até endossimbióticas de fungos micorrízicos. Revela uma surpreendente capacidade desse gênero na interação com plantas, animais e outros microrganismos (Minerdi et al., 2001).

5. CONCLUSÃO

De acordo com os dados obtidos, podemos concluir que:

1. Através do índice de diversidade de Shannon-Weaver ficou demonstrado que a diversidade bacteriana na água das cisternas foi maior do que no interior das folhas das bromélias.

2. Verificou-se que uma média de 47% das bactérias endofíticas produziram o fitormônio ácido indol-acético (AIA).

3. Observou-se que 59% das bactérias endofíticas apresentaram habilidade para fixação de nitrogênio atmosférico no meio LGI-P e que apenas 36% destas foram capazes de fixar nitrogênio atmosférico no meio JMV e nenhuma delas apresentou resultados positivos no meio JNFb.

4. Notou-se que 59% das bactérias endofíticas isoladas foram capazes de solubilizar o fosfato insolúvel contido no meio de cultivo.

5. As bactérias endofíticas apresentaram boa afinidade enzimática com os substratos testados e pode-se observar comportamento semelhante com as bactérias isoladas da água das cisternas das bromélias.

6. PERSPECTIVAS

Como perspectivas para estudos futuros podemos citar que:

- Os isolados serão encaminhados para seqüenciamento para confirmação da identificação bioquímica;
- Aplicação de PCR com oligonucleotídeos específicos para pesquisa dos genes *nif* nas bactérias positivas para a fixação biológica de nitrogênio;
- Determinação da atividade das enzimas e seleção das melhores; e
- Avaliação *in vivo* das bactérias endofíticas da sua capacidade de produzir ácido indol acético, da fixação biológica de nitrogênio e da solubilização de fosfatos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ-MACARIE, E. *et al.* Molecular characterization of the gene encoding an esterase from *Bacillus licheniformis* sharing similarities with lipases. **Biotechnology Letters**, Netherlands, v. 21, p. 313, 1999.

APG II (Angiosperm Phylogeny Group). An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APGII. **Botanical Journal of the Linnean Society**, New York, v. 141, p. 399-436, 2003.

ASSIS, S.M.P. *et al.* Bactérias endofíticas – método de isolamento e potencial antagônico no controle da podridão negra em repolho. **Summa Phytopathologica**, St Paul, v.24, p.216-220, 1998.

ARAÚJO, F.V. A preliminary note on yeast communities of bromeliad-tank waters of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 29, p. 118-121, 1998.

ARAÚJO, J.M. *et al.* Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 43, n.4, p. 115-120, 2000.

ARAÚJO, W.L. *et al.* **Manual**: isolamento de microrganismos endofíticos. CALQ, Piracaba, 86p. 2002a.

ARAÚJO, W.L. *et al.* Diversity of endophytic bacteria populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p.4906-4914. 2002b.

ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial ecology**: fundamentals and applications. Cummings Publishing Company, Inc. 1997.

AZEVEDO, J.L. *et al.* Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. IN: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. **Biotecnologia**: avanços na agricultura e na agroindústria. Caxias do Sul: EDUCS, 2002. 433p.

BALDANI, V.L.D. *et al.* Meios de cultura específicos para o isolamento de bactérias endofíticas que fixam nitrogênio atmosférico. Comunicado Técnico n.12, CNPAB, p.1-4, 1996.

BALDANI, J.I. *et al.* Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.29, p. 911-922, 1997.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, São Paulo, v. 77, n. 3, p. 549-579, 2005.

BALOTA, E.L. *et al.* Interações e efeitos fisiológicos de bactérias diazotróficas e fungos micorrizicos arbusculares na mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 1335-1345, 1995.

BASHAN, Y.; HOLGUIM, G. Proposal for the division of plant growth promoting rhizobacteria into two classifications : biocontrol – PGPB (plant growth promoting bacteria) and PGPB. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 30, p. 1225-1228, 1998.

BELLA, R. S.; ALTOSAAR, I. Purification and some properties of the extracellular alfa-amylase from *Aspergillus awamori*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 31, p. 149-156, 1985.

BENNET, B.C. Ethnobotany of *Bromeliaceae*. In: BENZING, D.H. **Bromeliaceae**: Profile of an adaptative radiation. Cambridge University Press, Cambridge, 2000.

BENSON, D.R.; SILVESTER, W.B. Biology of *Frankia* strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 57, n.2, p. 293-319, 1993.

BHANDARKAR, S.V.; NEAU, S.H. Lipase-catalyzed enantio selective esterification of flurbiprofen with n-butanol. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso.

BHAT, M.K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, New York, v. 15, p. 583-620, 1997.

BOHLOOL, B.B. *et al.* Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture: a perspective. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 141, n. 1, p. 1-11, 1992.

BORNSCHEUER, U.T. Microbial carboxylesterases: classification, properties and application in biocatalyses. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 26, p. 73-81, 2002.

BRIC, J.M. *et al.* Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, n.2, p. 535-538, 1991.

BROOKS, D.S. *et al.* Evaluation of endophytic bacteria as potential biological-control agents for oak wilt. **Biological Control**, San Diego, v. 4, n. 4, p. 373-380, 1994.

BURKET, J.F. *et al.* Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. **Bioresource Technology**, Essex, Inglaterra, v. 91, p. 77-84, 2004.

CAO, Z.; CHEN, A. Screening of pectinase producer from alkalophilic bacteria and study on its potential application in degumming of ramie. **Enzyme and Microbiology Technology**, New York, v.14, p.1013-1016, 1992.

CASTRO, H.F.; ANDERSON, W.A. Fine chemicals by biotransformation using lipases. **Química Nova**, São Paulo, v. 18, p. 544-561, 1995.

CARRIM, A.J.I. *et al.* Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* cham. (carobinha-do-campo). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, São Paulo, v. 49, n. 3, p. 353-359, 2006.

CEPSRM (Centro Estadual de Pesquisas em Sensoriamento Remoto e Metrologia) **Projeto Mosaico de Imagem do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: UFRGS. Disponível em <<http://www.sct.rs.gov.br/programas/mosaico/index.htm>>. (Acesso em 20/04/2008).

CHEN, C. *et al.* Biological control of *Fusarium* wilt on cotton by use of endophytic bacteria. **Biological Control**, San Diego, v. 5, n. 1, p. 83-91, 1995.

CHEN, H. *et al.* Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rizosphere of crop plants of Korea. **Soil, Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 37, p. 1970-1974, 2005.

COSTACURTA, A.; VANDERLEYDEN, J. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 21, n. 1, p. 1-18, 1995.

CRIQUET, S. Measurement and characterization of cellulase activity in sclerophyllus forest litter. **Journal of Microbiological Methods**, London, v.50, p.165-173, 2002.

CRUZ, L.M. et al. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from Banana (*Musa* sp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 2, p. 2375-2379, 2001.

Da SILVA, R. *et al.* Pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, São Paulo, v. 31, p. 249-260, 1997.

DÖBEREINER, J. et al. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: EMBRAPA-SPI; Itaguaí: EMBRAPA-CNPAB, 1995. 60p.

DUNN, C. *et al.* Bacterial extracellular protease activities in field soils under different fertilizer managements. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 49, p. 305-312, 1997.

FERREIRA, A.C.K. Biodiversidade de aranhas de solo em uma área de restinga do Parque Estadual de Itapuã, Viamão, RS, BR. Dissertação de mestrado. Porto Alegre, PUCRS. 2005. 76p.

FONTOURA, T. Distribution patterns of five Bromeliaceae genera in Atlantic Rain Forest, Rio de Janeiro State, Brazil. **Selbyana**, Netherlands, v.16, n1, p.79-93, 1995.

FUGLSANG, C.C. *et al.* Antimicrobial enzymes: applications and future potential in the food industry. **Trends in Food Science and Technology**, Frankfurt, v. 6, p. 390-396, 1995.

GANDHI, N.N. Applications of lipases. **Journal of the American Oil Chemists Society**, New York, v. 74, p. 621-634, 1997.

GLICK, B.R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 41, p. 109-117, 1995.

GLICKMANN, E.; DESSAUX, Y. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 2, p. 793-796, 1995.

- GRANT, J.R.; ZIJLSTRA, G. An annotated catalogue of the generic names of the *Bromeliaceae*. **Selbyana**, Netherlands, v.19, p. 91-121, 1998.
- GUMMADI, S.N.; KUMAR, D.S. Microbial pectic transeliminases. **Biotechnology Letters**, London, v.27, p.451-458, 2005.
- GUPTA, R. *et al.* Microbial alpha-amylases: a biotechnological perspective. **Process Biotechnology**, London, v.38, p.1599-1616, 2003.
- HABA, E. *et al.* Isolation of lipase-secreting bacteria by deploying used frying oil as selective substrate. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.26, p.40-44, 2000.
- HAGIHARA, *et al.* Novel alfa-amilase that is highly resistant to chelating reagents and chemical oxidants from the alkaliphilic *Bacillus* sp isolate KM-K38. **Applied and Environmental Microbiology**, Whashington, v.67, p.1744-1750, 2001.
- HAGLER, A.N. *et al.* Yeast and coliform bacteria of accumulated in bromeliads of mangrove and sand dune ecosystems of southeast Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 39, p. 973-977, 1993.
- HALLMANN, J. *et al.* Bacterial endophytes in agriculture crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.43, p.895-914, 1997.
- HARRIS, J.N. *et al.* Laboratory tests can predict beneficial effects of phosphate-solubilizing bacteria on plants. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.38, p.1521-1526, 2006.
- HASAN, F. *et al.* Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 39, n.2, p.235-251, 2006.
- HERRMANN, G. *et al.* Scale up of enzymatic peptide synthesis in an enzyme membrane reactor. **Biotechnology Applied Biochemistry**, London, v. 13, p. 346-353, 1991.
- HOLT, G. *et al.* **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed. New York: Springer, 2001. 4v. il.
- HOONDAL, G.S. *et al.* Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. **Applied and Microbiology and Biotechnology**, Berlim, v.59, p.409-418, 2002.
- HOUDE, A. *et al.* Lipases and their industrial applications: an overview. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Berlim, v. 3, p. 118-125, 2004.

INIGUEZ, A.L. *et al.* Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, London, v. 17, n. 10, p. 1078-1085, 2004.

JAEGER, K.E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion Biotechnology**, London, v. 13, p. 390-397, 2002.

JAEGER, K.E.; REETZ, M.T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Tibtech**, Frankfurt, v. 16, p. 396-403, 1998.

JAEGER, K.E. *et al.* Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures and biotechnological applications of lipases. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 53, p. 315-351, 1999.

JAMES, E.K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 38, p. 1-13, 2000.

KIM, K.J.A. *et al.* Production of alpha-glucosidase inhibitor by beta-glucosidase inhibitor producing *Bacillus lentimorbus* B-6. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v.12, p. 895-900, 2002.

KIMURA, Y. *et al.* Synthesis peptides consisting of essential amino acids by a reactor system using three proteinases and an organic solvent. **Agricultural and Biological Chemistry**, Kyoto, Japan, v. 54, p. 3331-3333, 1990.

KUKLINSKI-SOBRAL, L. *et al.* Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 6, n.12, p. 1244-1251, 2004.

LACEY, J. Actinomycetes in composts. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, New York, v. 4, p. 113-121, 1997.

LANDELL, M.F. *et al.* Biodiversity of yeasts associated to bromeliads in Itapuã park, Viamão/RS. **Biociências**, Porto Alegre, v. 14, n. 2, p. 144-149, 2006.

LANG, C.; DORNENBURG, H. Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Washington, v.53, p.366-375, 2000.

LEE, J. *et al.* Two cases of *Chromobacterium violaceum* infection after injury in a subtropical region. **Journal of Clinical Microbiology**, San Diego, v. 37, n. 6, p. 2968-2970, 1999.

LEME, E.M.C. **Bromélias na natureza**. Rio de Janeiro, Ed. Marigo Comunicação Visual, 1993.

LI, J. H. *et al.* Genetic diversity and potential for promoting of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.40, p. 238-246, 2008.

LIU, L. *et al.* Induction of systematic resistance in cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria: duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. **Phytopathology**, St. Paul, v. 85, p. 1064-1068, 1995.

LONG, S.R. Rhizobium symbiosis: Nod factors in perspective. **The Plant Cell**, Rockville, v.8, p.1885-1898, 1996.

LU, W.J. *et al.* Isolation and characterization of mesophilic cellulose-degrading bacteria from flower stalks-vegetable waste co-composting system. **Journal of General Applied Microbiology**, New York, v. 51, p. 353-360, 2005.

LYND, L.R. *et al.* Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, St Paul, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

MAAREL, M.J.E.C. *et al.* Properties and applications of starch-converting enzymes of the alfa-amylase family. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.94, p.137-155, 2002.

MAGALHÃES, B.P.; FARIAS, M.R. Desenvolvimento de bioinseticida para controle de gafanhotos no Brasil. Em: **Curso de controle microbiano de inseto**. Brasília, Embrapa, 1996. 6-11. 4^o anais.

MaCFADDIN, J.M.Q. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. Baltimore: Williams & Wilkins, 2000. 912p.

MANULIS, S. *et al.* Differential involvement of índole-3-acetic acid biosynthetic pathways in pathogenicity and epiphytic fitness of *Erwinia herbicola* pv. *gysophila*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 11, n. 7, p. 634-642, 1998.

MAGURRAN, A. E. **Ecological diversity and its measurement**. Princeton University Press, 1988. 177p.

MARIN, V.A. *et al.* **Fixação biológica de nitrogênio: bactérias fixadoras de nitrogênio de importância para a agricultura tropical**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1999. 34p. (Embrapa - CNPAB. Documentos, 91).

MARTÍNEZ, L. *et al.* Diazotrophic bacteria associated with banana (*Musa* sp.). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 257, p. 35-47, 2003.

McCARTHY, A.J.; WILLIAMS, S.T. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment. **Gene**, Frankfurt, v.115, p. 189-192, 1992.

McCULLY, M.E. Niches for bacterial endophytes in crop plants: a biologist view. **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v. 28, n. 9, p. 983-990, 2001.

McINROY, J.A.; KLOEPPER, J.W. Population dynamics of endophytic bacteria in field grown sweet corn and cotton. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 41, p. 895-901, 1995a.

McINROY, J.A.; KLOEPPER, J.W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. **Plant and Soil**, Oxford, v. 17, p.337-342, 1995b.

MESTRE, L.A.M. *et al.* Macroinvertebrate fauna associated to the bromeliad *Vriesea inflata* of the Atlantic Forest (Paraná State, Southern Brazil). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, São Paulo, v. 44, n. 1, p. 89-94, 2001.

MINERDI, D. *et al.* Nitrogen fixation genes in an endosymbiotic *Burkholderia* strain. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 725-732, 2001.

MONTER, B. *et al.* Kinetically controlled synthesis of dipeptides using ficin as biocatalyst. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, Berlim, v. 14, p. 183-191, 1991.

NEJAD, P.; JOHNSON, P.A. Endophytic bacteria induce growth promotion and wilt disease supression in oil seed rape and tomato. **Biological Control**, San Diego, v. 18, n. 3, p. 208-215, 2000.

NETO, P.A.S.P. *et al.* Microrganismos endofíticos. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.29, p. 62-76, 2003.

NIELSEN, E.; BORCHERT, A. Protein engeneering of bacterial alfa-amilases. **Biochmica et Biophysica Acta**, London, v. 1543, p. 253-274, 2000.

OLIVEIRA, M.G.N. *et al.* A comunidade animal associada à bromélia-tanque *Neoregelia cruenta* (R. Graham) L.B. Smith. **Bromélia**, São Paulo, v.1, p.22-29, 1994.

OLIVEIRA, M.G.N.; ROCHA, C.F.D. O efeito da complexidade da bromélia-tanque *Neoregelia cruenta* (R. Graham) L.B. Smith. **Bromélia**, São Paulo, v.4, p.13-22, 1997.

OLIVEIRA, A.L.M. *et al.* **Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal.** Seropedica: Embrapa Agrobiologia, ago. 2003. 40p. (Embrapa Agrobiologia documentos 161).

OMURA, S. The expanded horizon for microbial metabolites - a review. **Gene**, Frankfurt, v.115, p. 141-149, 1992.

PAGGI, G.M. **Biologia reprodutiva e estudo da fertilidade de *Vriesea gigantea* (Gaud, 1846), Bromeliaceae.** PPG em Genética e Biologia Molecular (Dissertação), 102p. 2006.

PAIVA, A.L. *et al.* Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, NNew York, v.27, p187-204, 2000.

PANDA, T.; GOWRIHANKAR, B.S. Production and applications of esterases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.67, p. 160-169, 2005.

PANDEY, A. *et al.* Effect of various flours on the production of thermostable beta-amylase and pullulanase by *Clostridium thermosulfurogenes* SV2. **Bioresarch Technology**, San Diego, v.76, p.169-171, 2001.

PAULA, C.C.; SILVA, H.M.P. **Cultivo prático de bromélias.** 1ºed. Editora UFV: Viçosa, 70p, 2000.

PATTEN, C.; GLICK, B.R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 42, p. 207-220, 1996.

PEOPLES, M.B.; CRASWELL, E.T. Biological nitrogen fixation; investments, expectations and actual contributions to agriculture. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 141, n. 1, p. 13-39, 1992.

PURI, M. *et al.* Optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. by response surface methodology. **Current Opinion**, Oxford, v. 44, p. 286-290, 2002.

RAGHOTHAMA, K.G. Phosphate aquisition. **Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 665-693, 1999.

RAO, E.A. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, London, v. 62, p. 597-635, 1998.

RATTRAY, F.P.; FOX, P.F. Aspects of enzymology and biochemical properties of *Brevibacterium linens* relevant to cheese ripening: a review. **Journal of Dairy Science**, Denmark, v. 82, p. 891-909, 1999.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Interactions of graminaceous plants with *Azoarcus* sp. and other diazotrophs: identification, localization and perspectives to study their function. **Critical Review in Plant Science**, Boca Raton, v. 17, p. 29-54, 1998.

REIS, V.M. *et al.* Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm tree. **Critical Review in Plant Science**, Boca Raton, v. 19, p. 227-247, 2000.

REITZ, R. **Bromeliáceas e a malária - bromélia endêmica**. Flora Ilustrada Catarinense, Itajaí, SC, parte 1, p. 1-58, 1983.

RIO GRANDE DO SUL. **Plano de manejo**: Parque Estadual de Itapuã. Porto Alegre: Departamento de Recursos Naturais e Renováveis.. 158p. 1997.

RIVERO, J.A. Two bromeliad frogs from Andes of Venezuela. **Journal of Bromeliad Society**, Berlim, v. 39, p. 26-27, 1989.

ROCHA, C.F.D. *et al.* Bromélias: ampliadoras da biodiversidade. **Bromélia**, São Paulo, v.4, p.7-10, 1997.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 17, p. 319-339, 1999.

RUIVO, C.C. *et al.* *Candida bromeliacearum* sp. nov. and *Candida ubatubensis* sp. nov., two yeast species isolated from the water tanks of *Canistropsis seidelli* (Bromeliaceae). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 55, p. 2213-2217, 2005.

SAKAI, T. *et al.* Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. **Advances and Applied Microbiology**, New York, v.39, p.213-294, 1993.

SAMBROOK, J. *et al.* **Molecular cloning a laboratory manual**. 2º ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. New York.

SEMA, Unidades de Conservação. www.sema.rs.gov.br. Acesso em março/2007.

SESSITSCH, A. *et al.* Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 50, p. 239-249, 2004.

SHANNON, C.E.; WEAVER, W. **The Mathematical Theory of Communication**. Urbana, IL: University of Illinois Press, 1963.

SOARES, M.C.N. *et al.* Screening of bacterial strains for pectinolytic activity: characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus* sp. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.30, p.299-303, 1999.

STAMFORD, T.L.M. *et al.* Atividade enzimática de microrganismos isolados do Jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 4, p. 382-385.

STEELE, D.B.; STOWERS, M.D. Techniques for selection of industrially important microorganisms. **Annual Reviews Microbiology**, Palo Alto, v. 45, p. 89-106, 1991.

STURZ, A.V.; CHRISTIE, B.R. Endophytic bacteria systems governing red clover growth and development. **Annual Applied Biology**, Palo Alto, v. 126, p. 285-290, 1995.

STURZ, A.V.; CHRISTIE, B.R. Endophytic bacteria of red clover as agent of allelopathic clover-maize syndromes. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 28, p. 583-588, 1996.

STURZ, A.V. *et al.* Biodiversity of endophytic which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. **Biology and Fertility of Soils**, Berlim, v. 25, p. 13-19, 1997.

STURZ, A.V.; NOWAK, J. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 15, p. 183-190, 2000.

SURETTE, M.A. *et al.* Bacterial endophytes in processing carrots (*Daucus carota* L. var. *sativus*): Their localization, population density, biodiversity and their effects on plant growth. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 253, p. 381-390, 2003.

SYLVESTER-BRADLEY, R. *et al.* Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfato na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na **Amazônia**. **Acta Amazônica**, Amazonas, v.12, p.15-22, 1982.

TEATHER, R.N.; WOOD, P.J. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.43, p.777-780, 1984.

VAN BEILEN, J.B. Enzyme technology: an overview. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 14, n.4, p. 338-344, 2002.

VESSEY, J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 255, p. 571-586, 2003.

VERGER, R. Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. **Trends Biotechnology**, New York, v. 15, p. 32-38, 1997.

VERMA, S.C. et al. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 91, p. 127-141, 2001.

VIHINEM, M.; MANTSALA, P. Microbial amylolytic enzymes. **Critical Review of Biochemistry and Molecular Biology**, Boca Raton, v. 24, p. 329-418, 1989.

WALDEMAR, C.C.; IRGANG, B.E. Ocorrência do mutualismo facultativo entre *Dyckia marítima* (Bromeliaceae) e o cupim *Cortaritermes silvestrii*, em afloramentos rochosos no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, RS. **Acta Botânica Brasílica**, São Paulo, v.17, p. 37-48, 2003.

WEBER, O.B. *et al.* Isolation and characterization of diazotrophic bacteria in banana and pineapple plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.210, p. 103-113, 1999.

ZINNIEL, D.K. *et al.* Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. , p. 2198-2208, 2002.

ANEXOS