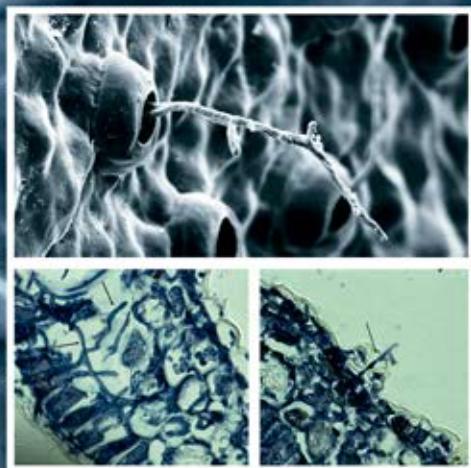
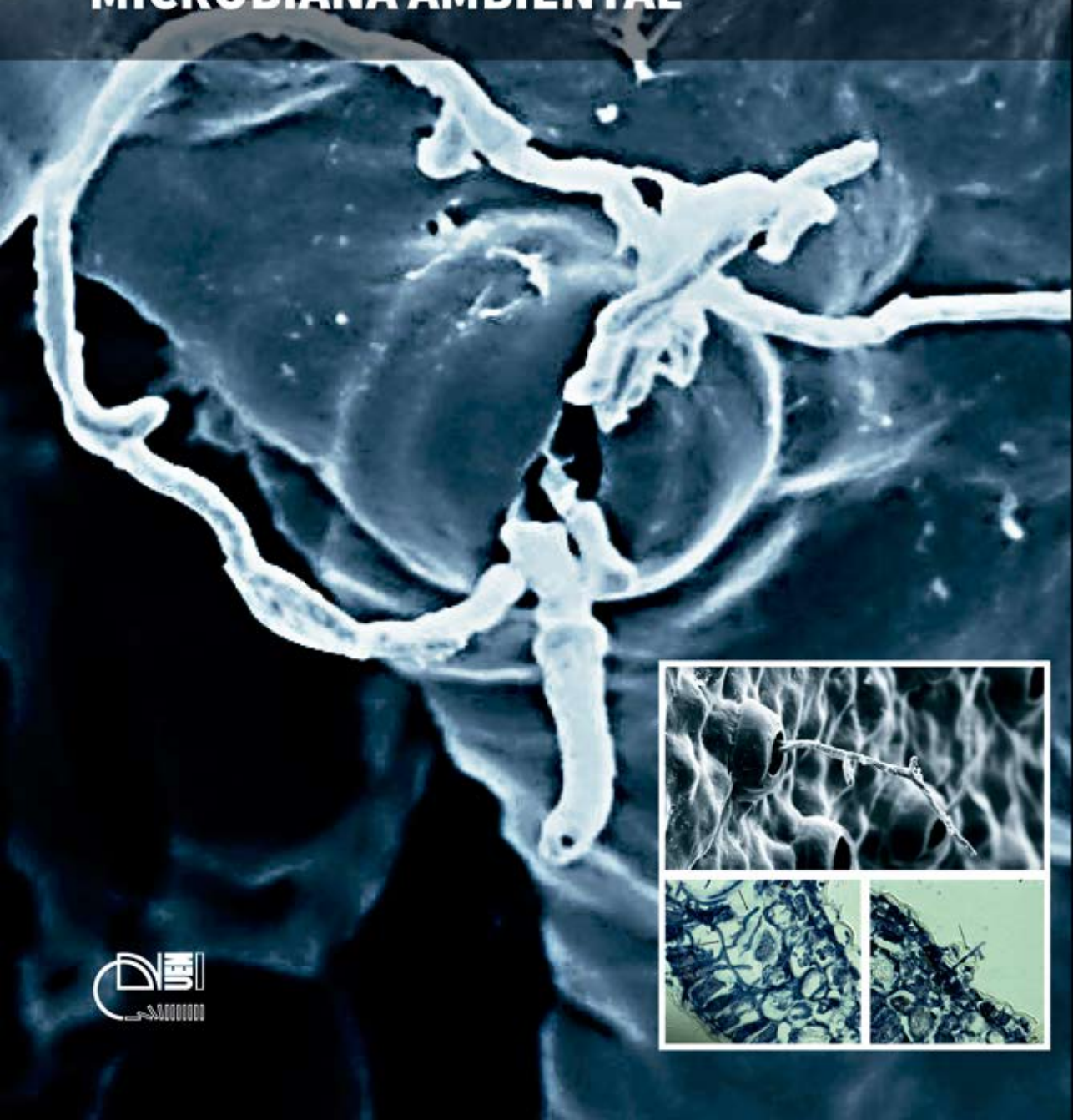


João Lúcio Azevedo  
João Alencar Pamphile  
Maria Carolina Quecine-Verdi  
Paulo Teixeira Lacava  
(organizadores)

# BIOTECNOLOGIA

## MICROBIANA AMBIENTAL



# **BIOTECNOLOGIA**

## MICROBIANA AMBIENTAL



## **EDITORA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**

### **REITOR**

Prof. Dr. Mauro Luciano Baesso

### **VICE-REITOR**

Prof. Dr. Julio César Damasceno

### **DIRETORA DA EDUEM**

Profa. Dra. Terezinha Oliveira

### **EDITORA-CHEFE DA EDUEM**

Profa. Dra. Luzmarina Hernandes

## **CONSELHO EDITORIAL**

### **PRESIDENTE**

Profa. Dra. Terezinha Oliveira

### **EDITORES CIENTÍFICOS**

Profa. Dra. Ana Lúcia Rodrigues, Profa. Dra. Analete Regina Schelbauer, Prof. Dr. Antonio Ozai da Silva, Profa. Dra. Cecília Edna Mareze da Costa, Prof. Dr. Eduardo Augusto Tomanik, Profa. Dra. Elaine Rodrigues, Profa. Dra. Larissa Michelle Lara, Prof. Dr. Luiz Roberto Evangelista, Profa. Dra. Luzia Marta Bellini, Prof. Dr. Márcio Roberto do Prado, Prof. Dr. Mário Luiz Neves de Azevedo, Profa. Dra. Maria Cristina Gomes Machado, Prof. Dr. Oswaldo Curty da Motta Lima, Prof. Dr. Raymundo de Lima, Profa. Dra. Regina Lúcia Mesti, Prof. Dr. Reginaldo Benedito Dias, Prof. Dr. Sezinando Luiz Menezes, Profa. Dra. Valéria Soares de Assis

## **EQUIPE TÉCNICA**

### **FLUXO EDITORIAL**

Edneire Franciscón Jacob, Marinalva Aparecida Spolon Almeida, Vania Cristina Scomparin

### **PROJETO GRÁFICO E DESIGN**

Marcos Kazuyoshi Sassaka, Marcos Roberto Andreussi

### **MARKETING**

Gerson Ribeiro de Andrade

### **COMERCIALIZAÇÃO**

Luciano Wílilan da Silva, Paulo Bento da Silva, Solange Marly Oshima

João Lúcio Azevedo  
João Alencar Pamphile  
Maria Carolina Quecine-Verdi  
Paulo Teixeira Lacava  
(Organizadores)

# **BIOTECNOLOGIA**

## MICROBIANA AMBIENTAL

### **Prefácio**

Sergio Olavo Pinto da Costa



Eduem  
Maringá  
2018

Copyright © 2018 para os autores

**Todos os direitos reservados.** Proibida a reprodução, mesmo parcial, por qualquer processo mecânico, eletrônico, reprográfico etc., sem a autorização, por escrito, dos autores.

**Todos os direitos reservados desta edição 2018 para Eduem.**

Todas as informações da obra, ora publicada, como as marcas registradas, os logos, as imagens e quaisquer outros conteúdos utilizados, são de responsabilidade dos autores.

**Revisão textual e gramatical:** Maria Dolores Machado

**Projeto gráfico/diagramação:** Marcos Kazuyoshi Sassaka

**Capa - arte final:** Marcos Kazuyoshi Sassaka

**Ficha catalográfica:** Marinalva Aparecida Spolon Almeida (CRB 9-1094)

**Fonte:** Source Sans Pro

**Tiragem - versão impressa:** 500 exemplares

#### Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

(Eduem - UEM, Maringá - PR., Brasil)

B616 Biotecnologia microbiana ambiental / João Lucio Azevedo, João Alencar Pamphile, Maria Carolina Quecine, Paulo Teixeira Lacava(organizadores); prefácio Sergio Olavo Pinto da Costa. -- Maringá : Eduem, 2018.  
331 p. : il. algumas color.

ISBN 978-85-7628-734-6

1. Agricultura. 2. Sustentabilidade. 3. Inovação. 4. Desenvolvimento tecnológico. 5. Ambiente. 6. Indústria. 7. Bactérias. 8. Fungos. 9. Virus. 10. Endófitos. 11. Microbioma. 12. Biotecnologia. 13. Controle biológico. 14. Enzimas. 15. Processos biotecnológicos. 16. Biorremediação. 17. Biodiversidade. 18. Taxonomia molecular. 19. Bioprocessos. I. Azevedo, João Lucio, org. II. Pamphile, João Alencar, org. III. Quecine, Maria Carolina, org. IV. Lacava, Paulo Teixeira, org. V. Costa, Sergio Olavo Pinto da, pref. VI. Título.

CDD 21.ed. 579.3

Marinalva Aparecida Spolon Almeida (CRB 9-1094)

Editora filiada à



**Eduem - Editora da Universidade Estadual de Maringá**

Av. Colombo, 5790 - Bloco 40 - Campus Universitário  
87020-900 - Maringá-Paraná - Fone: (44) 3011-4103  
www.eduem.uem.br - eduem@uem.br

## S U M Á R I O

---

P R E F Á C I O .....	7
A P R E S E N T A Ç ã O .....	9
C A P Í T U L O I	
<b>O desenvolvimento da microbiologia e da biotecnologia de micro-organismos no Brasil</b>	
João Lúcio Azevedo, João Alencar Pamphile, Maria Carolina Quecine-Verdi, Paulo Teixeira Lacava .....	13
C A P Í T U L O II	
<b>Tópicos da diversidade de fungos e bactérias: bases da taxonomia clássica</b>	
João Alencar Pamphile, Juliana Bernardi-Wenzel, José Odair Pereira, Juliano Marcon Baltazar .....	35
C A P Í T U L O III	
<b>Diversidade microbiana: causas e consequências – como acessá-las</b>	
Fernando Dini Andreote, Michele de Cássia Pereira e Silva .....	61
C A P Í T U L O IV	
<b>Controle biológico e simbiótico de insetos-pragas e doenças por micro-organismos endofíticos</b>	
Paulo Teixeira Lacava, Itamar Soares de Melo, José Odair Pereira .....	83
C A P Í T U L O V	
<b>Mecanismos de promoção de crescimento vegetal por endófitos e rizobactérias</b>	
Bruna Durante Batista, Maria Carolina Quecine-Verdi, Paulo Teixeira Lacava.....	105
C A P Í T U L O VI	
<b>Fixação biológica de nitrogênio: fundamentos e aplicações</b>	
Fábio Bueno dos Reis Junior, Iêda de Carvalho Mendes, Mariangela Hungria ...	125

CAPÍTULO VII

**Micro-organismos no monitoramento ambiental**

Patrícia do Rocio Dalzoto, Wanessa Ramsdorf, Vanessa Kava ..... 153

CAPÍTULO VIII

**Prospecção biotecnológica para a produção de enzimas microbianas**

Alessandra Tenório Costa, Adriana Garcia, Vânia Specian, João Alencar Pamphile ..... 173

CAPÍTULO IX

**Processos de biorremediação para tratamento de água e efluentes**

Rosângela Bergamasco, Márcia Regina Fagundes-Klen, Letícia Nishi ..... 195

CAPÍTULO X

**Biotecnologia microbiana marinha**

Marcus Adonai Castro da Silva, André Oliveira de Souza Lima ..... 215

CAPÍTULO XI

**Vírus benéficos em biotecnologia: aplicações dos vírus em biotecnologia**

João Lúcio Azevedo ..... 243

CAPÍTULO XII

**Microalgas: possível solução para um mundo sustentável?**

Vanessa Kava, José Viriato Coelho Vargas, André Bellin Mariano ..... 269

CAPÍTULO XIII

**Nanotecnologia e micro-organismos**

Adriana Garcia, Luiz Fernando Cótica, Paula Nunes de Oliveira, Sandro Augusto Rhoden ..... 301

Sobre os autores ..... 327

Os professores João Lúcio de Azevedo, João Alencar Pamphile, Maria Carolina Quecine e Paulo Teixeira Lacava são renomados geneticistas e microbiologistas do país, detentores de inúmeras publicações nacionais e internacionais da mais alta qualidade na área de atuação da genética de micro-organismos e da biotecnologia.

Apresentam, agora, nova publicação – *Biotecnologia microbiana ambiental*, dotada de grande interesse acadêmico e prático, na qual separa os conceitos tradicionais da microbiologia, privilegiando mais o que os micróbios fazem e não apenas o que eles são.

Trata-se uma abordagem, clara, didática e muito atualizada em que mostra com muita propriedade uma biotecnologia ampla objetivando a otimização e aplicação de processos celulares no contexto ambiental.

São 13 textos cuidadosamente ajustados ao propósito da obra onde os autores tratam de vários temas relevantes, nos quais participam com contribuições experimentais pessoais como, principalmente, as que envolvem micro-organismos endofíticos, fatos que lhes asseguram autenticidade de informação.

Não me recordo de nenhuma obra, recentemente, realizada em nosso meio, que seja comparável a esta, pela qual felicito os autores.

Da abrangência e qualidade com que o livro foi organizado, merece sua recomendação para uma clientela diferenciada além da graduação.

Sergio Olavo Pinto da Costa





A biotecnologia tem grande importância para o desenvolvimento do Brasil.

Um importante diferencial competitivo do Brasil para o desenvolvimento da biotecnologia é sua notável biodiversidade. São cerca de centenas de milhares de espécies de plantas, animais e micro-organismos já registrados e estima-se que este número possa chegar a milhões de espécies. O Brasil possui quase um quinto da biodiversidade mundial, distribuída em seis biomas: Amazônia, cerrado, caatinga, mata Atlântica, pantanal e pampa, além da zona costeira e marinha. Considerada a diversidade genética e molecular associada a estes biomas, abre-se um universo de oportunidades para a pesquisa e inovação biotecnológica. Além disso, a distribuição espacial diferenciada desta biodiversidade cria oportunidades para um desenvolvimento econômico que valoriza os regionalismos, capaz de organizar arranjos produtivos sustentáveis baseados em aplicações biotecnológicas.

Inúmeros debates têm sido realizados com o fim precípuo de se instituir uma política de preservação ambiental, no Brasil e no mundo acerca da necessidade de se utilizar os recursos naturais sem alterar o equilíbrio do ambiente onde todos os organismos estão inseridos, com o monitoramento, preservação e prospecção de novos produtos tecnológicos que beneficiem a sociedade. O debate sobre a preservação ambiental em países agrícolas, como o Brasil, busca respostas a diferentes problemas como, por exemplo, o de se aumentar a produção de alimentos, com insumos microbianos (micro-organismos ou compostos produzidos pelos mesmos) que além de ampliarem o desenvolvimento vegetativo da planta, também a proteja de ataques de patógenos e pragas. Assim, a subárea da biotecnologia, a biotecnologia microbiana ou biotecnologia de microrganismos pode contribuir significativamente para se alcançar respostas aos graves problemas do impacto ambiental, produzido pela sociedade hodierna, resultantes do desenvolvimento acelerado das indústrias: contaminação dos solos, rios e lençol freático, com os metais pesados, resíduos tóxicos de agroquímicos, corantes têxteis, entre outros. Para tanto, a área promissora da biorremediação desses contaminantes tem sido ampliada. Somados a isso, a biotecnologia microbiana pode contribuir com a obtenção de energias mais limpas, metabólitos secundários com atividades antibióticas e enzimas industriais.

Os micro-organismos são, sem qualquer dúvida, as formas de vida mais versáteis e adaptáveis da Terra. Ocupam os mais diversos nichos, como rios, oceanos, solo,

regiões de climas extremos como o Ártico e regiões vulcânicas ativas. Ocupam até mesmo o interior de animais e também de plantas. Nestas últimas, tem-se descoberto e prospectado um grande número de espécies de endófitos, para a produção de grande espectro de antimicrobianos, agentes fitossanitários, promotores do crescimento vegetal e até antitumorais.

O desenvolvimento de novas plataformas de sequenciamento do DNA, ou sequenciamento de nova geração, além dos métodos baseados na metodologia de Sanger, em equipamentos automatizados, permitiu o incremento de novas abordagens científicas e tecnológicas, como a identificação de microrganismos baseado no sequenciamento de regiões conservadas do DNA, ou seja, a taxonomia molecular microbiana baseada no DNA; estudo de microbiomas e construção de bibliotecas genômicas ambientais aplicados à prospecção de metabólitos secundários de valor biotecnológico e estudos de filogenética e evolução de espécies.

Em vista da supracitada importância dos micro-organismos, a consecução de uma publicação ilustrada para os docentes, pesquisadores e alunos (de pós-graduação lato sensu e stricto sensu, graduação e, sobretudo estes discentes pertencentes à área de biotecnologia), que trouxesse ampla gama de assuntos associados à biotecnologia e ambiente, levou os organizadores da presente obra a reunirem diferentes pesquisadores com expertises em tópicos como:

- taxonomia clássica, com a apresentação da estruturação dos diferentes filos de fungos e bactérias;
- taxonomia molecular baseada no DNA, com abordagem sobre as diferentes técnicas moleculares baseadas na análise de perfis de DNA;
- controle biológico e simbiótico de insetos-pragas e doenças por micro-organismos endofíticos, sobretudo na área de fitossanidade, com a minimização de impacto ambiental com a substituição de agentes químicos xenobióticos;
- mecanismos de promoção de crescimento vegetal por diferentes organismos, como endófitos e rizobactérias;
- fundamentos e aplicações da fixação biológica de nitrogênio com a resultante diminuição do uso dos fertilizantes nitrogenados;
- o uso de micro-organismos no monitoramento ambiental, com a determinação do momento em que se necessita de intervenção imediata em locais com elevado estresse ambiental (presença de contaminantes) remediando e tratando esses ambientes antes que o processo seja crônico, sistêmico e irreversível;
- prospecção biotecnológica para a produção de enzimas microbianas, importantes biomoléculas aplicadas a diferentes setores como o industrial, medicinal e biotecnológico;

## APRESENTAÇÃO

- o processo de biorremediação de água e efluentes, que constitui em uma tecnologia emergente no campo da ciência e engenharia ambientais, com o uso de microrganismos;
- outro tema na fronteira da ciência seria a biotecnologia microbiana marinha, com o emprego da metagenômica estrutural e funcional;
- os vírus e sua aplicação na biotecnologia;
- o uso de microalgas para a produção de energia ecologicamente correta, como uma alternativa ao combustível fóssil e, finalmente a aplicação da nanotecnologia e microrganismos na biorremediação e monitoramento ambiental.

Os organizadores



# O desenvolvimento da microbiologia e da biotecnologia de micro-organismos no Brasil

---

João Lúcio Azevedo, João Alencar Pamphile, Maria Carolina Quecine-Verdi.  
Paulo Teixeira Lacava

## 1.1 Introdução

A microbiologia como parte das ciências biológicas apresenta uma trajetória bem diversa daquela que ocorreu com a botânica e a zoologia. Há mais de 80 mil anos o *Homo sapiens*, a espécie mais recente do gênero *Homo*, vem conhecendo e convivendo com seres vivos macroscópicos, tais como plantas, mamíferos, répteis, batráquios, insetos e outras formas de vida. Entretanto, os seres humanos, embora conhecessem alguns fungos macroscópicos, tais como os cogumelos, alguns até usados na alimentação, eles não tinham ideia da existência de seres microscópicos, por exemplo, as bactérias, protozoários, leveduras e muitas outras formas de vida. Foi só no século XVII que, na Holanda, Antoine van Leeuwenhoek teve a oportunidade de ver pela primeira vez micro-organismos, graças a um equipamento, um microscópio por ele inventado que tinha um aumento de no máximo 500 vezes. Ele observou seres que se movimentavam em gotículas de água, retiradas, por exemplo, de um lago ou de um líquido fermentado e denominou tais seres de ‘animalículos’ quando apresentou seus resultados na Royal Society de Londres, Inglaterra. Estes animalículos, só muito tempo depois foram relacionados a certos processos já observados pelos habitantes do planeta, mas cujas causas eram desconhecidas, tais como doenças de plantas, animais e humanas, fermentações para produção de ácido acético e bebidas alcoólicas e até medicamentos. Por exemplo, os chineses, 1.500 anos antes de Cristo, já fermentavam soja para utilizar no tratamento de feridas; possivelmente, estava cultivando um fungo, talvez o *Penicillium* e produzindo o antibiótico penicilina. Outro exemplo: Theophrastus (370-285 a.C.) já relatava que após o plantio de uma leguminosa, o solo ficava mais apropriado para favorecer o crescimento de outra cultura, que se mostrava mais vigorosa, possivelmente uma bactéria fixadora de nitrogênio atmosférico era a

responsável. Outro exemplo, relatado por John Evelyn (1664) no seu livro *Sylva*, era de que um material triturado de insetos pragas doentes, se espalhado em uma floresta causava a morte de insetos sadios. Como mencionado no capítulo sobre efeitos benéficos dos vírus do presente livro, possivelmente ele estava distribuindo um vírus que era transmitido para pragas sadias, causando sua morte. Foi na segunda metade do século XVIII que foi apresentada a hipótese de que doenças poderiam estar sendo causadas pelos tais animalículos descritos cerca de 100 anos atrás. Em 1849, Henle associou o contágio causando doenças, pela transmissão dos micro-organismos (animalículos) de uma pessoa para outra. Os estudos com micro-organismos começaram a aparecer mais frequentemente, bem como o estabelecimento de uma classificação dentre os micróbios.

A descoberta dos micro-organismos levou, após muitos anos, à constatação da inexistência de geração espontânea entre os seres vivos. Já discutida há mais de dois milênios inclusive por Aristóteles que era adepto da teoria da geração espontânea, só cerca de 200 anos atrás ela começou a ser questionada. Spallanzani já havia descrito que micro-organismos eram levados pelo ar e, podiam ser mortos por aquecimento. Verificou também que se isolasse um bastonete dentre aqueles animalículos descritos por Leeuwenhoek e o transferisse para um líquido sem micro-organismos, ele se dividia formando muitas cópias iguais ao bastonete original. Os dados de Spallanzani foram importantes para que, em 1861, Pasteur publicasse a *Teoria dos germes* que resultou na era de ouro da microbiologia nos dois últimos decênios do século XIX. Além de concluir que geração espontânea não ocorria, Pasteur mostrou também o papel dos micro-organismos em diferentes tipos de fermentações resultando na produção de ácido lático ou etanol entre outras; mostrou também a existência e diferenças entre vida aeróbica e anaeróbica, e relatou doenças de insetos e plantas causadas por micro-organismos. Um histórico da microbiologia pode ser encontrado no livro de Bier (1941). Antes mesmo de Pasteur, outras descobertas mostravam a importância dos micro-organismos. Por exemplo, De La Tour já havia relacionado micro-organismos com as fermentações; Agostino Bassi, na Itália, constatou que uma doença do bicho da seda era causada por um fungo que mais tarde foi renomeado de *Beauveria bassiana* em sua homenagem. Aliás, Bassi não só mostrou que este fungo era causador da doença como depois de inocular o fungo em larvas sadias de bicho da seda e verificar a morte das mesmas, reisolou o mesmo fungo fechando o ciclo de um postulado que deveria ser denominado de postulado de Bassi que só mais tarde foi repetido por Koch com bactérias causadoras da tuberculose humana e que foi denominado de postulado de Koch. Foi surgindo assim uma nova área dentro das ciências biológicas, a microbiologia, com grande impacto para a nossa própria sobrevivência como a prática desenvolvida por Lister mostrando que a lavagem de mãos e a desinfecção antes de cirurgia evitavam contaminações.

Foram também descobertas várias formas de micro-organismos correlacionadas com patógenos ao lado de micro-organismos de extrema utilidade na agricultura e medicina, neste último caso como produtores de antimicrobianos como os descritos por Fleming na Inglaterra, em 1928, e Waksman, em 1942, bem relatadas no artigo de revisão de Moellering de 1995. Atualmente, os micro-organismos estão divididos em vários grupos, por exemplo, bactérias, fungos, microalgas, protozoários e outros. Há micro-organismos presentes nos três reinos de seres vivos existentes, ou seja, bactérias, arqueias e eucariotos. Efetivamente, se iniciada por Pasteur, considerado o pai da bacteriologia, a microbiologia, como ciência, tem menos de 150 anos de existência. Entretanto, sem considerar os insetos que são extremamente numerosos, os micro-organismos constituem cerca de 80% das espécies viventes no planeta Terra. Ao contrário do que em geral se pensa, a grande maioria dos micro-organismos, possivelmente cerca de 99%, é útil e essencial para a sobrevivência dos denominados animais e plantas superiores que habitam a face da Terra. Apenas cerca de 1% deles é causador de doenças e de efeitos deletérios como corrosões, podridões e outros. Devido a isto, eles vêm sendo cada vez mais e melhor estudados no mundo inteiro. Não cabe aqui fazer um histórico detalhado da microbiologia como um todo. Entretanto, esta introdução nos leva aos principais nomes, instituições e fatos importantes que ocorreram no Brasil, relacionados à implantação e desenvolvimento da microbiologia brasileira. Como será discutida, mais adiante, a microbiologia foi o principal alicerce da biotecnologia de micro-organismos, que são os pontos principais deste capítulo inicial e da presente publicação.

## **1.2 Os primórdios da microbiologia no Brasil**

Revisões sobre aspectos da microbiologia e sua implantação e desenvolvimento no Brasil já foram abordados em várias publicações que apresentam dados detalhados sobre o assunto. É o caso do livro *A formação da comunidade científica no Brasil* de autoria de Simon Schwartzman (1979). Pontos mais específicos também podem ser encontrados tais como o relacionado à história da saúde pública no Brasil (BENCHIMOL, 2000) ao ensino da microbiologia no Brasil (JARDIM-FREIRE; GAMBALE, 1997) ou à micologia (FIDALGO, 1985). Não é intenção no presente capítulo inicial abranger todos os aspectos já bem esmiuçados nas revisões citadas. O objetivo é ressaltar alguns dos mais atuantes microbiologistas na fase inicial da implantação da área no Brasil, a maioria voltada para doenças humanas e animais bem como, salientar nomes que foram altamente importantes para o início e desenvolvimento de ramos da microbiologia que não a envolvida nas áreas de



saúde animal e humana, especialmente a agricultura. O Brasil é sempre descrito como um celeiro do mundo e as ciências agrárias, especialmente a agricultura e também fermentações industriais são muitas vezes esquecidas quando nos referimos à microbiologia. Então ênfase especial será dada a microbiologia agrícola, de alta relevância para o Brasil. Entretanto, sem dúvida foi a área de saúde que mais se destacou nos primórdios da microbiologia entre nós e isto foi em decorrência da presença de pesquisadores brasileiros que estavam na Europa, principalmente na França em contato com Pasteur nos anos de ouro da ciência dos micróbios.

### 1.3 Microbiologia na área de saúde

Podemos começar com Adolpho Lutz, brasileiro, nascido no Rio de Janeiro em 1855, mas que teve quase toda sua formação educacional na Europa. Formado em medicina na Suíça, trabalhou em vários países europeus e teve o privilégio de conviver com Pasteur, em Paris, quando então ampliou sua formação científica em microbiologia, depois reforçada por trabalhar com Paul Unna na Alemanha, na área de medicina tropical e doenças infecciosas. Após, dirigiu hospitais nos Estados Unidos quando então, em 1892, foi convidado para ser diretor do novo Instituto de Bacteriologia no Brasil, denominado na época de Instituto Bacteriológico, localizado na cidade de São Paulo. Neste período suas pesquisas levaram à descoberta do agente causal da doença blastomicose sul-americana, o fungo atualmente denominado de *Paracoccidioides brasiliensis*. Também foi o primeiro a estabelecer a correlação entre a febre amarela e o mosquito *Aedes aegypti*. Sua atuação foi crucial no combate à peste bubônica na cidade de Santos, Estado de São Paulo. Em 1908, Lutz aposentou-se, mas continuou a trabalhar em microbiologia transferindo-se para o Instituto Oswaldo Cruz (Manguinhos) no Rio de Janeiro. Sua contribuição à microbiologia e saúde pública foi reconhecida em 1940 quando o antigo Instituto Bacteriológico e o Instituto Bromatológico, este último que atuava no controle de contaminação e fraudes em alimentos, uniram-se, resultando o atual Instituto Adolfo Lutz, sem o 'ph' de Adolpho pela similaridade de nome com Adolph Hitler na época da segunda grande guerra. Mais detalhes sobre Adolfo Lutz são encontrados em Instituto Adolfo Lutz (2011).

Outro nome que deve ser citado é o de Oswaldo Cruz, nascido em São Paulo, na cidade de São Luiz do Paraitinga, em 1872, mas que logo se mudou com os familiares, para o Rio de Janeiro formando-se em medicina em 1892, o mesmo ano em que Adolfo Lutz iniciou seus trabalhos no Instituto Bacteriológico. Oswaldo Cruz teve também o privilégio de, em 1896, ir a Paris nos anos de ouro da microbiologia,

permanecendo lá por cerca de três anos quando conviveu com Pasteur e foi discípulo de Emile Roux, naquele tempo, diretor do Instituto, renomado bacteriologista que auxiliou Pasteur em muitas descobertas conjuntas tais como a vacina antirrábica e a detecção da toxina da difteria, produzida pela bactéria *Corynebacterium diphtheriae*. Na volta da Europa, Oswaldo Cruz sugeriu ao governo federal a criação de um instituto para o combate da peste bubônica. Foi assim criado, em 1900, o Instituto Soroterápico Federal, sendo Oswaldo Cruz seu diretor a partir de 1902. Em 1903 foi nomeado diretor geral da Saúde Pública e seus grandes feitos foram as campanhas de erradicação da febre amarela e da varíola. Sua atuação resultou na vacinação obrigatória cujos resultados foram cobertos de sucesso, mas não sem antes causar protestos da população. Estes fatos que têm sido até hoje amplamente divulgados, terminaram em vitória de Oswaldo Cruz e contribuíram em muito para o desenvolvimento da microbiologia no país. Hoje, o Instituto que leva o nome de seu idealizador (Instituto Oswaldo Cruz ou IOC, desde 1908) continua dando enorme contribuição à microbiologia e saúde pública brasileira. Oswaldo Cruz faleceu em Petrópolis, Estado do Rio de Janeiro em 1917 (OSVALDO CRUZ, 2017). A ligação entre Adolpho Lutz e Oswaldo Cruz não foi a única. Outros nomes que serão mencionados estão interligados, sempre envolvendo Louis Pasteur, Adolpho Lutz e Oswaldo Cruz. Eis alguns deles.

Carlos Chagas nasceu em Oliveira (MG), em 1878, e completou seus estudos em medicina em 1902 quando trabalhou no então Instituto Soroterápico, tendo sido orientado por Oswaldo Cruz, defendendo a tese relacionada à malária. Uma de suas maiores contribuições foi ter descoberto o agente causal da atualmente denominada ‘doença de Chagas’, transmitido por insetos conhecidos pelo nome popular de ‘barbeiros’. O agente causal, um protozoário denominado de *Trypanosoma cruzi* (em homenagem ao mestre Oswaldo Cruz) foi encontrado também em macacos, gatos e seres humanos e ainda é objeto de estudos por microbiologistas e biólogos moleculares no Brasil e fora dele. Entretanto, talvez a maior contribuição de Carlos Chagas foi ter sido o responsável pela introdução de disciplinas voltadas ao ensino da medicina tropical, primeiro no Rio de Janeiro e atualmente fazendo parte do currículo das universidades brasileiras ligadas à área de saúde. Logo após o falecimento de Oswaldo Cruz, Carlos Chagas foi nomeado diretor do IOC, alguns dias após a morte de seu fundador e foi extremamente importante sua atuação levando ao Instituto as mesmas características amplas de ensino, pesquisa e fabricação de medicamentos, como ocorria no Instituto Pasteur de Paris. Faleceu em 1934 (CARLOS CHAGAS, 2017).

Mais um nome relacionado aos anteriores foi Henrique Rocha Lima, nascido em 1879, também diplomado pela Faculdade de Medicina, no Rio de Janeiro em 1905. Em seguida, trabalhou em Manguinhos junto com Oswaldo Cruz, Adolpho

Lutz e Carlos Chagas. Em estágio na Alemanha descobriu e descreveu o micróbio *Rickettsia prowasekii*. Depois, em São Paulo foi um dos responsáveis pela criação da Faculdade de Medicina de São Paulo e da própria Universidade de São Paulo. Foi também diretor do Instituto Biológico de São Paulo e presidente da recém-criada Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (SBPC) (HENRIQUE DA ROCHA LIMA, 2017).

Talvez um nome não tão conhecido como os anteriores, mas de extremo valor, foi o de Gaspar de Oliveira Viana, nascido em Belém, no Pará, em 1885 e que também como a maioria dos microbiologistas pioneiros aqui citados, estudou na Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro e foi pesquisador em Manguinhos. Neste período trabalhou em doenças como o mal de Chagas junto com Carlos Chagas, colaborou com Adolpho Lutz na descoberta do fungo causador da blastomicose sul-americana e realizou também por sugestão de Oswaldo Cruz, pesquisas com *Leishmania brasiliensis*. Faleceu jovem, em 1914.

Muito mais nomes poderiam ser citados tais como Emílio Ribas com trabalhos sobre o agente causal da febre amarela e que depois dirigiu o Instituto que hoje leva seu nome, Francisco Fajardo (1864-1906), em pesquisas com o protozoário causador da malária e transmitido por mosquitos. Aliás, o relacionamento de microbiologistas com entomologistas foi muito grande na época, devido ao estudo das doenças e seus vetores. Por exemplo, Vital Brazil (1865-1950) trabalhou com Adolpho Lutz no Instituto Bacteriológico de São Paulo tendo depois se especializado em ofídios, dirigindo o Instituto Butantan em São Paulo; outro destaque foi Arthur Neiva que também trabalhou em Manguinhos no combate ao inseto vetor da febre amarela. Mais recentemente nomes de importância na área de microbiologia voltada para a saúde humana e grande divulgadores da microbiologia por artigos em revistas especializadas e livros didáticos foram Otto Bier (1906-1985) formado em medicina também no Rio de Janeiro, trabalhando em Manguinhos junto com Carlos Chagas e transferindo-se depois para São Paulo, fazendo parte do Instituto Biológico, e da Escola Paulista de Medicina e sendo membro fundador da SBPC. Seu livro *Bacteriologia e imunologia* é clássico, sendo adotado em muitas universidades brasileiras. Também deve ser mencionado, Carlos da Silva Lacaz (1915-2002), formado pela Faculdade de Medicina de São Paulo, micologista de renome, criador do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo e também autor de livros clássicos de microbiologia, por exemplo, *Antibióticos* (1975) e *Tratado de micologia médica* (2002). Falecido mais recentemente deixou vários trabalhos em micologia e bacteriologia e orientados. Trabalhou com Lacaz em seu início, Luis Rachid Trabulsi que deixou trabalhos de destaque em bacteriologia, formando também orientados que até hoje continuam seu trabalho. Da Universidade de São Paulo (USP) transferiu-se para a Escola Paulista de Medicina, atualmente Unifesp

retornando à USP em São Paulo, onde faleceu recentemente. Uma revisão dentre muitas sobre o histórico da microbiologia no Brasil podem ser citadas, entre elas Benchimol (1995) e Suassuna (2006).

Acredito que o exposto é suficiente para mostrar que a microbiologia teve um excelente início no Brasil e que a área de saúde foi privilegiada pelos seus fundadores, todos derivados dos grupos europeus predominantes na época. Embora em menor escala, mas cada vez mais ocupando espaço dentro da microbiologia brasileira foram os pesquisadores que se dedicavam à áreas de ciências agrárias, especialmente no campo das fermentações industriais. Foram áreas que cresceram aos poucos e de modo semelhante na área da saúde, contribuíram em muito para a resolução de problemas de interesse nacional. É o que será apresentado a seguir.

## 1.4 Microbiologia na agricultura

Como já mencionado anteriormente, mesmo antes da descoberta dos micro-organismos já havia indícios de que eles efetuavam importantes processos na agricultura. De Bary, na Alemanha (1831-1888), pode ser considerado o pai da patologia de plantas, a fitopatologia, seguido por Kuhn (1828-1910) e muitos outros que descreveram e apresentaram métodos de controle de moléstias vegetais. A famosa doença da batata na Europa, causada pelo fungo *Phytophthora infestans* em 1845, é citada como responsável por fome especialmente na Irlanda causando incremento da imigração de irlandeses para os Estados Unidos. No surto de doenças de insetos úteis, o próprio Pasteur se envolveu no controle da pebrina, doença causada por um protozoário em bicho da seda. Junto aos efeitos negativos dos micro-organismos, De Bary mencionado há pouco, foi o responsável pela descoberta de fungos que habitavam o interior de plantas, designados de micro-organismos endofíticos, que atualmente sabemos serem úteis, como responsáveis por controlarem doenças e insetos-pragas protegendo seus hospedeiros, além de muitos outros efeitos benéficos. Foi assim que, ao contrário do que aconteceu na área de saúde, os micro-organismos na microbiologia agrícola foram aos poucos sendo descritos como benéficos. Por exemplo, Boussingault, em 1838, já havia correlacionado bactérias com fixação de nitrogênio atmosférico e Von Liebig, em 1858, correlacionou nitratos do solo com fertilizantes (WILSON, 1957). Entretanto, a contribuição maior foi do ucraniano Sergei Winogradsky (1856-1953), mostrando entre outros pontos, que bactérias que ocorriam em nódulos de leguminosas, eram responsáveis por fixação do nitrogênio atmosférico, essencial para fertilização do solo. Trabalhando em São Petersburgo, depois em Zurique e, finalmente, no

Instituto Pasteur em estação experimental perto de Paris, Winogradsky pode ser considerado um pioneiro da microbiologia do solo. Outro importante personagem na microbiologia agrícola foi o holandês Beijerinck que, em 1888, isolou, pela primeira vez, bactérias de nódulos de leguminosas. Beijerinck também introduziu meios de cultivo para seleção e enriquecimento em microbiologia. Beijerinck e Winogradsky podem também ser considerados os precursores da, mais recente, microbiologia ambiental.

Juntamente com bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico, outro grupo de micro-organismos de importância e valor econômico para a agricultura, foram fungos que vivem em associação com plantas, descritos pela primeira vez por Nageli em 1842. Estas associações de fungos e plantas foram melhores descritas e denominadas pelo nome de 'micorrizas' por Frank em 1885. O estudo das micorrizas de diferentes tipos mostrou que elas podiam ser responsáveis por tolerância a estresses em plantas, por exemplo, o estresse hídrico, resistência a doenças e pela capacidade de levar nutrientes para seus hospedeiros. Estes estudos foram ampliados mais recentemente por Barbara Mosse, na Inglaterra e J. W. Gerdemann, nos EUA.

No campo do controle biológico de insetos, Metchinikoff na Rússia e que também trabalhou no Instituto Pasteur, em Paris, mostrou que um fungo, o *Metarhizium anisopliae*, podia ser utilizado com sucesso no controle de insetos que eram pragas da cultura da beterraba e de outras plantas. Steinhaus, nos Estados Unidos, criou o departamento de patologia de insetos em 1945. Com relação a controle de patógenos de plantas, Waksman, em 1927, publicou seu livro *Principles of soil microbiology*, demonstrando a inibição de patógenos por outros micro-organismos especialmente actinomicetos. Tudo culminou com a descoberta de antibióticos, por Fleming em 1928 e pelo próprio Waksman alguns anos depois.

Foram assim aparecendo micro-organismos úteis, ao contrário do que ocorria na microbiologia na saúde. Mesmo os vírus, já mencionados em capítulo desta presente publicação, embora patógenos de plantas e animais apresentam também efeitos benéficos para a agricultura, ecologia e outras áreas.

## 1.5 A microbiologia agrícola no Brasil

Ao contrário da microbiologia na área de saúde, a microbiologia agrícola no Brasil teve um início mais modesto. Os primeiros microbiologistas agrícolas vieram, em geral, ainda jovens do exterior, contratados por instituições federais

ou estaduais e partiram para um campo ainda inexplorado no país e menos desenvolvido que as áreas de saúde no mundo. Os primeiros pesquisadores eram principalmente fitopatologistas contratados para combate às doenças de plantas, cerca de um século atrás. Na Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz' (Esalq), Universidade de São Paulo (USP) em Piracicaba, fundada em 1901, a antiga cadeira de botânica e zoologia abrigava também a microbiologia, especialmente a fitopatologia. A cadeira foi depois denominada de botânica, zoologia, fitopatologia e microbiologia agrícola. Nela destacava-se o francês Émile Charropin que em 1910 (ESALQ, 1976) publicou um dos primeiros textos em português sobre microbiologia do solo. Outro docente vindo da Itália, Avena Saccá, permaneceu no Brasil de 1913 a 1928 e fez um levantamento das principais doenças de plantas no Brasil, destacando-se trabalhos com café e videira. Saccá pode ser considerado um pioneiro da fitopatologia no Brasil. Outro fitopatologista de destaque na Esalq foi o belga Arsène Puttemans, já em 1917, publicou trabalhos originais sobre problemas da fitopatologia no Brasil (ESALQ, 1976). Além disso, Puttemans foi o responsável pela criação do parque da Esalq e que permanece até hoje como um exemplo do estilo de arquitetura paisagística da época. Foi contratado também o fitopatologista norte-americano Edwin Honey, da Universidade de Cornell, que nos três anos que esteve no Brasil editou textos de fitopatologia que constituíram o início da formação de, na época, jovens pesquisadores que mais tarde foram os orientadores de muitos dos atuais fitopatologistas brasileiros. Depois, denominado de Departamento de Fitopatologia, nele até hoje são realizados estudos de importância em doenças das principais culturas agrícolas brasileiras. Além deste departamento da Esalq, pesquisas foram também desenvolvidas no antigo Instituto Zimotécnico (atualmente Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição) e no Departamento de Genética onde F.G. Brieger, natural da Alemanha, e discípulo de Correns, um dos redescobridores das leis de Mendel, praticamente foi o responsável pela vinda de professores do exterior que iniciaram as bases da genética de micro-organismos no Brasil, em geral, voltadas para a agricultura. A genética microbiana, especialmente na agricultura e suas aplicações foi a base de dezenas de congressos e reuniões anuais englobando geneticistas e microbiologistas que deram origem à divulgação da biotecnologia de micro-organismos por meio de cursos de fundamentos de biotecnologia no Brasil como será apresentado mais adiante. Também no Departamento de Entomologia da Esalq, destaque deve ser dado a estudos sobre controle microbiano de insetos, tendo Sérgio Batista Alves, discípulo de Steinhaus de Berkeley, um dos principais responsáveis pela divulgação deste ramo de pesquisa no país. Mais recentemente, o Departamento de Solos e Nutrição de Plantas tem produzido trabalhos envolvendo vários setores da microbiologia do solo. Mais detalhes sobre o histórico da microbiologia e áreas correlatas na Esalq são encontrados em Esalq (1976) e Reichardt (2001).

Anteriormente à Esalq, outra instituição pioneira na microbiologia agrícola no Brasil foi o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), fundado em 1887 e, na época, denominado de Imperial Estação Agrônoma de Campinas. A iniciativa de sua criação foi do imperador D. Pedro II. O primeiro diretor do IAC foi o austríaco Franz Wilhelm Dafert que logo percebeu a importância da microbiologia e criou a Seção de Fitopatologia para estudar doenças de plantas de valor econômico no Brasil. Foi também contratado o holandês Franz Benecke, envolvido em doenças do cafeeiro na ilha de Java, naquele tempo uma colônia holandesa. Ele pressentia a possibilidade de ser introduzida no Brasil uma doença do cafeeiro, denominada ‘moléstia das folhas’, o que não ocorreu na época. Entretanto, muito depois a doença foi introduzida, em 1970, conhecida como ‘ferrugem do cafeeiro’, causada por um fungo (*Hemileia vastatrix*) e que foi combatida com variedades resistentes produzidas com antecedência à sua chegada ao país, por melhoramento genético realizado também no IAC por Alcides Carvalho, um dos mais renomados melhoristas de plantas no país. O IAC de 1924 até 1942 apresentou uma fase de grande desenvolvimento sob direção de Theodureto de Camargo. Esta diretoria criou condições para combater doenças do cafeeiro e do algodão além de, pela primeira vez no Brasil, terem sido iniciadas pesquisas com a bactéria *Rhizobium* e fixação biológica de nitrogênio, estudos sobre microbiologia do solo em geral e fermentações industriais. Foi na gestão de Theodureto de Camargo que vários pesquisadores foram contratados pelo IAC dentre eles, em 1934, Álvaro Santos Costa, formado em engenharia agrônoma pela Esalq e que estudou vírus de plantas criando a Seção de Virologia, contribuindo especialmente para debelar a doença denominada ‘tristeza dos citros’ que estava dizimando os laranjais do Estado de São Paulo. Mais informações sobre o IAC podem ser encontradas em Carmo e Alvim (1987).

Outra instituição do Estado de São Paulo que também teve seu papel na história da microbiologia na agricultura no Brasil. Trata-se do Instituto Biológico de Defesa Agrícola e Animal de São Paulo, atualmente Instituto Biológico (IB), criado no final de 1927. O IB resultou da necessidade para atender a demanda criada principalmente pela importância da cultura cafeeira no Estado de São Paulo na época. Entretanto, o Instituto teve sua atuação ampliada para controle de outras epifitias e epizootias bem como no desenvolvimento de produtos como vacinas e soros. Seu primeiro diretor foi Arthur Neiva, já mencionado anteriormente pelo seu papel na área de saúde no Brasil. Foi substituído por Henrique Rocha Lima também já mencionado anteriormente e que deu ao Instituto um aspecto similar a Manguinhos onde havia trabalhado. Neste período foram realizadas pesquisas e produção de vacinas contra carbúnculo, bouba de galinhas, tristeza bovina e outras. Na agricultura, o IB foi responsável por caracterização de doenças como a leprose dos citros. Em 1942, na gestão de Paulo de Lima, a Divisão de Biologia do instituto

foi subdividida, dela fazendo parte entre outras, as subdivisões de bacteriologia e de virologia. No combate a doenças de plantas especialmente citros, destacou-se Vitoria Rossetti, formada na Esalq, que ajudou a caracterizar moléstias como o cancro cítrico e a clorose variegada dos citrus, causadas por bactérias. Para mais detalhes sobre o IB podem ser encontrados em Rebouças et al. (2009).

Ainda no Estado de São Paulo, um forte grupo de micologia foi formado no Instituto de Botânica. Principalmente dedicado à taxonomia e microbiologia ambiental, o grupo fez importantes contribuições na área.

Em Minas Gerais, na Universidade Federal de Viçosa, Albert Muller iniciou estudos de microbiologia e daí para frente um importante grupo surgiu sendo que o primeiro programa de pós-graduação em microbiologia agrícola foi criado naquela Universidade.

Em Recife, na Universidade Federal de Pernambuco desatacaram-se os nomes de Chaves Batista, criador do Instituto de Micologia (atualmente Departamento de Micologia) e Oswaldo Gonçalves de Lima, criador do Instituto de Antibióticos (atualmente Departamento de Antibióticos). Ainda em Pernambuco, na microbiologia agrícola deve ser destacada a atuação do italiano Pietro Guagliumi, que veio ao Brasil em 1960 e introduziu as bases do controle biológico de insetos por fungos, trazendo a espécie denominada de *Metarhizium anisopliae* para controlar pragas da cana-de-açúcar; mais tarde este fungo foi cultivado em grande escala por Maria de Lourdes Aquino, deixando uma equipe que até hoje vem trabalhando com sucesso no controle microbiológico de insetos danosos à agricultura.

No Paraná, trabalhos de microbiologia foram mais dedicados à bioquímica e fisiologia de micro-organismos tendo destaque o curso de fisiologia de micro-organismos criado por Metry Bacila; este curso antecedeu à oficialização dos cursos de pós-graduação no Brasil (BACILA, 2001). O curso instituído por Bacila na Universidade Federal do Paraná formou importantes pesquisadores nas diversas áreas da microbiologia incluindo a agrícola. Também no Paraná, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) o centro de soja, teve papel destacado com os trabalhos de Flávio Moscardi que introduziu o controle biológico de pragas da soja no Brasil usando um vírus, o baculovírus (BUENO et al., 2012).

Destaque especial deve ser dado a Johanna Döbereiner, uma pesquisadora proveniente da antiga Tchecoslovaquia, formada em agronomia, pela Universidade de Munique, sendo contratada pelo Instituto de Ecologia e Experimentação Agrícola, Laboratório de Microbiologia do Solo (atualmente Centro de Agrobiologia da Embrapa) no Rio de Janeiro (JOHANNA LIESBETH KUBELKA DÖBEREINER, 2017). Quando poucos ainda acreditavam no papel dos micro-organismos na fertilidade dos solos, Döbereiner renovou este interesse quando verificou que certas bactérias denominadas



de diazotróficas pertencentes ao gênero *Azospirillum* e outros, eram capazes de fixar nitrogênio atmosférico em gramíneas e outras plantas nos trópicos. Mais importante foi seu papel na formação naquela época de jovens pesquisadores que hoje continuam os trabalhos em microbiologia. A própria Embrapa, embora de fundação recente, além de Döbereiner e Moscardi mencionados anteriormente, tem uma série de pesquisadores em seus centros espalhados pelo país e que estão contribuindo para o desenvolvimento da microbiologia em ciências agrárias no Brasil.

## 1.6 O desenvolvimento da biotecnologia microbiana no Brasil

A biotecnologia entendida como a utilização de sistemas celulares para o desenvolvimento de processos e produtos de interesse aplicado seja de valor econômico ou social, não é nova; muito pelo contrário desde a antiguidade os microorganismos, mesmo ainda não descobertos, pois não existia o microscópio, vem servindo ao ser humano na produção de ácido acético, ácido cítrico, na panificação, produção de bebidas alcoólicas e muitos outros produtos. Mesmo na agricultura que teve início cerca de 10.000 anos atrás a seleção de plantas é feita de maneira empírica, mas com sucesso. Entretanto uma revolução na biotecnologia surgiu após a descoberta da penicilina por Fleming, em 1928, e sua produção em maior escala por Florey, Chain e Norman a partir de 1940. Nesta época, a biotecnologia esteve mais ligada a fermentações industriais e a área de engenharia química especialmente relacionada com a produção de antibióticos, etanol, ácidos orgânicos etc. Em 1959, foi criada a revista *Biotechnology and Bioengineering*, atualmente, com 112 volumes já publicados. No Brasil, os trabalhos pioneiros em biotecnologia clássica tiveram origem em uma série de publicações conhecidas como coleção Biotecnologia editada a partir de 1975, pelos professores Eugênio Aquarone, Walter Borzani e Urgel de Almeida Lima, da Universidade de São Paulo. Esta foi uma obra pioneira sobre o tema e causou grande impacto no ensino e pesquisa da área. Em 1983 já eram cinco volumes dedicados às fermentações industriais, tecnologia das fermentações, alimentos e bebidas produzidos por fermentação, engenharia bioquímica e também corrosão microbiológica (ACEVEDO, 2001). Um dos autores da coleção sobre biotecnologia foi Walter Borzani (1924-2008), formado em engenharia química, pela Escola Politécnica, Universidade de São Paulo (EP/USP), lá trabalhando até sua aposentadoria, quando se transferiu para a Escola de Engenharia Mauá, também em São Paulo. Borzani é considerado o pai da engenharia bioquímica na América Latina, responsável pela divulgação da fermentação contínua e contribuindo ao incremento da produção de etanol no Brasil. Hoje o país é um dos maiores produtores mundiais de etanol combustível e o primeiro exportador mundial do produto. Borzani foi também o

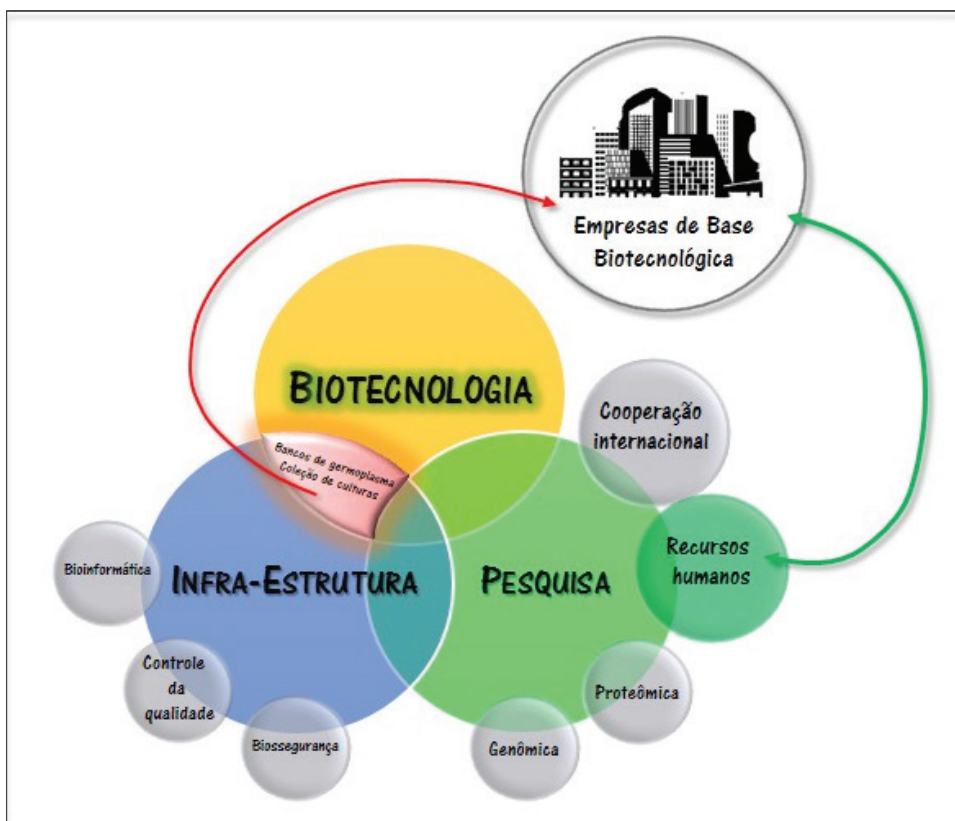
fundador da Associação Latinoamericana de Biotecnologia e Bioengenharia. De autoria de Borzani, juntamente com Aquarone, Almeida Lima e Schmidell, resultou o clássico livro *Biotecnologia industrial* (BORZANI et al., 2001) que ampliou e atualizou a coleção de biotecnologia iniciada em 1975. Como se verifica a biotecnologia, em sua forma clássica, já era difundida no Brasil. Acontece que com o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante ou engenharia genética, especialmente, a partir dos anos 70 do século XX, a biotecnologia adquiriu uma nova roupagem no mundo e no Brasil. No nosso país um ponto importante foi resultado da crise do petróleo mundial que resultou na criação do Programa Nacional do Álcool (Proalcool), em 1975, que resultou no desenvolvimento dos processos modernos de fermentação alcoólica e uso de biologia molecular para criar leveduras adaptadas ao incremento da produção de álcool de cana-de-açúcar começando a se ligar principalmente às novas tecnologias de biologia molecular. Várias empresas de biotecnologia foram criadas no exterior. Nos EUA, a Genentech (Genetic Engineering and Technology Inc.) foi a primeira empresa, criada em 1976. No Brasil, no mesmo ano, foi criada a Biobras em Montes Claros, Minas Gerais, de propriedade do professor da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) Marcos Mareguia e Guilherme Emerich, primeiramente produzindo insulina por métodos convencionais e depois por tecnologia do DNA recombinante. A empresa foi depois adquirida por uma multinacional (Novo Nordisk). Também no Brasil, a Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (SBPC) e a Sociedade Brasileira de Genética (SBG) em seus congressos nacionais, a partir de 1975-1976, já apresentaram simpósios sobre genética e melhoramento de micro-organismos na biotecnologia o mesmo fazendo a Sociedade Brasileira de Microbiologia (SBM) em 1977. Em 1973, foram iniciadas as reuniões de genética de micro-organismos, dedicadas aos mais diversos tópicos básicos e aplicados, mas envolvendo, especialmente a partir de 1980, aspectos da biotecnologia de micro-organismos (PIZZIRANI-KLEINER; AZEVEDO, 2006; AZEVEDO, 1996). Estas foram contribuições para que a moderna biotecnologia fosse estabelecida no Brasil. Em 1975, foi criado o Programa Integrado de Genética (PIG), parceria entre Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Financiadora de Estudos e Projetos (Finep) que durou até meados dos anos 80 do século XX e muito contribuiu para que, especialmente grupos emergentes nos diversos Estados brasileiros pudessem iniciar e contribuir com projetos que resultaram nas bases da biotecnologia e tecnologia do DNA recombinante no Brasil. Em 1982, foi realizado no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (Inpi), no Rio de Janeiro, um curso sobre biotecnologia, engenharia genética e Patentes. Em 1983, na Universidade de Brasília (UNB), foi realizado o primeiro curso sobre fundamentos de biotecnologia. Estes cursos foram depois realizados em outras localidades incluindo Piracicaba, Londrina, Vitória, Campos de Giotacazes, Manaus, Parintins etc. Muitas associações entre pesquisadores de diferentes instituições de ensino e pesquisa no Brasil foram iniciadas e resultaram em projetos de interesse biotecnológico no país.

Do ponto de vista das instituições de financiamento à pesquisa e ensino no Brasil, em 01/04/1981, foi criado um grupo de estudos para formular projetos em biotecnologia, iniciativa de pesquisadores brasileiros com apoio do CNPq e Finep. Em 1982, foi criado o Programa Nacional de Biotecnologia (Pronab) no CNPq com primeira reunião em 16/06/1982 e com a subsequente reunião de avaliação do programa realizado pelo CNPq e Finep em São Paulo no final de 1983. Em 1984, dentro do Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT) surgiu publicação ressaltando a importância do Programa Nacional de Biotecnologia para as diferentes áreas de interesse no Brasil inclusive a de micro-organismos. O CNPq definiu biotecnologia como a utilização de sistemas biológicos na obtenção de produtos ou desenvolvimento de processos industriais. Houve financiamento de simpósios e cursos dedicados à biotecnologia de micro-organismos em diferentes instituições de pesquisa e ensino no Brasil. Em Porto Alegre (RS), em 1984, foi realizado, com a participação de pesquisadores em empresários, com financiamento do Banco de Desenvolvimento do Rio Grande do Sul (Badesul) o Simpósio de Biotecnologia que foi um marco inicial para a fundação do Centro de Biotecnologia do Rio Grande do Sul na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Outros centros de biotecnologia foram estabelecidos, por exemplo, o de Microbiologia Agrícola na Esalq (CEBTEC), localizado em Piracicaba, com simpósios anuais internacionais desde 1982. Na Embrapa, o Centro Nacional de Recursos Genéticos (Cenargen), localizado em Brasília (DF), adquiriu uma nova área, a de biotecnologia. Em 1994 foi criado o Programa Nacional de Diversidade Biológica (Pronabio) tendo em vista nossa alta biodiversidade, uma das maiores do planeta. Em 1988 foi criada a Sociedade Brasileira de Biotecnologia (SBBiotec) que congrega pessoal de pesquisa, ensino e empresários na área de biotecnologia, realizando congressos nacionais em diferentes Estados brasileiros. A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), depois de estudos preliminares deslanchou o Programa Genoma, no ano 2000, publicou trabalho na conceituada revista *Nature*, com dados do primeiro genoma de uma bactéria fitopatogênica sequenciado no mundo. O projeto reuniu mais de 40 laboratórios de pesquisa do Estado de São Paulo e contribuiu, na época, para a formação de grupos de pesquisa a fim de trabalhar em conjunto e na formação de recursos humanos na área.

Cursos de graduação e pós-graduação em biotecnologia foram iniciados. Embora a pós-graduação brasileira apresentasse, desde seu início, programas de pós-graduação envolvidos em biotecnologia, considerando a multi e interdisciplinariedade da área, a Comissão de Aperfeiçoamento do Ensino Superior (Capes) criou, em 2008, a área de programas de pós-graduação em biotecnologia que cinco anos depois, em 2013, abrangia 45 programas sendo 23 de mestrado e doutorado, 12 só de mestrado e três só de doutorado além de sete mestrados profissionais. Nesta época, os programas estavam presentes em todas as regiões

brasileiras: Sudeste (18 cursos), Sul (9), Nordeste (9), Norte (6) e Centro-oeste (3). Em 2015, já são mais de 55 programas incluindo o de biotecnologia ambiental, na Universidade Estadual de Maringá (UEM), recém-aprovado pela Capes (mestrado em 2013 e doutorado em 2016), cujos primeiros alunos de mestrado defenderam suas dissertações em julho de 2015.

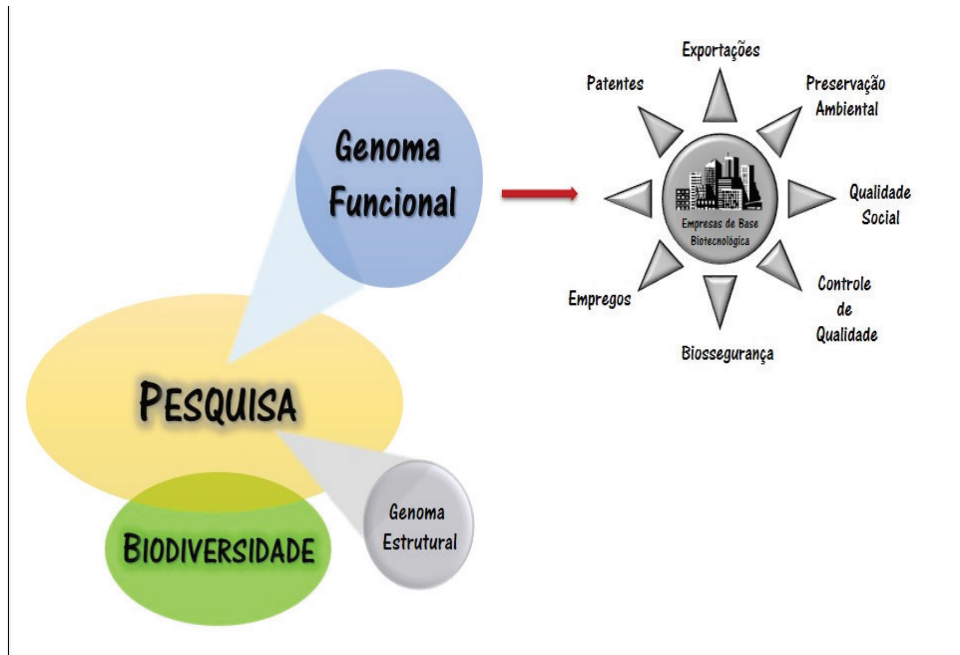
Nota-se que a biotecnologia de micro-organismos veio para se estabelecer e é de enorme importância para o Brasil. Com a diversidade brasileira, uma das maiores do mundo a potencialidade é enorme e já foi reconhecida pela comunidade científica brasileira. Em estudo realizado no Centro de Gestão em Estudos Estratégicos (CGEE), em Brasília, um resumo desta potencialidade foi apresentado na época no início dos anos 2000 (Figura 1). Podem-se ver as relações entre biotecnologia, diversidade biológica, interação com empresas e biossegurança.



**Figura 1** - Uma visão holística da biotecnologia e importância da biodiversidade brasileira para a pesquisa e formação de empresas de biotecnologia.

Fonte: Os autores.

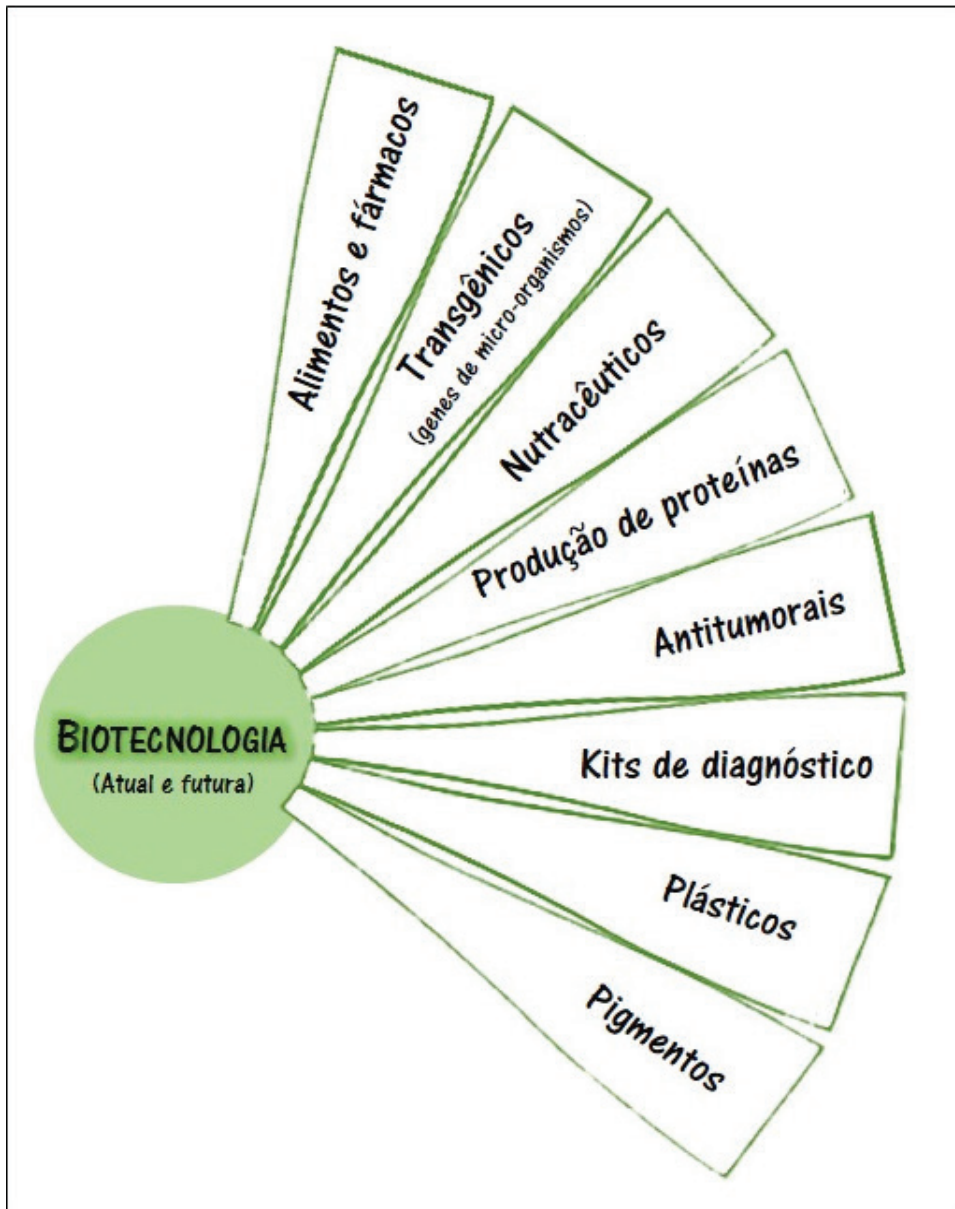
A Figura 2 apresenta as relações entre pesquisa oriunda da biodiversidade brasileira e as novas tecnologias ressaltando a genômica e outras 'omicas' e empresas de biotecnologia com implicações em patentes, biossegurança, geração de empregos e outras.



**Figura 2** - A pesquisa em biotecnologia e a geração de empresas de biotecnologia com formação da consciência em áreas de biossegurança, patentes, formação de recursos humanos e outras.

Fonte: Os autores.

Com esta perspectiva, algumas etapas atuais e futuras da biotecnologia estão apresentadas na Figura 3 (biotecnologia atual e futura) e principalmente as áreas de maior interesse para o Brasil estão apresentadas na Figura 4.



**Figura 3** - Alguns exemplos de destaque na biotecnologia atual e futura.

Fonte: Os autores.



**Figura 4** - As perspectivas mais importantes no desenvolvimento da biotecnologia brasileira.  
Fonte: Os autores.

## 1.7 Conclusões

Este é um apanhado de como a microbiologia se desenvolveu e de como a biotecnologia está nos seus primórdios no Brasil. A história da biotecnologia brasileira ainda é recente, mas sua importância tendo em vista suas possibilidades é enorme. Como mencionado, o Brasil é um país com alta diversidade biológica, com extensão de litoral e quantidade de água doce dentre as maiores do mundo em uma época em que cada vez mais este líquido torna-se importante. Possui também uma atividade agropastoril imensa, graças ao seu território praticamente todo apto a ser cultivável. Desta forma, a biotecnologia brasileira deve apresentar cada vez mais importância para o desenvolvimento de produtos e processos de valor aplicado que é o foco fundamental desta área. O presente livro surge para apresentar capítulos de interesse para a biotecnologia de micro-organismos no Brasil e no mundo, envolvendo bactérias,

fungos, vírus e algas e servindo de base para despertar o interesse de estudantes de graduação, pós-graduação e demais estudiosos do assunto.

## Referências

ACEVEDO, F. Prefácio. In: BORZANI, W. et al. (Coord.). **Biotecnologia industrial**. São Paulo: E. Blucher, 2001. p. 9-10.

AZEVEDO, J. L. A genética de microrganismos e seus 40 anos de existência no Departamento de Genética da Esalq/Universidade de São Paulo. In: ENCONTRO SOBRE TEMAS DE GENÉTICA E MELHORAMENTO, 13., 1996. **Anais...** Piracicaba: Esalq. Departamento de Genética, 1996. p. 71-94.

BACILA, M. A Trajetória de “Arquivos de Biologia e Tecnologia”, Publicação que Marcou Época na História da Ciência Brasileira. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. jubilee, n. 0, p. 1-11, 2001 .

BENCHIMOL, J. L. Domingos José Freire e os primórdios da bacteriologia no Brasil. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 1, p. 67-98, 1995.

BENCHIMOL, J. L. A instituição da microbiologia e a história da saúde pública no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 2, p. 265-292, 2000.

BIER, O. G. **Bacteriologia e imunologia**. São Paulo: Melhoramentos, 1941.

BORZANI, W. et al. Eugênio. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: E. Blucher, 2001. v. 1-4.

BUENO, A. F. et al. Histórico e evolução do manejo integrado de pragas da soja no Brasil. In: HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F. (Ed.). **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Brasília, DF: Embrapa, 2012. p. 37-74.

CARLOS Chagas. In: WILKIPEDIA: a enciclopédia livre. 2017. Disponível em: <[https://pt.wikipedia.org/wiki/Carlos\\_Chagas](https://pt.wikipedia.org/wiki/Carlos_Chagas)>. Acesso em: 20 fev. 2017.

CARMO, V.; ALVIM, Z. **Chão fecundo: 100 anos de história do Instituto Agronômico de Campinas**. Campinas: Agroceres, 1987.



ESALQ. **Esalq 75 anos a serviço da pátria**. Piracicaba: Queiróz, 1976. Edição comemorativa.

EVELYN, J. **Sylva, or a discourse of forest-trees and the propagation of timber in His Majesty's dominions**. 1th ed. London: Royal Society, 1664.

FIDALGO, O. A história da micologia brasileira. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA, 2., 1985, Recife. **Anais**. Recife: SBHC, 1985. p. 7-24.

HENRIQUE da Rocha Lima. In: WILKIPEDIA: a enciclopédia livre. 2017. Disponível em: <<https://pt.wikipedia.org/w/index.php?search=Henrique+Rocha+Lima&title=Especial:Pesquisar&go=lr&searchToken=f42ttuxb8dzqwr6808ytfze1d>>. Acesso em: 20 fev. 2017.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. 2011. São Paulo, 2011. Disponível em: <<http://www.ial.sp.gov.br/>>. Acesso em: 21 fev. 2017.

JARDIM-FREIRE, J. R.; GAMBALÉ, W. A situação do ensino de microbiologia no Brasil. **Caderno de Farmácia**, Porto Alegre, v. 13, n. 1, p. 7-12, 1997.

JOHANNA Liesbeth Kubelka Döbereiner. In: WILKIPEDIA: a enciclopédia livre. 2017. Disponível em: <[https://pt.wikipedia.org/wiki/Johanna\\_D%C3%B6bereiner](https://pt.wikipedia.org/wiki/Johanna_D%C3%B6bereiner)>. Acesso em: 20 fev. 2017.

LACAZ, C. S. **Antibióticos**. 3. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1975.

LACAZ, C. S. et al. **Tratado de micologia médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

MOELLERING, R. Past, present, and future of antimicrobial agents. **The American Journal of Medicine**, New York, v. 99, no. 6, p. 11-18, 1995.

OSVALDO Cruz. In: WILKIPEDIA: a enciclopédia livre. 2017. Disponível em: <[https://pt.wikipedia.org/wiki/Oswaldo\\_Cruz](https://pt.wikipedia.org/wiki/Oswaldo_Cruz)>. Acesso em: 20 fev. 2017

PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Histórico inicial da genética de microrganismos no Brasil e as reuniões científicas. In: REUNIÃO DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, 25., 2006, São Pedro. **Atas e resumos**. Piracicaba: Esalq, 2006. p. 40-78.

REBOUÇAS, M. M. et al. O Instituto Biológico e seu arquivo documental. **Cadernos de História da Ciência**, São Paulo, v. 5, n. 1, p. 95-122, 2009.

REICHARDT, K. **Esalq 1901- 2001: um olhar entre o passado e o futuro**. Piracicaba: Esalq, 2001.

SCHWARTZMAN, S. **Formação da comunidade científica no Brasil**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1979.

SUASSUNA, I. Brasileiros na história da microbiologia e saúde pública 2. Gaspar Vianna (1885-1914). **Revista Paraense de Medicina**, Belém, v. 20, n. 2, p. 71-73, 2006. Disponível em: <<http://scielo.iec.pa.gov.br/pdf/rpm/v20n2/v20n2a16.pdf>>. Acesso em: 22 fev. 2017.

WAKSMAR, S. A. **Principles of soil microbiology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1927.

WILSON, P. On the sources of nitrogen of vegetation ETC. **Bacteriological Reviews**, Baltimore, v. 21, no.4, p. 215-226, 1957.



# Tópicos da diversidade de fungos e bactérias: bases da taxonomia clássica

---

João Alencar Pamphile, Juliana Bernardi-Wenzel, José Odair Pereira, Juliano Marcon Baltazar

## 2.1 Introdução

A biotecnologia microbiana está alicerçada principalmente na diversidade genética de fungos e bactérias, entre outros organismos (como as microalgas). Assim, faz-se de fundamental importância que este livro, que trata das aplicações biotecnológicas dos micro-organismos, sobretudo na área ambiental, aborde a diversidade microbiana, com enfoque nas bases da taxonomia clássica de fungos e bactérias, para que o leitor tenha melhor compreensão da distribuição dos filos nos reinos Fungi e Bacteria.

## 2.2 Taxonomia de fungos

Até o início da década de 1990, a classificação dos fungos era baseada quase que exclusivamente na taxonomia clássica, que leva em consideração as características morfológicas, citológicas e as estruturas reprodutivas dos organismos. A identificação das estruturas reprodutivas é imprescindível para que esta forma de taxonomia possa ser realizada. Porém, para muitos fungos, a identificação de estruturas reprodutivas só é possível em meio de cultura apropriado, com técnicas de cultivo e microscopia que permitam sua visualização. Além disso, a morfologia de diversas estruturas dos fungos é facilmente confundível em alguns grupos, o que dificulta sua correta distinção. Assim, nas últimas décadas, a identificação clássica de fungos tem sido associada a técnicas moleculares e bioquímicas como as baseadas em PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e sequenciamento de regiões específicas do DNA, como as codificadoras de proteínas ( $\alpha$ -tubulina,  $\beta$ -tubulina, actina, rpb1, rpb2, tef1), do rDNA (subunidade maior do ribossomo – LSU, subunidade menor do ribossomo – SSU e o espaçador interno transcrito – ITS),

entre outras, para assegurar que ambas as técnicas resultem em uma identificação correta (HIBBETT et al., 2007).

### 2.2.1 Aspectos gerais

Estima-se que existam entre 700 mil e 5 milhões de espécies de fungos em todo o mundo. No entanto, apenas cerca de 100 mil espécies foram descritas até o momento (KIRK et al., 2008; BLACKWELL, 2011). A descrição de espécies, bem como sua correta classificação, é um desafio à taxonomia clássica.

Uma das primeiras classificações científicas dos organismos foi proposta por Haeckel (1866), no qual dividia os seres vivos em três reinos. Posteriormente outras classificações foram propostas e uma das mais atuais classifica os organismos em dois domínios (Eukaryota e Procaryota) e seis reinos (Animalia, Fungi, Plantae, Chromista, Protista e Bacteria), e nelas os fungos são pertencentes ao domínio Eukaryota, ao supergrupo Opisthokonts e ao reino Fungi (CAVALIER-SMITH, 2004; BALDAUF, 2008). Atualmente, o reino Fungi está dividido em dez filos, sendo eles: Cryptomycota (JONES et al., 2011a, 2011b), Chytridiomycota (SEIF et al., 2005; JAMES et al., 2006b), Blastocladiomycota (JAMES et al., 2006b), Neocallimastigomycota (JAMES et al., 2006b), Microsporidia (JAMES et al., 2006a; KEELING, 2013), Monoblepharidomycota (DOWELD, 2001), Entomophthoromycota (HUMBER, 2012), Glomeromycota (JAMES et al., 2006a), Ascomycota (CAVALIER-SMITH, 1998) e Basidiomycota (MOORE, 1980), sendo estes dois últimos agrupados no subreino Dikarya (McLAUGHLI; SPATAFORA, 2014). Ainda, quatro subfilos são reconhecidos e tratados como incertae sedis, i.e., seu posicionamento filogenético ainda não foi determinado com precisão. São eles Kickxellomycotina, Mortierellomycotina, Mucoromycotina e Zoopagomycotina (McLAUGHLIN; SPATAFORA, 2014).

Os fungos formadores de zoósporos, como os membros dos quatro subfilos citados acima, vêm recebendo mais atenção nos estudos filogenéticos por se tratarem de grupos basais na evolução dos fungos. Conhecer melhor suas relações pode contribuir para o entendimento das modificações sofridas por estes ao longo da evolução.

Recentemente, Ruggiero et al. (2015) publicaram uma proposta de classificação para todos os organismos. Seu trabalho contou com a opinião de mais de 3.000 taxonomistas especialistas nos mais diversos grupos, e os dados foram compilados por um grupo de trabalho que incluiu um micólogo. Nesse trabalho, os autores classificam os fungos no super-reino Eukaryota, reino Fungi, e são divididos em dois subreinos e cinco filos. Essa redução se deu em parte pela transferência dos filos Cryptomycota e Microsporidia para o reino Protozoa. Dessa forma, o reino Fungi passa a incluir apenas

organismos heterotróficos absorptivos com parede celular contendo quitina. Entretanto, por ser muito recente, essa classificação ainda precisa ser analisada com cautela pela comunidade científica para que possa ser adotada.

### 2.2.2 Filo Microsporidia

O filo Microsporidia apresenta mais de 1.400 espécies (DIDIER; WEISS, 2006) e compreende fungos sem mitocôndrias e produtores de esporos. São endoparasitas obrigatórios de animais e quando não estão parasitando alguma célula, estão obrigatoriamente na forma de esporos, que são altamente resistentes às condições ambientais adversas (McLAUGHLIN; SPATAFORA, 2014). Possuem morfologia e genoma nuclear muito simples, tendo um dos menores genomas encontrados em eucariotos, por vezes menor do que de alguns procariotos (KEELING et al., 2013). Uma característica definidora destes parasitas é o mecanismo pelo qual o conteúdo dos esporos é rapidamente injetado no citoplasma do hospedeiro através de um tubo polar fino. Enquanto permanece no interior da célula do hospedeiro o patógeno não apresenta parede celular. A classificação filogenética deste grupo foi dificultada por muitos anos pela evolução extremamente rápida de seu material genético, causando divergência entre taxonomistas, o que fez com que, por muitos anos, sua nomenclatura fosse governada tanto pelo código de botânica quanto pelo de zoologia (JAMES et al., 2006a). Capella-Gutiérrez, Marcet-Houben e Gabaldón (2012), utilizando concatenação de sequências de 53 genes, comprovaram que este grupo de organismos pertence realmente ao reino Fungi. Além das sequências gênicas, fatores como características fenotípicas, do desenvolvimento e características ecológicas foram levados em consideração para a adequada classificação destes fungos, além de características como o organismo e o tipo de célula hospedeira, configuração do núcleo, número e configuração do tubo polar, tipo de divisão nuclear e celular, entre outras (DIDIER et al., 2014). Entretanto, por estarem posicionados na base da árvore filogenética do reino Fungi, alguns autores como Ruggiero et al. (2015) preferem classificá-los como protistas, juntamente com os Cryptomycota.

### 2.2.3 Filo Cryptomycota (= Rozellida ou Rozellidomycota)

O filo Cryptomycota M. D. M. Jones & T. A. Richards foi descrito recentemente (JONES et al., 2011a, 2011b) para acomodar as cerca de 22 espécies do gênero *Rozella* Cornu. A análise filogenética de Jones et al. (2011a) ainda incluiu diversas sequências de DNA obtido diretamente de amostras ambientais e depositadas na

base de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Posteriormente, *Amoebophilidium protococcarum* B.V. Gromov & K.A. Mamkaeva, uma espécie parasita de algas e considerada protista até então, foi incluída em Cryptomycota com base em análises filogenéticas (LETCHER et al., 2013). Assim como os Microsporidia, as espécies classificadas em Cryptomycota são caracterizadas por serem endoparasitas altamente sofisticados e não apresentarem parede celular durante a infecção. Os Cryptomycota possuem genoma mitocondrial, porém este é degenerado, e são organismos fagotróficos, ao contrário dos demais fungos. A parede celular encontrada em seus propágulos (p.ex., esporos e esporângios de dormência) é proveniente do hospedeiro, que geralmente é um fungo. Mas apesar de não sintetizarem parede celular, eles possuem em seu genoma nuclear quatro genes codificadores de quitina-sintetase, e esta característica é usada como argumento para incluí-los no reino Fungi (McLAUGHIN; SPATAFORA, 2014). Os poucos representantes do filo conhecidos até o momento são muito diversos em relação à sua morfologia e ciclo de vida. Espécies do gênero *Rozella* apresentam uma fase parasítica como um protoplasma mitocondriado no interior das células do hospedeiro. Ali podem formar esporângios que produzirão zoósporos, ou ainda esporângios de dormência. *Amoebophilidium protococcarum* também apresenta uma fase parasítica intracelular, onde são produzidos aplanósporos ameboides com filopódios (pseudopódios filamentosos) que serão liberados no ambiente após a lise da célula hospedeira. Jones et al. (2011a) inferiram três fases do ciclo de vida dos organismos do qual foram obtidas as amostras ambientais de DNA do seu estudo. Por meio do uso de sondas fluorescentes para marcação de genes, os autores propuseram uma fase zoospórica, outra em que são formados cistos de dormência, e uma terceira em que a célula do organismo permanece aderida a uma célula de alga, possivelmente como parasita ou comensal.

#### 2.2.4 Filo Chytridiomycota

O filo Chytridiomycota Doweld inclui os fungos verdadeiros com esporo assexuado flagelado (zoóporo), também denominados de quitrídias; os fungos desse filo apresentam quitina na parede celular, hifas simples alongadas ou formando um micélio (ou talo) e cenocíticas, com septos somente nas estruturas de reprodução, tendo como característica morfológica mais proeminente o esporângio (zoosporângio). Podem possuir ainda uma estrutura denominada rizoide, por as vezes lembrar uma raiz, que é responsável pela absorção de nutrientes e fixação do rizomicélio. Estes fungos são cosmopolitas e vivem principalmente em ambientes aquáticos, especialmente água doce ou de baixa a média salinidade ou no solo. O flagelo auxilia principalmente na locomoção na água. A maioria das espécies é saprofítica e algumas são parasitas

de algas, vegetais, animais e fungos. Alguns são mutualistas, habitam o trato digestivo de mamíferos ruminantes, sendo anaeróbicos obrigatórios. Realizam reprodução assexuada pelo zoósporo e reprodução sexuada por meiose zigótica. De acordo com James et al. (2006a), Chytridiomycota é um filo polifilético e não monofilético como até então acreditava-se. Este filo é dividido em uma classe (Chytridiomycetes Caval.-Sm.) e sete ordens (Chytridiales Cohn, Rhizophydiales Letcher, Lobulomycetales D.R. Simmons, Cladochytriales Mozley-Standr., Polychytriales Longcore & D.R. Simmons, Spizellomycetales D. J. S. Barr e Rhizophlyctidiales Letcher) segundo Powell e Letcher (2014).

### **2.2.5 Filo Monoblepharidomycota**

O filo Monoblepharidomycota Doweld também inclui fungos zoospóricos, com estrutura simples que eram classificados como quitridiomycetes e foram elevados a filo pela sua característica diferencial de reprodução sexual oogâmica. Estes fungos são saprofíticos e não foram relatados até o momento como parasitas. Este filo é dividido em duas classes (Monoblepharidomycetes J.H. Schaffn. e Hyaloraphidiomycetes Doweld) e três ordens (Monoblepharidales Sparrow, Harpochytriales R. Emers. & Whisler e Hyaloraphidiales Doweld) segundo Powell e Letcher (2014).

### **2.2.6 Filo Neocallimastigomycota**

O filo Neocallimastigomycota M.J. Powell é composto por fungos que apresentam zoósporo com um a 20 flagelos, micélio pequeno e hifas cenocíticas. São encontrados no rúmen e no ceco de grandes mamíferos herbívoros e, possivelmente, em outros ambientes anaeróbios terrestres e aquáticos. Realizam reprodução assexuada por meio de zoósporos. Apresenta apenas uma classe (Neocallimastigomycetes M.J. Powell) e uma ordem (Neocallimastigales) (HIBETT et al., 2007). Este filo foi o último a divergir dentre os filios de fungos que apresentam zoósporos, sendo distinguido dos demais por características como ausência de adereços flagelares no zoósporo, envelope nuclear totalmente fechado na metáfase, entre outras (POWELL; LETCHER, 2014). Estes fungos são de grande interesse graças a sua capacidade de digerir plantas ingeridas pelos animais, já que estão frequentemente presentes no rúmen de animais ruminantes, pela produção de enzimas como xilose isomerases e glicosil hidrolases (xilanasases, celulases), que podem ser utilizadas em biorrefinarias para a produção de biocombustíveis (GRIFFITH et al., 2010; GRUNINGER et al., 2014).



### 2.2.7 Filo Blastocladiomycota

O filo Blastocladiomycota T. Y. James é constituído por fungos que apresentam zoósporo com um único flagelo posterior e são também denominados de blastocádios. Os fungos desse filo apresentam reprodução assexuada com zoósporos, reprodução sexuada pela fusão de planogametas e ciclo de vida com a meiose ocorrendo em esporângios de dormência e produzindo zoósporos haplóides; são habitantes restritos de água e solo e parasitas de fungos, algas, invertebrados e plantas, podendo ser anaeróbios facultativos. Este filo é composto por uma classe (Blastocladiomycetes Doweld) e uma ordem (Blastocladales H.E. Petersen). Este grupo apresenta características evolutivas semelhantes ao filo Chytridiomycota, porém já apresenta características evolutivas mais derivadas e semelhantes a outros grupos, como a forma de reprodução sexuada, a formação dos polos durante a mitose e características do complexo golgiense.

Sua separação em um filo à parte é sustentada por análises moleculares utilizando rDNA (JAMES et al., 2000; JAMES et al., 2006a, PORTER et al., 2011), RPB1 (TANABE et al., 2004), RPB2 (JAMES et al., 2006a) e sequenciamento de genoma mitocondrial (SEIF et al., 2005), indicando que podem ser mais relacionados aos fungos que não apresentam zoósporos. A principal característica diferencial deste grupo é a reprodução por um zoósporo com formação de um tampão nuclear proeminente que em algumas espécies demonstram germinação bipolar das hifas. Outro fator diferencial é a parede celular espessa, pigmentada e escura que é muitas vezes ornamentada com poços, cumes ou espinhos.

Os fungos Blastocladiomycota têm servido como modelos para estudos de genética e fisiologia de fungos, além do potencial como agentes de controle biológico de pragas de plantas e vetores de doenças e por interagirem com teias alimentares aquáticas e ciclagem de nutrientes por meio de consumo e parasitismo. Este filo é dividido em cinco famílias (Blastocladiaceae H. E. Petersen 1909, Catenariaceae Couch, Coelomomycetaceae Couch ex Couch, Physodermataceae Sparrow e Sorochytriaceae Dewel) segundo James, Porter e Martin (2014).

### 2.2.8 Filo Entomophthoromycota

Os fungos pertencentes ao filo Entomophthoromycota Humber são fungos zigomicetos, i.e., já foram classificados no filo Zygomycota junto a outros fungos com algumas semelhanças, entre elas a formação de zigósporos, mas que não possuem um parentesco próximo. Este grupo inclui o filo Entomophthoromycota e mais quatro subfilos incertae sedis (Kickxellomycotina Benny, Mortierellomycotina Kerst. Hoffm. et

al., Mucoromycotina Benny e Zoopagomycotina Benny). Na classificação recente de Ruggiero et al. (2015), entretanto, estes cinco grupos foram reunidos novamente no filo Zygomycota. Os fungos pertencentes a Entomophthoromycota são saprófitos ou patógenos de artrópodes, podendo também causar micose em humanos. Eles também formam conidióforos simples ou ramificados, reproduzindo-se sexualmente por conjugação e formação de zigósporos, e assexuadamente pela formação de conídios, que podem possuir dois ou mais núcleos. As hifas são normalmente cenocíticas, mas nos saprófitos as hifas são septadas. Patógenos de artrópodes podem produzir rizoides para se fixar no hospedeiro e quebrar a cutícula do exoesqueleto. Este filo é dividido em três classes (Basidiobolomycetes Doweld, Entomophthoromycetes Humber e Neozygitomycetes Humber) e três ordens (Basidiobolales Jacz. & P.A. Jacz., Entomophthorales G. Winter e Neozygitales Humber) segundo Benny, Humber e Voigt (2014).

### **2.2.9 Filo Glomeromycota**

O filo Glomeromycota C. Walker & A. Schüßler inclui os fungos micorrízicos arbusculares (FMA). Estes fungos participam de uma associação mutualística com as raízes de plantas, na qual a planta, por meio da fotossíntese, fornece energia e carbono para a sobrevivência e multiplicação do fungo, enquanto este absorve nutrientes, minerais e água do solo transferindo-os para as raízes da planta. Este tipo de associação foi considerado fundamental para que as plantas pudessem se estabelecer na terra, sendo assim, estes fungos são cosmopolitas e co-evoluíram com as plantas com as quais se relacionam, apresentando grande importância ecológica. Uma espécie do filo, entretanto, participa de uma simbiose com cianobactérias. Os representantes deste grupo foram incluídos anteriormente no filo Zygomycota, porém diferem dos demais zigomicetos por não formarem zigósporos. Os Glomeromycota possuem hifas cenocíticas e se propagam por esporos assexuados grandes e multinucleados, os glomerosporos, que às vezes podem apresentar-se agrupados em estruturas denominadas esporocarpos. Até o momento não foram encontradas evidências de que estes fungos reproduzam-se sexualmente. Outra característica distintiva destes fungos é a produção de arbúsculos no interior da parede celular das células do parceiro vegetal. A cor, o tamanho, o número de paredes e a forma de esporos e as características de fixação das hifas são importantes critérios morfológicos utilizados para distinguir espécies, processo que depara com a dificuldade de cultivo destes fungos, que não podem ser cultivados sem a planta ao qual vivem associados. Este filo apresenta quatro ordens (Archaeosporales C. Walker & A. Schüßler, Diversisporales C. Walker & A. Schüßler, Glomerales J. B. Morton & Benny, Paraglomerales C. Walker & A. Schüßler) segundo Redecker e Schüßler (2014).

### 2.2.10 Filo Ascomycota

O filo Ascomycota Caval.-Sm. pertencente ao subreino Dikarya assim como o filo Basidiomycota (HIBBETT et al., 2007), que são considerados fungos superiores ou que divergiram mais recentemente na escala evolutiva. Estes fungos são cosmopolitas saprófitos, parasitas (especialmente de plantas), ou vivem em associação mutualística com algas unicelulares formando os líquens. O grupo é caracterizado principalmente por suas estruturas reprodutivas sexuadas, os ascos. A célula formadora do asco sofre uma meiose seguida por uma mitose, produzindo oito ascósporos. Porém, o número de ascósporos pode ser menor ou maior, por vários fatores. A reprodução assexuada também pode ocorrer pela produção de conídios (esporos provenientes de mitose) e pela fragmentação de hifas vegetativas (MADIGAN, 2010). Podem ser unicelulares (leveduriformes), filamentosos, ou ainda dimórficos, quando se apresentam filamentosos em determinadas condições e leveduriformes sob outras. Os fungos filamentosos apresentam hifas septadas. A grande maioria dos fungos conhecidos pertence a este filo, sendo conhecidas aproximadamente 64 mil espécies (KIRK et al., 2008), divididas em três subfilos (Taphrinomycotina O.E. Erikss. & Winka, Saccharomycotina O. E. Erikss. & Winka e Pezizomycotina O. E. Erikss. & Winka) e 15 classes (Taphrinomycetes O. E. Erikss. & Winka, Neolectomycetes O. E. Erikss. & Winka, Pneumocystidomycetes O. E. Erikss. & Winka, Schizosaccharomycetes O. E. Erikss. & Winka, Saccharomycetes G. Winter, Arthoniomycetes O. E. Erikss. & Winka, Dothideomycetes O. E. Erikss. & Winka, Eurotiomycetes O. E. Erikss. & Winka, Laboulbeniomycetes Engl., Lecanoromycetes O. E. Erikss. & Winka, Leotiomycetes O. E. Erikss. & Winka, Lichinomycetes Reeb et al., Orbiliomycetes O. E. Erikss. & Baral, Pezizomycetes O. E. Erikss. & Winka, Sordariomycetes O. E. Erikss. & Winka) segundo Schoch et al. (2009). Devido à quantidade e a diversidade de espécies (ca. 60% de todas as espécies de fungos), estes fungos possuem grande importância ambiental, além de industrial em vários segmentos. A grande maioria dos fungos que não apresenta reprodução sexuada ou que esta não tenha sido identificada, denominados de deuteromicetos, na verdade pertencem ao filo Ascomycota.

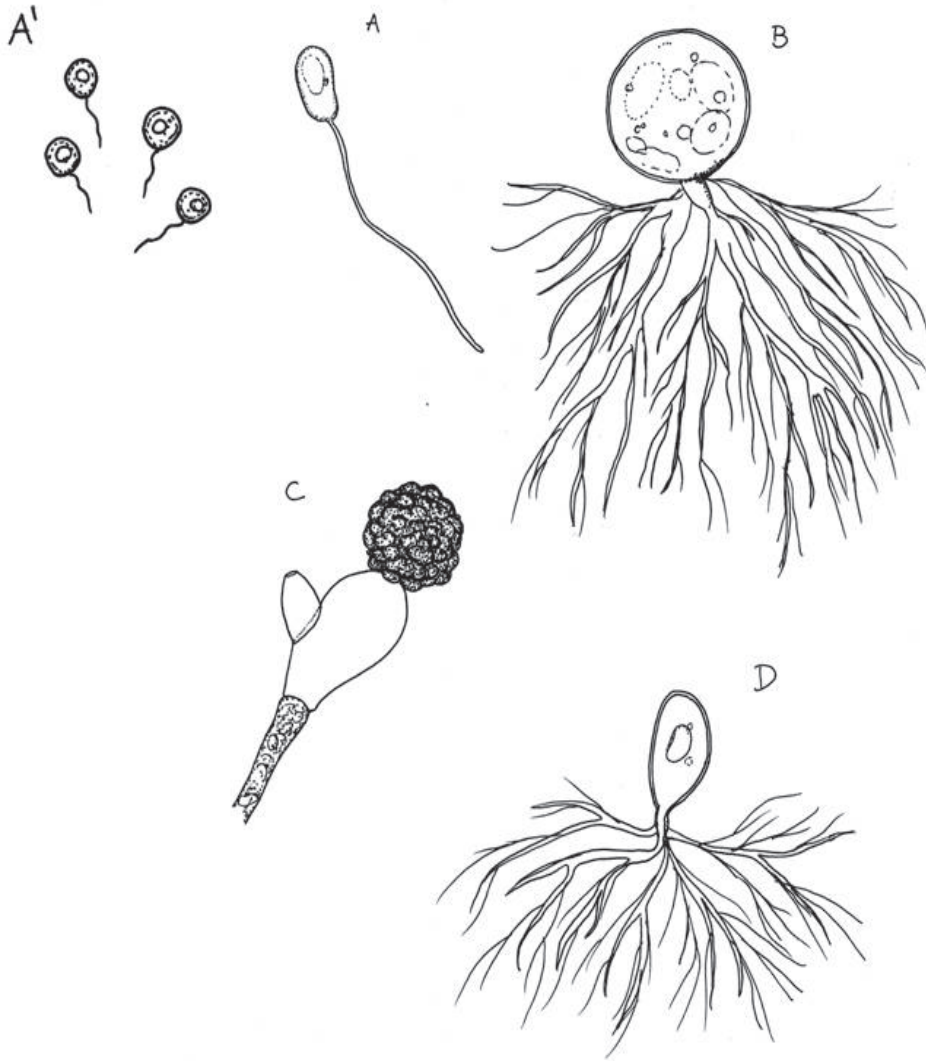
### 2.2.11 Filo Basidiomycota

Os representantes do filo Basidiomycota R. T. Moore são considerados cosmopolitas e saprófitos ou patógenos (geralmente de plantas), e vivem predominantemente em ambientes terrestres, mas com algumas espécies que ocorrem em ambientes aquáticos (tanto águas continentais como marinhas).

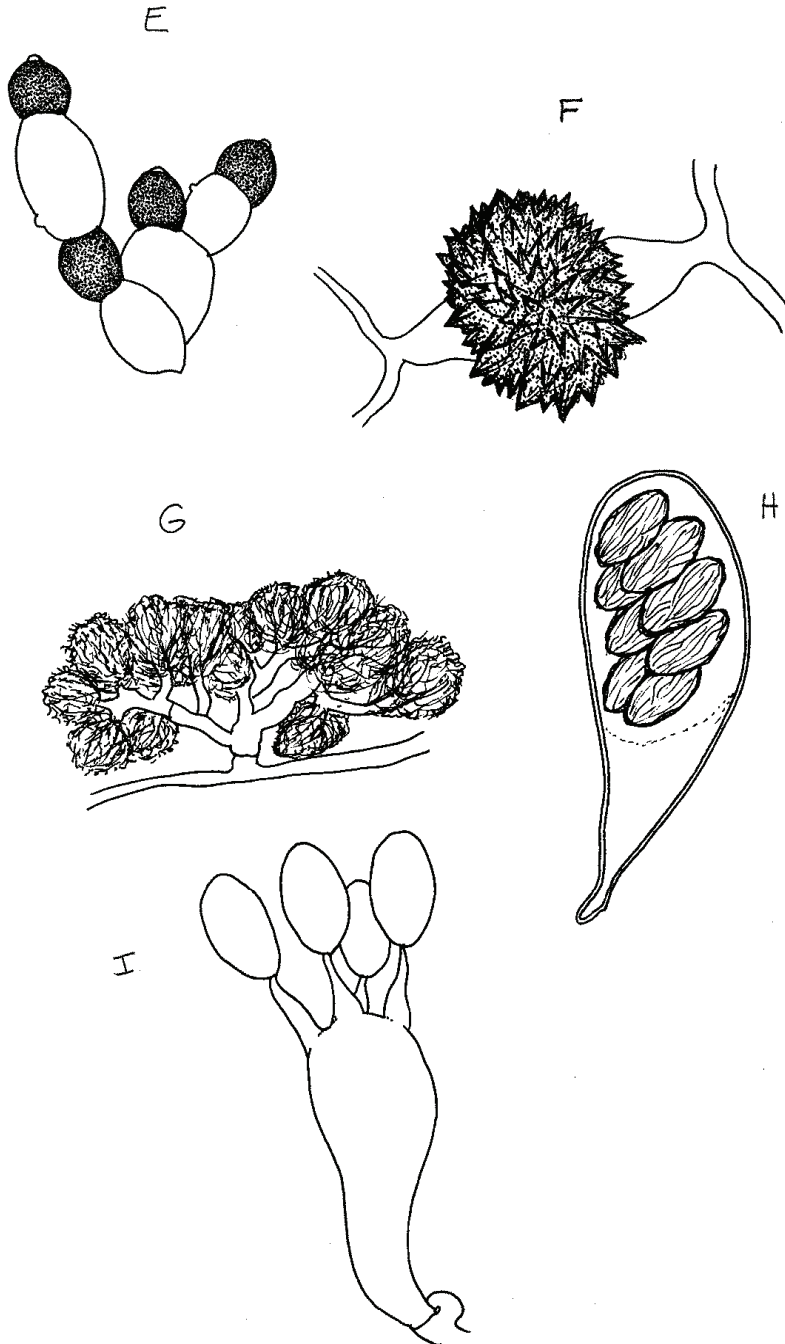
Tem como principal característica a produção dos basídios, que produzem externamente esporos sexuados, os basidiósporos, por meio de cariogamia e meiose (geralmente em número de 04 por basídio). Também podem reproduzir-se assexuadamente pela produção de conídios ou oídios, clamidósporos e artrósporos. Na maioria das espécies do subfilo mais diverso, Agaricomycotina Doweld, produz os basídios em estruturas complexas, os basidiomas. Estes são geralmente bastante evidentes e são conhecidos popularmente como cogumelos ou orelhas-de-pau. O basidioma geralmente é constituído pelo píleo (o chapéu do cogumelo), que pode ter sua superfície fértil na forma de lamelas (estrutura pregueada abaixo do píleo, onde se encontram os basídios), poros, rugas, dentes, ou ainda lisa, e pelo estipe ou pé (estrutura que sustenta o píleo), que pode estar presente ou ausente. Alguns fungos podem se encontrar no estado de levedura ou ainda serem dimórficos. Assim como os Ascomycota, possuem hifas septadas, porém várias espécies formam fíbulas, também denominadas de grampo de conexão. Estes fungos são importantes agentes decompositores, atuam em matéria orgânica vegetal morta ou como patógenos de plantas, promovem a degradação da celulose e lignina; podem também ser patógenos de animais, endofíticos ou de vida livre (MADIGAN, 2010).

Este filo possui grande importância industrial, principalmente pela produção de ácidos, pigmentos, enzimas e outras substâncias de interesse em diversos processos. Também possui importância gastronômica, podendo ser ingerido diretamente ou associado a determinados pratos, além de alguns terem também efeito alucinógeno ou serem tóxicos. Neste grupo também são incluídos os causadores de ferrugens e carvões, que são importantes patógenos que atacam várias espécies de plantas com importância agrícola. Os basidiomicetos são divididos em três subfilos (Pucciniomycotina R. Bauer et al., Ustilaginomycotina Doweld e Agaricomycotina) e 15 classes (Pucciniomycetes R. Bauer et al., Cystobasidiomycetes R. Bauer et al., Agaricostilbomycetes R. Bauer et al., Microbotryomycetes R. Bauer et al., Atractiellomycetes R. Bauer et al., Classiculomycetes R. Bauer et al., Mixiomycetes R. Bauer et al., Cryptomycocolacomycetes R. Bauer et al., Ustilaginomycetes R. Bauer et al., Exobasidiomycetes Begerow et al., Tremellomycetes Doweld, Dacrymycetes Doweld, Agaricomycetes Doweld, Wallemiomycetes Zalar et al., Entorrhizomycetes Begerow et al.), além de diversas ordens incertae sedis (HIBBETT et al., 2007).

É muito provável que os filios Basidiomycota e Ascomycota tenham uma origem em comum, já que ambos apresentam uma fase dicariótica e micélio septado.



**Figura 1-1** - Estrutura característica de fungos pertencentes aos filos A'- Cryptomycota; A - Microsporidia; B - Chytridiomycota; C - Monoblepharidomycota; D - Neocallimastigomycota.  
Fonte: Ilustração de Dr<sup>a</sup> Larissa Trierveiler Pereira.



**Figura 1-2** - Estrutura característica de fungos pertencentes aos filos E - Blastocladiomycota; F - Entomophthoromycota; G - Glomeromycota; H - Ascomycota; I - Basidiomycota.

Fonte: Ilustração de Dr<sup>a</sup> Larissa Trierveiler Pereira.

## 2.3 Taxonomia de bactérias

A taxonomia de bactérias é um grande desafio para os pesquisadores. Assim como ocorre para os fungos, técnicas clássicas de identificação baseadas na microscopia de luz, somadas à análise de morfologia da colônia, constituem uma primeira etapa no processo de caracterização taxonômica. Somadas a essas, também temos as abordagens bioquímicas e do sequenciamento do DNA do agregado gênico do rDNA 16S, ITS, 23S e 5S. Como será visto a seguir, as bactérias podem ser classificadas em diferentes sub-reinos e filos, de acordo com suas características estruturais.

### 2.3.1 Aspectos gerais

As bactérias são organismos mais simples morfologicamente do que os eucariotos, mas são tão bem-sucedidas quanto estes do ponto de vista evolutivo. Segundo Margulis e Schwartz (2001) e Mora et al. (2011), são conhecidas cerca de 10.000 formas de bactérias descritas como ‘espécies’, mas estima-se que pode haver cerca de 4 milhões de espécies em apenas uma tonelada de solo (CURTIS et al., 2002).

Algumas características genéticas desses organismos, como a transferência horizontal de genes, tornam a delimitação de táxons em todos os níveis bastante difícil. Por isso os autores citados acima utilizam a palavra ‘espécies’ citada entre aspas. Por esse mesmo motivo, não existe uma classificação em níveis taxonômicos superiores amplamente aceita para os procariotos (RUGGIERO et al., 2015).

A nomenclatura do grupo também não está estabelecida, e o Código Internacional de Nomenclatura de Bactérias governa apenas os nomes em categorias inferiores à classe (LAPAGE et al., 1992). Dessa forma, não existem nomes formais ou ‘oficiais’ para os filos e categorias superiores de procariotos, o que também dificulta a elaboração de classificações em nível de reinos e filos para estes organismos (RUGGIERO et al., 2015). Dessa forma, os nomes utilizados para estas categorias taxonômicas são informais (apesar de não serem escritos entre aspas neste livro).

As primeiras classificações científicas dos seres vivos dividiam os organismos em reino vegetal e reino animal. Dessa forma, as cianobactérias eram incluídas no primeiro reino e as bactérias heterotróficas no segundo. Haeckel (1866) foi o primeiro a separar as bactérias em um grupo próprio, que ele denominou de Monera. Este autor dividiu os organismos em três reinos (Plantae, Animalia e Protista), e os Monera estavam incluídos no reino Protista, junto com todos os organismos unicelulares e alguns outros com pouca diferenciação celular. Copeland (1938) foi o primeiro autor a tratar

as bactérias em um reino próprio, que também denominou de Monera, em um sistema de classificação com quatro reinos (Monera, Protista, Plantae e Animalia). Essa ideia foi seguida posteriormente por Whittaker (1969) em sua classificação em cinco reinos (Monera, Protista, Fungi, Plantae e Animalia).

Woese e Fox (1977) revolucionaram a classificação dos organismos defendendo a ideia de que a divisão mais básica deveria contemplar a separação entre eucariotos e procariotos. Eles propuseram três reinos: Eubacteria, compreendendo as bactérias típicas (eubactérias); Archaeobacteria, contendo as bactérias metanogênicas; e Urkaryotes, que incluía todos os eucariotos. Essa classificação teve alguns adeptos a princípio, mas foi fortemente criticada por levar em consideração principalmente dados de filogenia, usando RNA ribossomal para sustentar sua proposta, desconsiderando outros aspectos, como os bioquímicos. Isso levou os autores a reformularem sua proposta, e posteriormente propor aqueles mesmos três grupos em nível de domínios, que eles denominaram de Bacteria, Archaea e Eucarya (WOESE; KANDLER; WHEELIS, 1990). A ideia de incluir um nível acima dos reinos foi bem recebida pela comunidade científica, e vários autores passaram a usar os termos ‘domínios’, ‘impérios’, ‘super-reinos’ etc. para denominar esse nível – apesar de muitos autores usarem delimitações dos grupos bastante diferentes da proposta de Woese, Kandler e Wheelis (1990).

Uma das classificações mais respeitadas atualmente é a de Cavalier-Smith (1998), que divide os organismos em dois impérios e seis reinos (Bacteria no império Prokaryota, e Protozoa, Animalia, Fungi, Plantae e Chromista no império Eukaryota). O reino Bacteria, que inclui tanto as eubactérias como as arqueobactérias, é dividido ainda em dois subreinos (Negibacteria e Unibacteria). Algumas atualizações dessa classificação foram publicadas desde sua primeira publicação (CAVALIER-SMITH, 2004, 2010, 2013, 2014), sendo a última delas o trabalho de Ruggiero et al. (2015).

Outra classificação amplamente aceita, principalmente para fins didáticos, é a do trabalho de Margulis e Schwartz (2001). Nela as autoras classificam as bactérias no super-reino Prokarya, reino Bacteria, e dois sub-reinos: Archaea e Eubacteria. Archaea é composto por arqueobactérias metanogênicas, halófitas e termoacidófilas. Este sub-reino inclui apenas a divisão Mendosicutes, caracterizada por arqueobactérias com deficiência de parede celular, com dois filos (Euryarchaeota e Crenarchaeota). Eubacteria, por outro lado, possui três divisões: Gacilicutes (bactérias Gram-negativas), com seis filos (Proteobacteria, Spirochaetae, Cyanobacteria, Saprospirae, Chloroflexa e Chlorobia), Tenericutes (bactérias sem parede celular), com um único filo (Aphragmabacteria), e Firmicutes (bactérias com parede proteica e Gram-positivas), com cinco filos (Endospora, Pirellulae, Actinobacteria, Deinococci e Thermotogae). Cabe ressaltar que o termo ‘divisão’, como empregado pelas autoras, não corresponde em âmbito de filo e nem



é sinônimo deste termo, como costuma ser utilizado na sistemática botânica. Esta é a classificação adotada no presente livro. Os nomes aqui utilizados para os táxons acima do nível de classe não são válidos do ponto de vista nomenclatural, como foi comentado no início deste capítulo.

Ruggiero et al. (2015), em seu recente trabalho sobre a classificação de todos os organismos atuais, classificaram as bactérias no super-reino Prokaryota, e as dividiu em dois reinos: Archaea, com dois filios (Euryarchaeota e Crenarchaeota), e Eubacteria, com dois subreinos (Negibacteria e Posibacteria) e 29 filios. Assim como dito anteriormente para os fungos, esta classificação ainda é muito recente e precisa ser discutida pela comunidade científica antes de ser amplamente utilizada. Acredita-se que as Archaea, representadas pelos filios Euryarchaeota e Crenarchaeota, são as bactérias que surgiram mais recentemente na história evolutiva (CAVALIER-SMITH, 2006).

## 2.4 Filo Euryarchaeota

No filo Euryarchaeota são classificadas as arqueobactérias metanogênicas e as halófilas. Estes dois grupos são bastante distintos do ponto de vista nutricional, ecológico e fisiológico. Ambas, porém, não formam esporos e estão adaptadas a ambientes extremos. Seu parentesco só foi estabelecido a partir de análises filogenéticas moleculares. As arqueobactérias metanogênicas são anaeróbias e não podem utilizar açúcares, proteínas e carboidratos como fonte de carbono. A grande maioria delas obtém o carbono para o seu metabolismo a partir de três substâncias: formiato, metanol e acetato. Morfologicamente, podem apresentar-se na forma de bastonete, espiral ou coco. Podem ser móveis ou não, e no primeiro caso locomovem-se por meio de flagelos. São cosmopolitas e encontradas em sedimentos marinhos e de água doce, esgotos e no trato digestivo de ruminantes e insetos e, em geral, toleram temperaturas moderadas a altas. As arqueobactérias halófilas, em geral, são aeróbias obrigatórias e podem utilizar diversas fontes de carbono em seu metabolismo. Sua capacidade de sobreviver em ambientes hipersalinos e alcalinos deve-se à presença de lipídios de membrana únicos entre as bactérias, o que impede que suas membranas se rompam em ambientes com altas concentrações de sal. Apresentam grande variedade morfológica, podendo apresentar formas triangulares, retangulares, formas de disco achatado ou de cálice, ou ainda na forma de bastonetes (MARGULIS; SCHWARTZ, 2001; VERMELHO, 2008).

### 2.4.1 Filo Crenarchaeota

Neste filo são classificadas as arqueobactérias termoacidófilas. Apesar de a grande maioria ser hipertermófila – vivem em ambientes quentes, como fontes sulfurosas – alguns membros do filo são arqueobactérias que vivem em água em ponto de congelamento. Ocorrem geralmente em ambientes quentes, ácidos, ricos em enxofre e pobres em oxigênio. A espécie que sobrevive na temperatura mais alta conhecida pertence ao gênero *Pyrolobus*, suportando temperaturas de até 113°C. Muitos organismos deste grupo possuem paredes celulares reforçadas que resistem a ácidos, e por isso sobrevivem em ambientes com o pH inferior a 1. Apresentam morfologia bastante variada, inclusive quando considerada uma única colônia. Entretanto, pouco se sabe sobre sua morfologia porque os microscópios não estão preparados para o estudo de organismos tão exigentes – muitos deles não sobrevivem em temperaturas inferiores a 55°C e pH superior a 3. São cosmopolitas e encontradas principalmente em fontes geotérmicas, gêiseres e fluidos de erupções vulcânicas nos oceanos (MARGULIS; SCHWARTZ, 2001; VERMELHO, 2008).

### 2.4.2 Filo Proteobacteria

Proteobacteria é o maior filo da divisão Gracilicutes, i.e., a divisão que reúne as bactérias Gram-negativas, e inclui mais de 200 gêneros. A delimitação do filo é baseada principalmente em filogenia molecular da região 16S do RNA ribossomal, mas também com dados sobre morfologia e metabolismo. A filogenia molecular também é utilizada para dividir o filo em seus quatro grupos, os quais são denominados utilizando letras gregas:  $\alpha$  (alfa),  $\beta$  (beta),  $\gamma$  (gama) e  $\delta$  (delta). Estes grupos, porém, não apresentam nenhuma sinapomorfia com base em morfologia ou metabolismo (MARGULIS; SCHWARTZ, 2001). O filo Proteobacteria é extremamente diverso, seja em número de espécies, seja nas características que estas apresentam. Incluem bactérias aeróbias, anaeróbias facultativas e obrigatórias; autotróficas (fototróficas, quimiolitóticas e quimiorganotróficas) e heterotróficas, sapróbias ou predatórias; bactérias de vida livre e parasitas; solitárias ou agregadas; móveis (por deslizamento, espiraladas ou com flagelo polar) ou imóveis; vivem no solo ou na água. Algumas bactérias deste grupo reproduzem-se por brotamento, e os brotos podem permanecer conectados formando uma estrutura que lembra um micélio fúngico. Neste grupo encontram-se bactérias muito importantes, seja do ponto de vista ecológico (e.g., produtores primários, decompositores e fixadores de nitrogênio), econômico (e.g., produção de vinagre, decomposição de alimentos e outros produtos) e médico (e.g., parasitas). São exemplos de gêneros deste filo: *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*,

*Flavobacterium*, *Myxococcus*, *Nitrobacter*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rickettsia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Spirillum*, *Streptobacillus*, *Vibrio*, *Xanthomonas*, *Xenorhabditis* (MARGULIS; SCHWARTZ, 2001; VERMELHO, 2008).

### 2.4.3 Filo Spirochaetae

Os membros do filo Spirochaetae, também conhecidos como espiroquetas e leptospiras, são bactérias Gram-negativas de forma espiralada, o que as torna de fácil reconhecimento. Sua forma alongada, em forma de parafuso, e flexível permite que elas se movimentem de maneira ágil em líquidos viscosos. Além disso, são únicas entre as bactérias móveis por possuírem entre dois a mais de 200 flagelos internos, também denominados de filamentos axiais ou endoflagelos, localizados no espaço entre a membrana celular interna e a externa. São organismos de vida livre ou parasitas, encontrados principalmente em águas marinhas e doces, sedimentos lodosos profundos e tratos gastrintestinais de diversos animais. Os gêneros e espécies mais conhecidos, além de *Spirochaeta*, são aqueles que causam doenças em seres humanos e outros vertebrados, por exemplo: *Leptospira* spp. (causadores de leptospirose), *Treponema pallidum* (sífilis) e *T. pertenue* (bulba ou boubá). Algumas leptospiras são dependentes de oxigênio gasoso, mas a maioria das espiroquetas não tolera sequer pequenas concentrações deste gás (MARGULIS; SCHWARTZ, 2001; VERMELHO, 2008).

### 2.4.4 Filo Cyanobacteria

Este filo é um dos mais diversos de Eubacteria, e inclui milhares de formas distintas. Até a década de 1980 as cianobactérias eram consideradas plantas por muitos autores, e por isso eram denominadas de cianófitas ou algas azul-esverdeadas. De fato, a fisiologia da fotossíntese das cianobactérias é bastante parecida com a das plantas e das algas, e elas possuem tilacoides bastante similares aos dos cloroplastos. Mas em diversos aspectos elas são muito diferentes, a começar pelo fato de que as cianobactérias são organismos procarióticos, e as algas e plantas, eucarióticos. A fotossíntese realizada pelas cianobactérias difere daquela realizada pelas bactérias verdes e purpúreas. Elas possuem pigmentos diferentes, e as cianobactérias produzem oxigênio durante a fotossíntese, enquanto as demais bactérias não o fazem. Isso faz das cianobactérias, juntamente com algas e plantas, importantes produtores primários e fornecedores de oxigênio para a atmosfera. Algumas cianobactérias também são capazes de fixar nitrogênio. Vários membros deste grupo são importantes componentes dos estromatólitos, e entre cerca de 2,5 bilhões e 600 milhões de

anos atrás elas dominaram a paisagem da Terra. As cianobactérias são divididas em duas grandes classes com base em sua morfologia. A classe Coccogoneae inclui cianobactérias esféricas ou em forma de cocos. Essas cianobactérias se reproduzem por fissão binária ou formação de propágulos, que podem ser exósporos ou baeócitos. Coccogoneae inclui os gêneros *Chroococcus*, *Dermocarpa* e *Entophysalis*. Na classe Hormogoneae são classificadas as cianobactérias filamentosas. Elas podem ser ramificadas ou não, e podem se reproduzir pela produção de hormogônios (espécie de fragmentos de filamentos). São exemplos de gêneros dessa classe *Anabaena*, *Nostoc*, *Oscillatoria* e *Stigonema*. Mas nem todos os gêneros do filo Cyanobacteria são, na verdade, cianobactérias. Estudos de filogenia molecular levaram a inclusão neste filo de algumas bactérias verdes também conhecidas cloroxibactérias. Estas bactérias também realizam fotossíntese na presença de oxigênio, mas possuem pigmentos diferentes daqueles das cianobactérias. A diversidade conhecida das cloroxibactérias também é muito inferior a das suas companheiras de filo (MARGULIS; SCHWARTZ, 2001; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2011).

#### **2.4.5 Filo Saprospirae**

O filo Saprospirae é delimitado com base em filogenia molecular e inclui dois grupos distintos. O primeiro deles é composto por *Bacterioides* e outros gêneros aparentados e são caracterizados por serem fermentadores anaeróbios obrigatórios. Esse grupo de bactérias é heterotrófico, utiliza compostos orgânicos como fonte de carbono e é frequentemente encontrado nos tratos intestinais de diversos animais, incluindo o homem. O segundo grupo é denominado de flavobactérias, e inclui bactérias aeróbias que vivem em ambientes orgânicos ricos, principalmente de origem vegetal, tanto no solo como na água. Esse grupo, comum neste filo, apresenta as bactérias em forma de bastonetes retos, longos e delgados ou filamentos helicoidais, e muitas delas se movimentam por deslizamento (MARGULIS; SCHWARTZ, 2001; VERMELHO, 2008).

#### **2.4.6 Filo Chloroflexa**

Os membros do filo Chloroflexa são também denominados de fotótrofas verdes não sulfurosas ou bactérias verdes não sulfurosas. Anteriormente eram agrupadas com as bactérias verdes sulfurosas (filo Chlorobia), mas dados de filogenia molecular levaram a sua segregação. As bactérias de Chloroflexa são termófilas e frequentemente encontradas em fontes quentes (com temperatura entre 40 e 70°C), são filamentosas e deslizantes, não utilizam enxofre em seu metabolismo fotossintético e vivem em

ambientes aeróbios, sendo essas as características que as diferenciam das Chlorobia. Apesar de serem autotróficas e utilizarem  $\text{CO}_2$  na fotossíntese, espécies de *Chloroflexus* podem crescer heterotroficamente no escuro utilizando açúcares, aminoácidos e outros ácidos orgânicos para a obtenção de carbono (MARGULIS; SCHWARTZ, 2001; VERMELHO, 2008).

#### 2.4.7 Filo Chlorobia

As bactérias do filo Chlorobia são organismos fotótrofos que utilizam na sua fotossíntese a luz visível,  $\text{CO}_2$  atmosférico como fonte de carbono e compostos inorgânicos como doadores de elétrons, principalmente sulfeto de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{S}$ ) e sulfeto de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}$ ). Além disso, são anaeróbias, e por essas características são denominadas de bactérias anoxigênicas sulfurosas ou bactérias verdes sulfurosas. Devido a essas exigências metabólicas, as bactérias deste filo são cosmopolitas e encontradas em lamas anóxicas, como em partes escuras de praias e bordas de oceanos, além de espumas e em grande parte dos calcários. Como não toleram a exposição ao oxigênio, costumam desenvolver-se em camadas abaixo de cianobactérias e bactérias aeróbias heterotróficas. Os estromatólitos vivos são comunidades de diversos tipos de bactérias em camadas, dispostas segundo suas necessidades (e.g., tolerância, intolerância ou necessidade de oxigênio), e têm como importante componente as Chlorobias. Neste filo são encontradas formas como pequenos cocos, bastonetes e células elipsoides, esféricas ou filamentosas, geralmente imóveis ou movendo-se por deslizamento (MARGULIS; SCHWARTZ, 2001; VERMELHO, 2008).

#### 2.4.8 Filo Aphragmabacteria

O filo Aphragmabacteria inclui organismos conhecidos como micoplasmas. Estes são caracterizados pela ausência de parede celular e o tamanho reduzido, geralmente inferior a  $0,2 \mu\text{m}$  (são os menores organismos com crescimento autônomo conhecido), e podem apresentar formas irregulares, filamentos ou filamentos ramificados que lembram pequenas hifas fúngicas. Os micoplasmas possuem uma única membrana celular simples e ornamentada, e, apesar de não possuírem parede celular, algumas bactérias deste grupo podem apresentar materiais extramembranosos. Muitas espécies são parasitas de mamíferos e aves, e outras são simbioses que podem desenvolver quadros benignos em indivíduos com imunidade baixa. As enfermidades mais comuns relacionadas a estas bactérias são as pneumonias, e os gêneros mais conhecidos são *Acholeplasma*, *Ehrlichia*, *Mycoplasma* e *Spiroplasma*. Como não possuem paredes

celulares, os tratamentos com penicilina e outras drogas inibidoras de parede são ineficazes (MARGULIS; SCHWARTZ, 2001). Este é o único filo da divisão Tenericutes.

#### 2.4.9 Filo Endospora

O filo Endospora pertence à divisão Firmicutes, e compreende bactérias Gram-positivas anaeróbias obrigatórias e aeróbios facultativos ou obrigatórios. Entretanto, pelo menos uma linhagem dentro desse filo, incluindo o gênero *Sporomusa*, são Gram-negativas. Uma característica comum a todos os membros do filo é a baixa proporção de guanina e citosina no seu material genético. São bactérias heterotróficas, e alguns de seus membros estão entre os poucos organismos capazes de degradar lignina, juntamente com várias espécies de Basidiomycota (Fungi), e também são comuns as espécies capazes de decompor celulose. Muitas espécies produzem endósporos, característica que dá nome ao filo. As formas são bastante variadas, incluindo células esféricas, bacilos e filamentos. Algumas apresentam mobilidade, mas os mecanismos que utilizam para mover-se ainda são desconhecidos. Apresentam grande importância para o homem, seja em processos industriais (e.g., fermentação do leite e produção de ácidos) ou como causadores de infecções, principalmente de garganta. Alguns dos gêneros mais conhecidos são *Bacillus*, *Heliobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Sporolactobacillus* e *Streptococcus* (MARGULIS; SCHWARTZ, 2001; VERMELHO, 2008).

#### 2.4.10 Filo Pirellulae

O filo Pirellulae inclui bactérias Gram-positivas com pelo menos dois grupos diversos e sua delimitação é sustentada por filogenia molecular. Um deles é formado por *Chlamydia*, que apesar de lembrar superficialmente *Rickettsia* (Gram-negativas) sua classificação em Endospora está bem sustentada molecularmente. As *Chlamydia* são simbioses obrigatórias de células animais e têm muita importância para a medicina por causarem doenças em humanos e em aves, incluindo o tracoma ou conjuntivite granulomatosa. Apesar de serem positivas em coloração de Gram não apresentam paredes celulares glicopetídicas convencionais, e por isso são interpretadas por muitos bacteriologistas como não sendo nem Gram-positivas nem Gram-negativas. Entretanto, estudos recentes mostraram que as *Chlamydia* e outros membros deste filo possuem peptidoglicanos nas suas paredes celulares (JESKE et al., 2015). Outros gêneros como *Pirellula* e *Planctomyces* vivem em água doce, são heterotróficos e se reproduzem por brotos. Apresentam formas globulares ou piriformes (i.e., em forma de pera) com longas hastes, o que dá nome ao filo (MARGULIS; SCHWARTZ, 2001).

### 2.4.11 Filo Actinobacteria

Este filo inclui as actinobactérias filamentosas, também conhecidas como actinomicetos, e as bactérias corineformes, ambas as bactérias Gram-positivas. As actinobactérias produzem filamentos multicelulares, denominados de micélios. Apesar de terem sido tratados inicialmente como fungos, e por isso eram denominadas de actinomicetos, as actinobactérias são típicos procaríotos, e seu micélio se parece apenas superficialmente aos micélios formados por hifas fúngicas. Essas bactérias produzem propágulos de dormência nas extremidades dos filamentos, denominados de actinosporos. As formas filamentosas são fixas, mas algumas espécies podem dividir-se em cocos que se movimentam por meio de flagelos. Outras ainda podem formar bactérias unicelulares imóveis, separadas dos filamentos. São cosmopolitas, e desenvolvem-se no solo, na água, ou ainda em humanos, causando doenças. Alguns membros de *Frankia* são simbióticos com plantas, formando nódulos onde fixam nitrogênio, em uma relação muito parecida com a das bactérias do gênero *Rhizobium* (filo Proteobacteria). São gêneros conhecidos de actinobactérias: *Actinomyces*, *Actinoplanes*, *Dermatophilus*, *Frankia*, *Mycobacterium*, *Mycococcus*, *Nocardia* e *Streptomyces* (produtor de estreptomicina). As bactérias corineformes são bacilos, às vezes muito alongados e em forma de varetas retas ou curvadas. Em alguns gêneros podem apresentar até 20 projeções citoplasmáticas em forma de espinhas. Ambos os grupos que compõem este filo são aeróbios encontrados no solo e/ou em matérias vegetais (MARGULIS; SCHWARTZ, 2001; VERMELHO, 2008).

### 2.4.12 Filo Deinococci

Os representantes do filo Deinococci são bactérias heterotróficas, aeróbias, e altamente resistentes. Espécies de *Deinococcus* são aeróbios facultativos ou obrigatórios, e possuem um eficiente mecanismo de reparação de DNA. Além disso, são altamente resistentes a dissecação e a radiação ultravioleta. Algumas espécies do gênero são encontradas em ambientes hipersalinos. O gênero *Thermus*, por outro lado, inclui bactérias quimiotróficas termófilas que vivem em temperaturas entre 60 e 80°C. Representantes deste gênero são muito importantes na indústria e na pesquisa científica devido à produção da enzima *Taq* polimerase, que é usada na técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) (MARGULIS; SCHWARTZ, 2001; VERMELHO, 2008). Apesar de os membros de Deinococci terem divergido de um ancestral comum, os mecanismos de resistência a condições adversas evoluíram de forma independente em *Deinococcus* e *Thermus* (OMELCHENKO et al., 2005). Os membros deste filo possuem uma parede celular bastante espessa, às vezes com diversas camadas, sendo que

pelo menos uma delas é Gram-positiva, mas algumas camadas possuem estrutura semelhante às paredes de bactérias Gram-negativas.

### 2.4.13 Filo Thermotogae

No filo Thermotogae são classificadas bactérias extremófilas descritas relativamente recente, e suas sequências de RNA ribossomal são muito diferentes das demais bactérias conhecidas até o momento. Em alguns gêneros, as células destas bactérias possuem um envoltório, ou 'toga', o que dá o nome ao filo. Apesar de serem Gram-negativas, os peptidoglicanos que formam suas paredes são distintos dos encontrados nas demais bactérias (BONIFACE et al., 2009). As bactérias deste filo são hipertermófilas e, em geral, vivem em temperaturas entre 50 e 90°C, sendo que algumas têm temperatura ótima de crescimento entre 70 e 80°C. São fermentadoras obrigatórias e não toleram o oxigênio e vivem em fontes de gases quentes no fundo do mar, em sedimentos marinhos quentes e em vulcões. A presença de bactérias extremófilas tanto em Archaea como em Eubacteria pode ser explicada pela transferência horizontal de genes, como foi elucidado para *Thermotoga maritima* (NELSON et al., 1999). Apesar de poucas espécies deste grupo serem conhecidas até o momento, acredita-se que à medida que novos ambientes extremos sejam explorados muitas outras espécies novas possam ser encontradas.

## 2.5 Conclusões

Neste capítulo destacamos a importância da taxonomia clássica e os avanços recentes da taxonomia molecular baseada no sequenciamento do DNA. A identificação de fungos e bactérias, com o correto posicionamento das linhagens de interesse biotecnológico em uma determinada classe, ordem, família, gênero e espécie, são de fundamental importância para o correto desenvolvimento de um produto ou processo de interesse da sociedade.

## Referências

BALDAUF, S. An overview of the phylogeny and diversity of eukaryotes. **Journal of Systematics and Evolution**, Oxford, v. 46, no. 3, p. 263-273, 2008.



BENNY, G; HUMBER, R; VOIGT, K. Zygomycetous Fungi: Phylum Entomophthoromycota and Subphyla Kickxellomycotina, Mortierellomycotina, Mucoromycotina, and Zoopagomycotina. In: MCLAUGHLIN, D.; SPATAFORA, J. (Ed.). **The Mycota systematics and evolution**. Part A VII. 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag, 2014. p. 209-250.

BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? **American Journal of Botany**, Lancaster, v. 98, no. 3, p. 426-438, 2011.

BONIFACE, A. et al. The elucidation of the structure of *Thermotoga maritima* peptidoglycan reveals two novel types of cross-link. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 284, no. 33, p. 21856-21862, 2009.

CAPELLA-GUTIÉRREZ, S.; MARCET-HOUBEN, M.; GABALDÓN, T. Phylogenomics supports microsporidia as the earliest diverging clade of sequenced fungi. **BMC Biology**, London, v. 10, no. 1, p. 47-60, 2012.

CAVALIER-SMITH, T. A revised six-kingdom system of life. **Biological Reviews**, Cambridge, v. 73, no. 3, p. 203-266, 1998.

CAVALIER-SMITH, T. Early evolution of eukaryote feeding modes, cell structural diversity, and classification of the protozoan phyla Loukozoa, Sulcozoa, and Choanozoa. **European Journal of Protistology**, Stuttgart, v. 49, no. 2, p. 115-178, 2013.

CAVALIER-SMITH, T. Kingdoms Protozoa and Chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree. **Biology Letters**, London, v. 6, no. 3, p. 342-345, 2010.

CAVALIER-SMITH, T. Only six kingdoms of life. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences**, London, v. 271, no. 1545, p. 1251-1262, 2004.

CAVALIER-SMITH, T. Rooting the tree of life by transition analyses. **Biology Direct**, New York, v. 1, no. 1, p. 19, 2006.

CAVALIER-SMITH, T. The neomuran revolution and phagotrophic origin of eukaryotes and cilia in the light of intracellular coevolution and a revised tree of life. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, New York, v. 6, no. 9, p. a016006, 2014.

COPELAND, H. F. The kingdoms of organisms. **Quarterly Review of Biology**, New York, v. 13, no. 4, p. 383-420, 1938.

- CURTIS, T. et al. Estimating prokaryotic diversity and its limits. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, D.C., v. 99, no. 16, p. 10494-10499, 2002.
- DIDIER, E. et al. Microsporidia In: McLAUGHLIN, D.; SPATAFORA, J. (Ed.). **The Mycota systematics and evolution**. Part A VII. 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag, 2014. p. 115-140.
- DOWELD, A. ***Prosyllabus tracheophytorum***: tentamen systematis plantarum vascularium (Tracheophyta). Moscow: A. Geos, 2001.
- DIDIER, E.; WEISS, L. Microsporidiosis: current status. **Current Opinion in Infect Disease**, Hagerstown, v. 19, no. 5, p. 485-492, 2006.
- GRIFFITH, G. et al. Anaerobic fungi: Neocallimastigomycota. **IMA Fungus**, Berkeley, v. 1, no. 2, p. 181-185, 2010.
- GRUNINGER, R. et al. Anaerobic fungi (phylum Neocallimastigomycota): advances in understanding their taxonomy, life cycle, ecology, role and biotechnological potential. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 90, no. 1, p. 1-17, 2014.
- HAECKEL, E. **Generelle morphologie der organismen**: Allgemeine grundzuge der organischen formen-wissenschaft, mechanisch begrundet durch die von Charles Darwin reformirte descendenz-theorie. Berlin: G. Reimer, 1866.
- HIBBETT, D. et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, Cambridge, v. 111, no. 5, p. 509-547, 2007.
- HUMBER, R. Entomophthoromycota: a new phylum and reclassification for entomophthoroid fungi. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 120, p. 477-492, 2012.
- JAMES, T. et al. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. **Nature**, London, v. 443, no. 7113, p. 818-822, 2006a.
- JAMES, T. et al. A molecular phylogeny of the flagellated fungi (Chytridiomycota) and description of a new phylum (Blastocladiomycota). **Mycologia**, New York, v. 98, no. 6, p. 860-871, 2006b.
- JAMES, T. et al. Molecular phylogenetics of the Chytridiomycota supports the utility of ultrastructural data in chytrid systematics. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 78, no. 3, p. 336-350, 2000.

JAMES, T.; PORTER, T.; MARTIN, W. Blastocladiomycota. In: McLAUGHLIN, D.; SPATAFORA, J. W. (Ed.). **The Mycota systematics and evolution**. Part A VII. 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag, 2014. p. 177- 207.

JESKE, O. et al. Planctomycetes do possess a peptidoglycan cell wall. **Nature Communications**, New York, v. 6, no. 716, p. 6, 2015.

JONES, Meredith et al. Discovery of novel intermediate forms redefines the fungal tree of life. **Nature**, London, v. 474, no. 7350, p. 200-203, 2011a.

JONES, M. et al. Validation and justification of the phylum name Cryptomycota phyl. nov. **IMA Fungus**, Berkeley, v. 2, no. 2, p. 173-175, 2011b.

KEELING, P. et al. Comparative genomics of microsporidia. **Folia Parasitologica**, Praha, v. 52, no. 1-2, p. 8-14, 2013.

KIRK, P. et al. **Dictionary of the Fungi**. 10th ed. Wallingford: CAB International, 2008.

LAPAGE, S. et al. **International code of nomenclature of bacteria**: bacteriological code, 1990 revision. Washington, D.C.: ASM, 1992.

LETCHER, P. et al. Characterization of *Amoebophilidium protococcarum*, an algal parasite new to the Cryptomycota isolated from an outdoor algal pond used for the production of biofuel. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, no. 2, p. e56232, 2013.

MADIGAN, M. T. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MARGULIS, L.; SCHWARTZ, K. **Cinco reinos**: um guia ilustrado dos filós da vida na terra. 3rd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

McLAUGHLIN, D.; SPATAFORA, J. W. (Ed.). **The Mycota systematics and evolution**. Part A VII. 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag, 2014.

MOORE, R. T. Taxonomic proposals for the classification of marine yeasts and other yeast-like fungi including the smuts. **Botanica Marina**, Hamburg, v. 23, no.6, p. 361-373, 1980.

MORA, C. et al. How many species are there on Earth and in the ocean? **PLoS Biol.**, San Francisco, v. 9, no. 8, p. e1001127, 2011.

NELSON, K. et al. Evidence for lateral gene transfer between Archaea and Bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. **Nature**, London, v. 399, no. 6734, p. 323-329, 1999.

OMELCHENKO, M. et al. Comparative genomics of *Thermus thermophilus* and *Deinococcus radiodurans*: divergent routes of adaptation to thermophily and radiation resistance. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 5, no. 1, p. 57, 2005.

PORTER, T. et al. Molecular phylogeny of the *Blastocladiomycota* (Fungi) based on nuclear ribosomal DNA. **Fungal Biology**, Amsterdam, v. 115, no. 4-5, p. 381-392, 2011.

POWELL, M. J.; LETCHER, P. M. Chytridiomycota, Monoblepharidomycota and Neocallimastigomycota. In: McLAUGHLIN, D.; SPATAFORA, J. W. (Ed.). **The Mycota systematics and evolution**. Part A VII. 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag, 2014. p. 150-166.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

REDECKER, D.; SCHÜßLER, A. Glomeromycota. In: McLAUGHLIN, D.; SPATAFORA, J. W. (Ed.). **The Mycota systematics and evolution**. Part A VII. 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag, 2014. p. 251-270.

RUGGIERO, M. A. et al. A higher level classification of all living organisms. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 10, no. 4, p. e0119248, 2015.

SCHOCH, C. L. et al. The Ascomycota tree of life: a phylum-wide phylogeny clarifies the origin and evolution of fundamental reproductive and ecological traits. **Systematic Biology**, Washington, D.C., v. 58, no. 2, p. 224-239, 2009.

SEIF, E. et al. Comparative mitochondrial genomics in zygomycetes: bacteria-like RNase P RNAs, mobile elements and a close source of the group I intron invasion in angiosperms. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 33, no. 2, p.734-744, 2005.

TANABE, Y. et al. Molecular phylogeny of Zygomycota based on EF-1 alpha and RPB1 sequences: limitations and utility of alternative markers to rDNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 30, no. 2, p. 438-449, 2004.

VERMELHO, A. B. **Bacteriologia geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

WHITTAKER, R. H. New concepts of kingdoms of organisms. **Science**, New York, v. 163, no. 3863, p. 150-160, Jan. 1969.

WOESE, C.; FOX, G. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, D.C., v. 74, no. 11, p. 5088-5090, 1977.

WOESE, C.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, D.C., v. 87, no. 12, p. 4576-4579, 1990.

## Diversidade microbiana: causas e consequências – como acessá-las

---

Fernando Dini Andreote, Michele de Cássia Pereira e Silva

### 3.1 Introdução

Biodiversidade é um termo muito utilizado e difundido em diversos meios de comunicação, tanto acadêmico quanto comercial. No entanto, a biodiversidade como aclamada popularmente não contempla comumente a real variedade nas formas de vida de nosso planeta. Em uma análise comparativa, os sistemas biológicos mais diversos estão contidos dentro de células microbianas, em organismos microscópicos, comumente conhecidos por causarem danos ao desenvolvimento de animais e plantas. Na verdade, a extensa maioria dos micro-organismos atua de forma essencial para a manutenção de nosso ecossistema (SPRENT, 2001), pela enorme biodiversidade que compõe esta forma de vida.

A biodiversidade microbiana é distribuída dentre os três domínios que agrupam os seres vivos. Os dois primeiros domínios, Bacteria e Archaea, são exclusivamente compostos por grupos microbianos, sendo ainda observada a presença de diversos micro-organismos dentro do domínio Eukarya. Este é o maior indicativo de que a real biodiversidade está alocada em células de micro-organismos, onipresentes nos mais distintos ambientes de nosso planeta, e responsáveis pelas mais diferenciadas transformações biogeoquímicas que regem nossa biosfera (GRIFFITHS; PHILIPPOT, 2013).

Um fator que deriva desta estrutura organizacional da biodiversidade se relacionada com as características ambientais em que esta ocorre. Uma das mais primitivas teorias ecológicas na área de microbiologia dizia que ‘tudo está em todo lugar, e o ambiente seleciona’, dita pelo professor holandês Lourens Gerhard Marinus Baas Becking. Esta seleção se baseia, portanto na estruturação da biodiversidade encontrada nos diferentes ecossistemas, ou associadas a diferentes ambientes ou hospedeiros. De maneira geral, ambientes mais homogêneos, com condições ambientais mais específicas são ocupados por comunidades caracterizadas por menor

biodiversidade, enquanto que ambientes altamente heterogêneos e/ou dinâmicos (com características ambientais flutuantes no espaço e no tempo), são ocupados por maior biodiversidade. Esta característica é também observada na macroecologia. Por exemplo, a mata Atlântica é um dos biomas de maior biodiversidade de plantas e animais por sua ocorrência em ampla área geográfica, e em áreas com grande amplitude de condições ambientais ao longo do ano. Em contrapartida, florestas de regiões temperadas são menos biodiversas, principalmente devido a menor variação das condições ambientais, atrelada à ocorrência de temperaturas limitantes para o desenvolvimento de determinadas formas de vida.

Voltando à discussão sobre a diversidade biológica microbiana, é importante lembrar que a maior fração desta biodiversidade permaneceu desconhecida até recentemente. Por características intrínsecas a estes organismos, o acesso a esta biodiversidade foi por muito tempo fator limitante para sua melhor descrição e exploração biotecnológica. Sabe-se, hoje, que os métodos tradicionalmente utilizados em estudos de microbiologia são extremamente limitantes para estudos de biodiversidade, atuando de forma seletiva na obtenção de colônias de células microbianas a partir de amostras ambientais. Este problema é, em grande parte, solucionado quando se acoplam a estes estudos estratégias denominadas de metodologias independentes de cultivo (HUGENHOLTZ et al., 1998). Estes métodos utilizam biomoléculas para inferir sobre a ocorrência de grupos microbianos em diferentes ambientes, além de dar base a constatações mais fiéis da estruturação destas comunidades, e do potencial biotecnológico que estas hospedam.

Este capítulo apresentará estes temas, passando pelas causas e consequências da biodiversidade microbiana, usando posteriormente a vida microbiana no solo como exemplo, e será finalizado com uma apresentação das diferentes metodologias disponíveis para estudos da microbiologia ambiental.

### **3.2 Causas e consequências da diversidade microbiana**

Ao contemplarmos o panorama inicialmente apresentado, algumas questões devem surgir como, por exemplo, as causas e as consequências da ocorrência ou não da biodiversidade nos mais diferentes ambientes.

Na busca de explicar sobre a primeira delas, pode-se primeiramente descrever aspectos da especiação de grupos microbianos. Apesar deste processo ter as mesmas bases que regem em plantas e animais (como mutação e recombinação), processos mais específicos como a transferência horizontal de genes, são conhecidamente mais

importantes em grupos microbianos do que nos demais organismos vivos. Alguns estudos indicam que este processo foi dominante no início da diversificação da vida (OCHMAN; LAWRENCE; GROISMAN, 2000), sendo apenas sobreposto por processos de mutação e recombinação em organismos mais complexos, onde a informação genética é mais protegida deste processo.

A consequência da biodiversidade está relacionada à manutenção dos processos biológicos nos mais diferentes ambientes. Considerando que a microbiologia ambiental dá base às diferentes transformações biogeoquímicas que sustentam os diferentes sistemas, a variabilidade do ambiente requer a ocorrência da biodiversidade para sua manutenção frente à variação ambiental. Esta afirmação se baseia na primeira característica relacionada à diversidade do ambiente, à redundância funcional, que permite ao sistema manter sua funcionalidade frente as variações ambientais (LAWTON et al., 1996), sendo portanto a queda na redundância funcional ligada à perda de processos metabólicos ambientais. Outra característica atrelada à biodiversidade é a versatilidade metabólica ambiental, caracterizada como a capacidade de desempenhar diversas transformações metabólicas, o que fornece ao ambiente uma grande capacidade de ciclagem de compostos.

Diversas são as vertentes de estudo que utilizam este pilar para relacionar de forma mais direta a ocorrência da biodiversidade com os denominados serviços ambientais, e sustentação para o desenvolvimento de organismos maiores, descritos como mais complexos, porém altamente dependentes de seus simbioses.

### **3.3 Estudo de caso: A biodiversidade do solo**

Parte essencial do sistema solo, os organismos que o habitam possuem funções de grande importância, desde aquelas mais amplamente conhecidas, como a degradação de compostos orgânicos e consequente ciclagem de nutrientes (MIRANSARI, 2013), as funções mais específicas, como a fixação biológica de nitrogênio (RAYMOND et al., 2004; BALDANI et al., 1997), ou o auxílio às plantas na absorção de nutrientes (MIRANSARI, 2013).

No entanto, antes de comentar mais especificamente sobre estas funções, faz-se necessário descrever os grupos de organismos que fazem parte da fração viva do solo, uma vez que estes são amplamente diversos (BRADY; WEIL, 2013), englobando desde organismos procarióticos, como bactérias e arqueias (que compreendem 02 dos 03 domínios da vida); e organismos eucarióticos, onde se destacam os fungos. Também estão presentes os insetos, os nematoides, os protozoários, as algas, os oligoquetas



(minhocas); e até mesmo os vírus, que têm seu papel ainda muito pouco explorado neste ambiente (BRADY; WEIL, 2013).

Os diferentes grupos de organismos são por vezes estudados separadamente, dando origem a grupos didaticamente distintos, como os que constituem a denominada fauna do solo (organismos maiores), e a microfauna do solo (organismos menores) (GILLER, 1997). Dentre as funções atribuídas aos componentes da fauna do solo se destacam a degradação inicial de componentes orgânicos (incorporação e trituração), e a atuação na estruturação dos solos (GILLER, 1997), sendo a presença ou abundância destes organismos também usados como índices de qualidade do solo (BARTZ; PASINI; BROWN, 2013). Já em relação aos organismos de menor tamanho, as funções são mais numerosas, principalmente pela maior diversidade metabólica encontrada em bactérias, fungos e arqueias quando comparados aos demais organismos componentes da biologia do solo. Esta maior diversidade está diretamente relacionada à variabilidade genética e metabólica presente em tais organismos, o que se deve à origem e à evolução dos mesmos, tornando-os o componente principal do metabolismo do sistema solo.

Ainda dentro de linhas gerais, podem-se enumerar dois processos microbianos tidos como os maiores exemplos do benefício dos micro-organismos no desenvolvimento vegetal: a fixação biológica do nitrogênio e as micorrizas (RAYMOND et al., 2004). Essas interações são amplamente estudadas, sendo que muitos detalhes que regem estes tipos de simbioses estão descritos na literatura. No entanto, a diversidade microbiana presente nos solos é enorme e muitos outros processos podem ocorrer em caráter essencial na manutenção deste sistema, influenciando no desenvolvimento das plantas. Assim, o grande desafio reside em descrever esses processos, e manipulá-los de forma otimizada, obtendo maior eficiência energética na produção vegetal. A visão de uma vasta diversidade microbiana é ainda recente, uma vez que esta foi apenas obtida com a utilização de métodos independentes de cultivo, os quais nos é permitido acessar e entender com maior profundidade a complexidade biológica do sistema solo.

### **3.4 Causas e consequências da biodiversidade dos solos**

A diversidade das formas de vida no solo é bastante vasta, sendo esta regida pela grande heterogeneidade deste ambiente, que reflete na heterogeneidade espacial de organismos de tamanho reduzido. Apesar de o solo ter aparência homogênea, este ambiente é composto de uma grande diversidade de nichos, sendo cada um deles compostos por uma distinta combinação de fatores

ambientais. Somada a esta heterogeneidade espacial, ocorre a heterogeneidade temporal como, por exemplo, flutuações na temperatura, que ocorrem em um solo do cerrado ao longo de um dia, ou em um solo do pampa ao longo do ano. As flutuações na temperatura acarretam alterações na atmosfera do solo e aos valores de pH do mesmo, influenciando diretamente os grupos microbianos que compõem as comunidades microbianas dos solos (FIERER et al., 2007). Com este cenário, gera-se a condição ambiental perfeita para que, em longo prazo, mantenha-se uma enorme diversidade de formas de vida nesses ambientes, sendo frações desta diversidade total beneficiados a cada milímetro e a cada minuto dentro do solo em que se encontram.

A ocorrência desta grande biodiversidade nos solos é de extrema importância para o seu funcionamento. Sabe-se que a fração viva do solo é essencial para a funcionalidade dos mesmos. No entanto, o desempenho de funções similares em solos distintos pode ser tanto realizado pelo mesmo grupo de organismos, ou por organismos distintos, num processo altamente dependente da biodiversidade, denominado de redundância funcional. Se tomarmos como exemplo para este termo um solo de ambiente natural, podemos sugerir que a alta biodiversidade do solo supre a necessidade de todas as suas funcionalidades frente às variações ambientais características do sistema. Isto se dá pelo fato de que a cada nova condição ambiental um dos componentes da biodiversidade é capaz de desempenhar a função desejada. Assim, mesmo que o ambiente mude, este sempre encontrará uma fração da biodiversidade capaz de suprir o solo com a função desejada sob aquela condição específica. No entanto, se este solo passa por um processo de biodegradação, a redundância funcional tende a decrescer, tornando o sistema mais suscetível a perdas de funções frente às variações ambientais. Um exemplo deste processo está no trabalho que mostrou que a remoção da floresta diminui a beta diversidade deste bioma (RODRIGUES et al., 2013), indicando a homogeneização da microbiota em áreas de floresta convertidas para o uso como pastagem. Este trabalho se complementa num outro do mesmo grupo que indica a diminuição de funções microbianas componentes do microbioma da área de pastagem quando comparado à área de floresta (PAULA et al., 2014).

Em relação à diversidade de vida nos solos agrícolas, o principal foco de estudo está na compreensão da estruturação das comunidades de organismos do solo, e na futura exploração deste recurso biológico natural e onipresente em todos os solos utilizados para a produção vegetal no mundo. Pode-se sugerir que seja possível, após um conhecimento aprofundado sobre a estruturação das comunidades vivas do solo, manipular o microbioma residente nestes solos de forma a explorar de maneira otimizada este recurso na otimização e sustentabilidade da produção vegetal mundial.

### 3.5 O acesso à diversidade microbiana

Uma vez que a diversidade da vida no nosso planeta é enorme, e a adaptação dos diferentes organismos se dá em condições distintas um dos outros, pode-se imaginar que apenas uma minoria pode ser facilmente cultivada em condições de laboratório (STALEY; KONOPKA, 1985). Se considerarmos uma placa de cultivo na qual as condições nutricionais e físicas são constantes e homogêneas, podemos facilmente observar a contradição em representar as comunidades microbianas do solo por meio de colônias obtidas em meios de cultivo. Estudos recentes, focados na descrição de grupos bacterianos presentes no solo, porém de difícil cultivo, tem revelado a estratégia evolutiva desses organismos, como a organização genômica compacta, o que leva a maior eficiência na multiplicação celular, porém ligada a grande dependência da interação com demais organismos para completar seu ciclo vital (DINI-ANDREOTE et al., 2012). Assim, não apenas as condições de cultivo, mas nossa visão antrópica de obter os componentes das comunidades microbianas dos solos de forma isolada dificulta o uso de métodos dependentes de cultivo para o estudo e entendimento de forma mais robusta dessas comunidades.

Neste sentido, a aplicação das técnicas denominadas de independentes de cultivo, baseadas na detecção e análise da diversidade de ácidos nucleicos (*i.e.* DNA ou RNA) em amostras ambientais, é fundamental nos estudos de diversidade microbiana dos solos, permitindo uma análise mais fiel da estrutura das comunidades acessadas. Dentro destas metodologias de análise, existem alguns subgrupos, como as análises baseadas em um gene (baseadas na amplificação do gene alvo por PCR), ou análises que contemplam todos os genes de maneira conjunta (metagenômica e metatranscriptômica). Estas análises passam atualmente por um intenso processo de automatização, o que é possível pela evolução nas metodologias e na redução no custo do sequenciamento de DNA. Isto faz com que seja possível trabalhar com maior número de amostras, e acessar enorme quantidade de indivíduos em cada uma delas, trazendo grande robustez às inferências realizadas.

### 3.6 Métodos independentes de cultivo para estudo da diversidade microbiana

Como mencionado anteriormente, considerando que uma fração muito pequena da comunidade microbiana pode ser cultivada, e então totalmente caracterizada e

estudada, avanços nas técnicas químicas e moleculares têm auxiliado enormemente o estudo da diversidade microbiana.

### 3.7 A reação em cadeia da polimerase (PCR)

A técnica de PCR, juntamente com o conhecimento de que se pudesse inferir as relações filogenéticas entre os micro-organismos por meio de análise molecular das sequências, revolucionou o estudo da ecologia microbiana, permitindo sua caracterização de maneira independente de cultivo. Esta técnica, descrita por Saiki et al. (1988), permite a amplificação seletiva de segmentos pequenos do genoma a partir de quantidades muito pequenas de ácidos nucleicos extraídos diretamente de amostras ambientais, sendo geralmente o primeiro passo em muitas técnicas moleculares. Para a amplificação são utilizados *primers*, ou sequências iniciadoras, complementares àquelas encontradas nos locais específicos do genoma. Pela ação da enzima Taq DNA polimerase (isolada do micro-organismo *Thermus aquaticus*), o fragmento de DNA é estendido a partir das sequências iniciadoras. Uma reação de PCR consiste de uma mistura de reagentes, a Taq DNA polimerase, os *primers*, deoxinucleosídeo trifosfatos livres (dNTPs: dATP, dGTP, dCTP e dTTP), íons magnésio e o DNA alvo.

A reação de PCR envolve basicamente três passos: o DNA é inicialmente desnaturado produzindo fitas simples, em seguida os *primers* se anelam às regiões complementares no DNA alvo, e finalmente a cadeia é estendida a partir dos *primers* pela adição de nucleotídeos pela ação da enzima DNA polimerase, resultando em produtos de fita dupla. Este ciclo se repete por 25 a 35 vezes, aumentando exponencialmente o fragmento de DNA de interesse. Para confirmação da amplificação, o produto de PCR do tamanho específico pode ser analisado em gel de agarose e/ou sequenciado. A especificidade da reação vai depender de alguns fatores como, por exemplo, temperatura de anelamento dos *primers* (temperaturas maiores resultam em maior especificidade da reação), e pode ser alterada por meio de técnicas como *hot start* (D'AQUILA et al., 1991) ou *touchdown*, as quais reduzem o mal pareamento de bases aumentando a especificidade.

### 3.8 Técnicas moleculares baseados na análise de perfis de DNA

O princípio geral das técnicas que analisam perfis de DNA se baseia na separação eletroforética de um produto de PCR, que pode ocorrer de algumas formas diferentes:

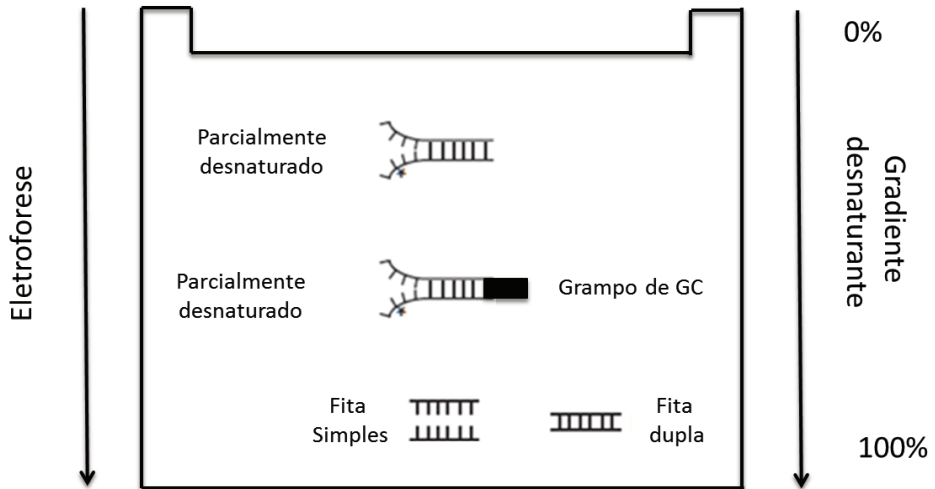
(i) desnaturação diferencial do DNA dupla fita do produto de PCR (eletroforese em gel de gradiente desnaturante - DGGE ou eletroforese em gel com gradiente de temperatura - TGGE); (ii) localização de sítios de digestão por enzimas de restrição (polimorfismo de tamanho e composição de bases de fragmentos terminais de restrição - T-RFLP, polimorfismo do tamanho de fragmentos de restrição- RFLP, análise de restrição do DNA ribossomal amplificado - ARDRA); (iii) diferenças na mobilidade de DNA fita simples em géis não desnaturantes (polimorfismo conformacional de fita simples - SSCP) e (iiii) polimorfismos ao longo do comprimento de um fragmento (heterogeneidade de dimensão de fragmentos da reação da polimerase em cadeia - LH-PCR ou análise automatizada do espaço intergênico ribossomal - Arisa).

### 3.9 Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)

A técnica de DGGE (eletroforese em gel de gradiente desnaturante (MUYZER et al., 1993) foi, historicamente, a primeira a ser utilizada com sucesso em estudos de diversidade e ecologia microbiana. Várias outras técnicas semelhantes surgiram em seguida, como TGGE (eletroforese em gel com gradiente de temperatura) e T-RFLP (polimorfismo de tamanho e composição de bases de fragmentos terminais de restrição), entre outras. Tanto DGGE como TGGE se baseiam na desnaturação diferencial de fragmentos de DNA ricos em GC, amplificados pela PCR permitindo determinar a diversidade genética de comunidades microbianas naturais, e mostrar facilmente alterações nas populações.

A técnica de DGGE é utilizada para a separação de fragmentos de DNA dupla fita que são idênticos em tamanho, mas diferem nas suas sequências. Seu poder de separação está na estabilidade diferencial do pareamento GC comparado com o AT. A mistura de fragmentos de DNA com diferentes sequências obtidas pela PCR é submetida à eletroforese em gel de acrilamida contendo um gradiente de solução desnaturante (à base de ureia e formamida). Dependendo da composição da sequência em termos de conteúdo de GC, o fragmento irá se desnaturar produzindo fitas simples. Uma vez que as fitas estejam totalmente separadas a velocidade de migração aumentará. Para prevenir a total separação das fitas, é incorporado ao fragmento um pequeno segmento altamente rico em GC (grampo de GC) durante a amplificação por PCR, de aproximadamente 40 pares de bases. Assim, fragmentos com sequências diferentes podem ser separados no gel de acrilamida (Figura 1). Em teoria, a análise de DGGE permite separar fragmentos com apenas um par de bases de diferença. O TGGE, variação do DGGE, utiliza um gradiente de temperatura para manter as concentrações de ureia e formamida constantes.

O DGGE tem sido utilizada para estudar a diversidade de bactérias e fungos nos mais diversos ambientes, como solos de agricultura (GARBEVA et al., 2003), solos de floresta (AGNELLI et al., 2004) e rizosfera (SMALLA et al., 2001), entre outros.



**Figura 1** - À medida que o fragmento se move pelo gradiente, ocorre desnaturação das fitas. O grupo de GC impede que o fragmento se desnature completamente, já que fitas duplas e simples se movem mais rapidamente no gel.

Fonte: Os autores.

### 3.10 Polimorfismo do Tamanho de Fragmentos de Restrição (RFLP) e ‘Polimorfismo do Tamanho’ do ‘Fragmento de Restrição’ Terminal (T-RFLP)

O T-RFLP (polimorfismo do tamanho de fragmentos de restrição terminal) é outra técnica utilizada para análise de diversidade microbiana, e se baseia na digestão do DNA com enzimas de restrição, sendo em seguida submetido à corrida eletroforética em gel de agarose ou gel de poliacrilamida não desnaturante, no caso de análise de comunidades (LIU et al., 1997). A vantagem desta técnica sobre versões anteriores de RFLP ou Ardra é que, por organismo detectado, apenas os fragmentos de restrição terminais (T-RFs) serão detectados, resultando em perfis mais robustos (OROS-SICHLER et al., 2007). Apenas um ou ambos os *primers* na amplificação podem ser marcados com corante radioativo, na extremidade 5' como, por exemplo TET (4,7,2',7'-tetracloro-6-carboxifluoreceína) ou 6-FAM (fosforamidita

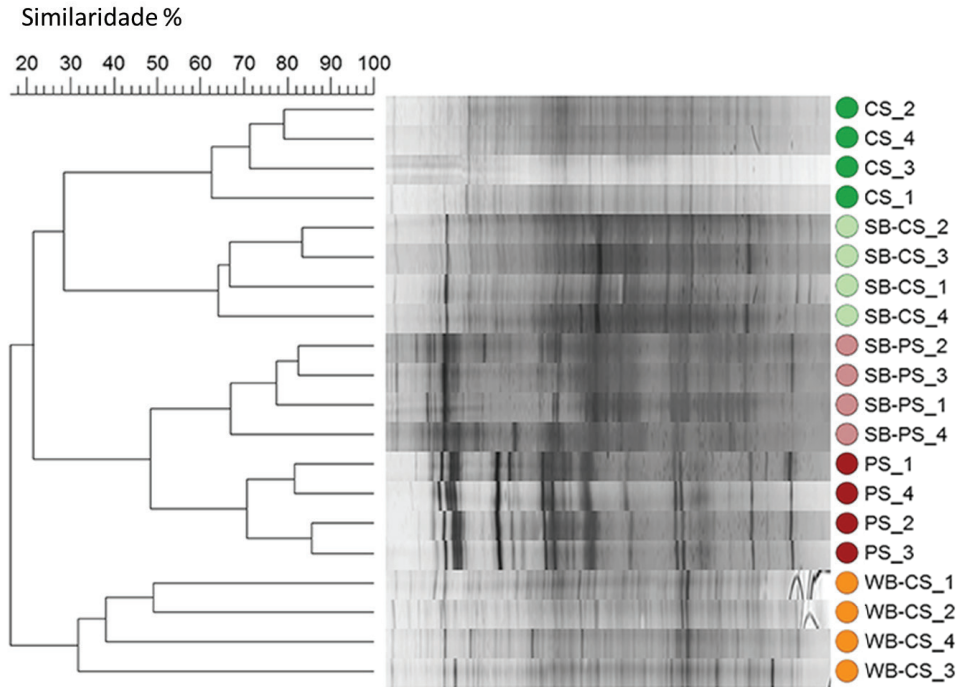
fluorocromo 5-carboxifluoresceína), permitindo a detecção apenas do fragmento marcado. Após a digestão dos amplicons (fragmentos gerados pela PCR), ocorre a separação eletroforética dos fragmentos em sequenciadores automatizados que obtêm dados como tamanho dos T-RFs, em pares de bases, e sua abundância relativa.

Desta forma, o perfil de bandas é simplificado permitindo a análise de comunidades complexas e obtendo informações sobre diversidade, pois cada banda visível representa uma 'unidade taxonômica' ou ribotipo, além de fornecer dados como equidade e similaridade das amostras analisadas (LIU et al., 1997). O T-RFLP tem sido utilizado para analisar comunidades bacterianas tanto em escala espacial quanto temporal, acessando a diversidade microbiana na rizosfera (HORZ et al., 2001), solo (DE ANGELIS et al., 2009) e até mesmo de protozoários presentes no rúmen bovino decorrente de diferentes dietas (TYMENSEN; BARKLEY; McALLISTER, 2012).

### 3.11 Polimorfismo Conformacional de Fita Simples (SSCP)

Esta técnica se assemelha ao DGGE, em que ocorre alteração na conformação da fita simples de DNA dependendo da sua sequência de nucleotídeos. Geralmente, uma molécula de fita dupla de DNA forma três produtos detectáveis em condições não desnaturantes de eletroforese em gel de acrilamida (PAGE): duas formas de cadeia simples e uma de cadeia dupla (OROS-SICHLER et al., 2007). Porém, como a fita dupla de DNA não permanece desnaturado por toda a corrida, a técnica foi otimizada acrescentando uma etapa de digestão de uma das hélices provenientes da amplificação com *primer* fosforilado no terminal 5'. Assim, é adicionado ao gel um DNA de fita simples e, dessa forma, após a corrida eletroforética dos fragmentos de PCR, ocorre migração diferencial de fragmentos com o mesmo tamanho, mas estruturas secundárias diferentes. Este método foi desenvolvido para detectar mutações e polimorfismos no DNA humano, sendo posteriormente utilizado na microbiologia para identificar e diferenciar bactérias e fungos baseados na amplificação do RNA ribossomal por PCR.

Na ecologia microbiana, SSCP foi usada pela primeira vez em 1996, na análise de uma comunidade bacteriana artificial (LEE; ZO; KIM, 1996). Na análise da diversidade de comunidades bacterianas e fúngicas do solo, esta análise tem se tornado uma poderosa alternativa assim como em solos de floresta (BACHMAN et al., 2003), entre outros (Figura 2).



**Figura 2** - Exemplo de análise de perfil de DNA obtido com SSCP. Neste estudo a comunidade bacteriana da rizosfera de duas espécies de beterraba, uma selvagem *B. vulgaris ssp.maritima* (WB) cultivada em seu habitat natural (CS) e uma moderna *B. vulgaris ssp.vulgaris* (SB) cultivada em casa de vegetação (PS). Os perfis são baseados na análise do gene 16S rRNA.

Fonte: Zachow et al. (2014).

### 3.12 Heterogeneidade de dimensão de fragmentos de PCR (LH-PCR) e Análise Automatizada do Espaço Intergênico Ribossomal (Arisa)

Os dois métodos de análise de perfis de DNA que são baseados na detecção de polimorfismo do tamanho do fragmento por emissão de fluorescência de diferentes genes são: LH-PCR, PCR de polimorfismo de tamanho e Arisa, análise de sequências ribossomais intergênicas (IGS). Nestes métodos a região espaçadora intergênica entre as subunidades 16S e 23S é amplificada por PCR, desnaturada e separada em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (KIRK et al., 2004). Arisa é um método considerado de alto poder de discriminação, pois as regiões intergênicas (IGS) evoluem mais rapidamente do que regiões entre as subunidades pequena (SSU) e grande (LSU) do gene ribossomal, sendo bastante útil na diferenciação entre linhagens bacterianas e espécies próximas. Ambos



os métodos possibilitam acessar a abundância e o tamanho dos amplicons por meio da fluorescência emitida pelos *primers* marcados, e pela comparação com marcadores.

Estes também são métodos bastante utilizados no estudo da diversidade de diferentes ambientes. Por exemplo, ambientes contaminados com urânio foram investigados por Arisa mostrando que estes são dominados por *Acidithiobacillus ferrooxidans* e por várias espécies de *Pseudomonas* (SELENSKA-POBELL et al., 2001).

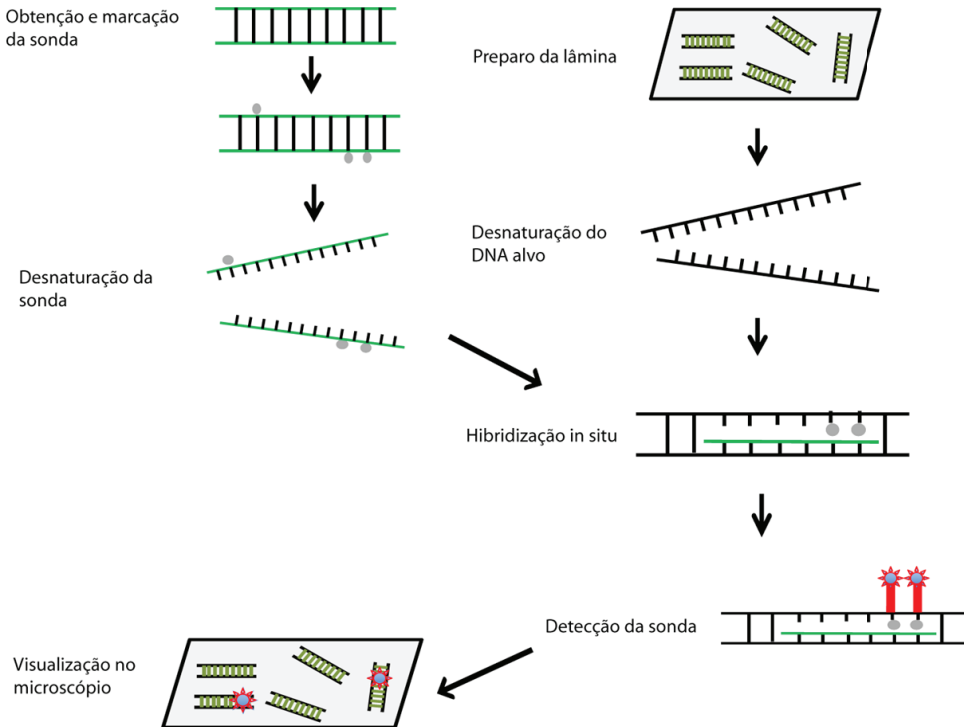
### **3.13 Métodos de hibridização – FISH – hibridização ‘in situ’ de fluorescência**

Esta técnica permite medidas *in situ*, por meio da hibridização com sondas filogenéticas, ou seja, por meio da formação de um híbrido estável entre uma sequência alvo desnaturada e uma sonda de fita simples de DNA ou RNA complementar. É um método histoquímico que permite a visualização, identificação, enumeração e localização simultânea de micro-organismos ‘in situ’, sem a necessidade de cultivo de células (NEVES; GUEDES, 2012). Permite também que sequências de DNA sejam examinadas no interior de células sem alterar sua morfologia ou integridade de seus compartimentos.

O processo mais utilizado, por ser mais rápido e de fácil execução, é a marcação direta (Figura 3), em que um ou mais fluorocromos são diretamente unidos às sondas que se ligam nas regiões 5’ ou 3’ do alvo. A FISH tem quatro procedimentos básicos: 1) fixação e permeabilização da amostra, 2) hibridização, 3) lavagem para remoção das sondas em excesso e 4) detecção pela microscopia fluorescente. O alvo da maioria das aplicações da FISH é o RNA ribossomal, pois este além de estar presente em todas as células vivas (AMANN; FUCHS, 2008), é suficientemente conservado para se inferir relações filogenéticas. Além disso, como cada célula contém vários ribossomos, o sinal é naturalmente amplificado, podendo atingir um número de 100.000 cópias por célula.

A técnica de FISH pode ser aplicada nas mais diversas áreas, como mapeamento genético, genômica comparativa (SCHLEPER; JURGENS; JONUSCHEIT, 2005), biologia evolutiva (PÉREZ et al., 2012) e ecologia microbiana (COMPANT et al., 2013), entre outras, podendo ser utilizada na detecção de micro-organismos em ambientes complexos. Um dos maiores desafios da utilização de FISH em amostras ambientais é a construção e aplicação de novas sondas em um grupo desconhecido

de micro-organismos. Este procedimento faz da técnica de FISH uma das mais promissoras e poderosas da biologia molecular.



**Figura 3** - Desenho esquemático das principais etapas da hibridização 'in situ' (FISH).

Fonte: Os autores.

### 3.14 Microarranjos de DNA

A tecnologia de microarranjos de DNA representa um dos últimos avanços na biologia molecular, na detecção e identificação de espécies, e para acessar a diversidade microbiana. Os microarranjos, ou chips de DNA, são lâminas sólidas, nas quais fragmentos de DNA fita simples, denominados de sondas, são depositados e imobilizados de forma ordenada e em áreas específicas, denominados *spots*. O princípio da técnica baseia-se na hibridização por complementaridade das moléculas de ácidos nucleicos com sondas depositadas na lâmina. Esta ferramenta representa grandes vantagens, pois em um único arranjo, milhares de oligonucleotídeos diferentes podem ser fixados num mesmo microchip, permitindo que milhares de genes sejam

simultaneamente acessados. Os microarranjos podem conter tanto genes específicos como, por exemplo, os que codificam as proteínas amoníaco monooxigenase, ou nitrogenase, obtendo assim informações sobre a diversidade funcional, ou podem conter padrões de amostras ambientais que representem as diferentes espécies encontradas nestas amostras (GREENE; VOORDOUW, 2003).

O denominado *phylochip*, contendo 132 genes ribossômicos 16S marcados específicos para todas as linhagens conhecidas de procariotos redutores de sulfato foi desenvolvido e testado (LOY et al., 2002), e aplicado com sucesso em amostras ambientais e clínicas. Outra tecnologia baseada em microarranjos de DNA é o *Geochip* (HE et al., 2007), desenvolvido para detectar, caracterizar e quantificar micro-organismos em amostras ambientais. A última geração do Geochip contém aproximadamente 28.000 sondas, cobrindo 57.000 genes e 292 funções relacionadas aos ciclos de carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre, metabolismo energético, resistência a antibióticos e metais e degradação de contaminantes orgânicos.

### 3.15 Sequenciamento de Ácidos Nucleicos Clonagem/Sequenciamento

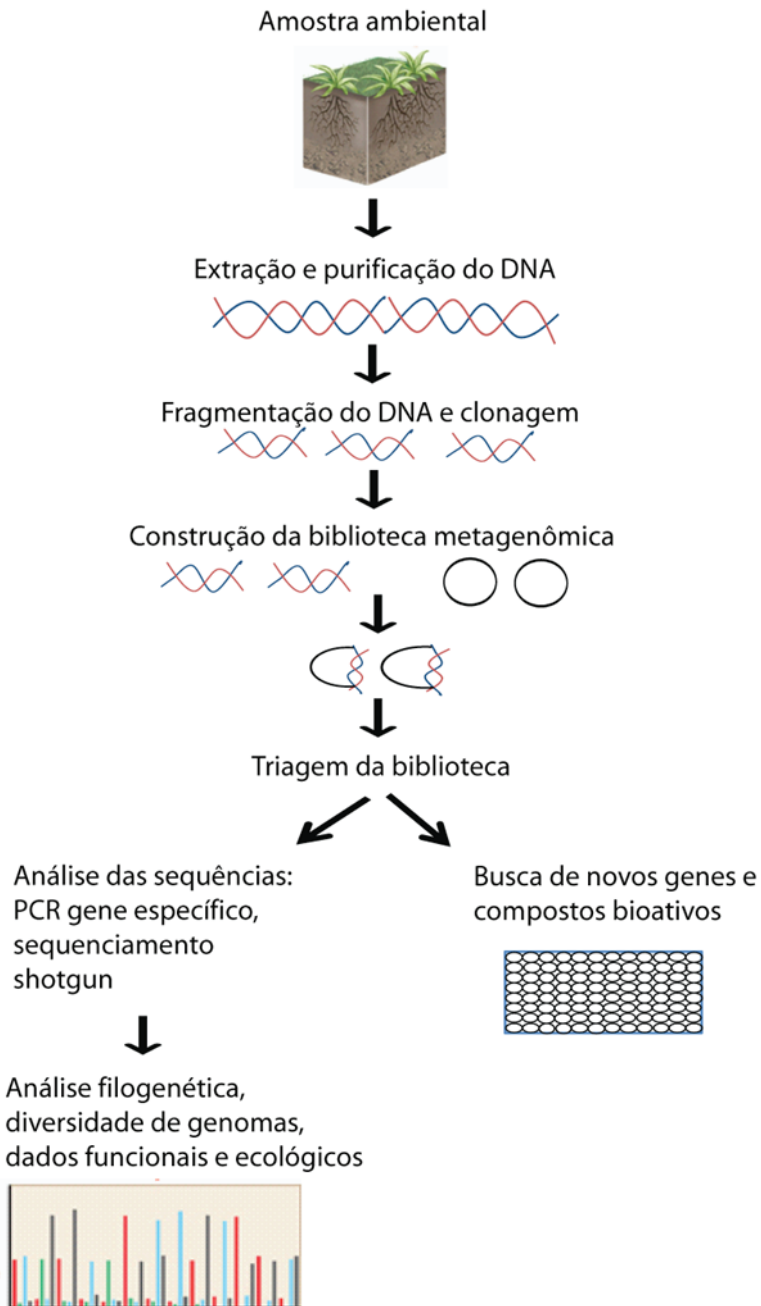
O sequenciamento de amostras ambientais complexas como solo, água, sedimentos, fezes e trato gastrointestinal tem se tornado uma importante ferramenta para se entender a biodiversidade e suas relações ecológicas. Dentre as primeiras técnicas de sequenciamento, o denominado sequenciamento de Sanger imperou absoluto na ciência genômica ao longo dos 30 anos que se seguiram à sua publicação original. Esta técnica é baseada na incorporação de desoxinucleotídeos (dNTPs) e de didesoxinucleotídeos (ddNTPs) a uma cadeia de DNA crescente, tendo como molde o DNA de interesse. O sequenciamento, juntamente com a PCR e clonagem, é um dos métodos utilizados para explorar a diversidade de comunidades naturais. Na clonagem, fragmentos de PCR são inseridos em um vetor de clonagem (geralmente um plasmídeo), gerando um plasmídeo recombinante. Células de *E. coli* competentes são transformadas com esse plasmídeo recombinante e suas células são plaqueadas em meio seletivo para a identificação dos clones positivos, ou seja, aquelas que possuem o fragmento de interesse. Esses fragmentos podem então ser rapidamente sequenciados.

### 3.16 Sequenciamento de nova geração

Apesar do sequenciamento convencional de Sanger ter se mostrado mais eficiente no desenvolvimento de bibliotecas de clones, para a análise

de amostras ambientais complexas havia a necessidade de se ler múltiplas sequências alvo de DNA, em paralelo. Dessa forma, novas estratégias começaram a ser desenvolvidas para a produção de sequências genômicas de forma ainda mais massiva, mais rápida e mais barata do que utilizando os sequenciadores de eletroforese capilar baseados em didesoxinucleotídeos fluorescentes. Assim, começaram a ser comercializadas, em 2005, as denominadas tecnologias de sequenciamento de nova geração, as quais prometiam o sequenciamento de DNA em plataformas capazes de gerar informação sobre milhões de pares de bases em uma única corrida, sem a necessidade de se produzir bibliotecas de clones para sequenciar o DNA. Apesar de as plataformas existentes utilizarem uma diversa gama de ferramentas químicas e de incorporação e detecção de bases, dois passos são comuns: fragmentação e preparação da biblioteca e detecção dos nucleotídeos incorporados (ZHANG et al., 2011). Estas tecnologias podem ser classificadas em dois grupos. Em um há a necessidade de se produzir amplicons por PCR, por exemplo, Roche 454 (Roche), HiSeq2000 (Illumina), AB Solid Systems (Life Technologies). O outro grupo de plataformas inclui aquelas onde não há necessidade de amplificação para o sequenciamento, como HeliScope (Helicos BioScience) e PacBio (Pacific BioSciences).

As aplicações da NGS são ilimitadas, incluindo, por exemplo, sequenciamento de genomas, sequenciamento de cDNA (RNA seq) e metagenoma. No metagenoma, o material sequenciado é extraído diretamente do ambiente (shotgun metagenoma) (Figura 4). Todo o DNA extraído da amostra é fragmentado e sequenciado. A análise busca tentar identificar, além da diversidade de genomas, novos genes. Estas técnicas têm mostrado a enorme diversidade e heterogeneidade de ambientes naturais. Para isso, o sequenciamento do gene 16S rRNA é considerado o método mais poderoso para a exploração da diversidade microbiana (MUYZER, 1999), tanto em amostras naturais quanto artificiais. A diversidade e a funcionalidade da microbiota de solos (CAPORASO et al., 2011), do trato gastrointestinal (ZOETENDAL; RAJILIĆ-STOJANOVIĆ; DE VOS, 2008), do microbioma da pele humana (FOULONGNE et al., 2012) e anticorpos de peixes (WEINSTEIN et al., 2009) têm sido avaliadas com estas técnicas.



**Figura 4** - Desenho esquemático dos princípios da metagenômica.

Fonte: Os autores.

### 3.17 Conclusões

Os micro-organismos compõem o grupo de organismos mais abundantes do planeta, cuja presença é essencial para o bom funcionamento e equilíbrio dos ecossistemas. O avanço das tecnologias de biologia molecular aplicada a estudos de diversidade tem permitido seu acesso mais abrangente e a melhor compreensão das interações das comunidades microbianas nos diferentes ambientes. Sabe-se que a diversidade genética e metabólica da microbiota do solo é enorme, representando fonte expressiva de recursos genéticos para avanços biotecnológicos, como antibióticos, produtos químicos e polímeros com aplicação tecnológica. Assim, uma ampla caracterização da microbiota cultivável e não cultivável do solo é de fundamental importância para o desenvolvimento da biotecnologia.

### Referências

AGNELLI, A. et al. Distribution of microbial communities in a forest soil profile investigated by microbial biomass, soil respiration and DGGE of total and extracellular DNA. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 36, no. 5, p. 859-868, 2004.

AMANN, R.; FUCHS, B. Single-cell identification by improved FISH. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 6, no. 5, p. 339-348, 2008.

BACHMANN, J. et al. Extended methodology for determining wetting properties of porous media. **Water Resources Research**, Washington, D.C., v. 39, no. 12, 2003. doi: 10.1029/2003WR002143.

BALDANI, J. et al. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 29, no. 5, p. 911-922, 1997.

BARTZ, M. L. C.; PASINI, A.; BROWN, G. G. Earthworms as soil quality indicators in Brazilian no-tillage systems. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 69, p. 39-48, 2013.

BRADY, N.; WEIL, R. **Elementos da natureza e propriedades dos solos**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

- CAPORASO, J. G. et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, D.C., v. 108, no. 1, p. 4516-4522, 2011.
- COMPANT, S. et al. Visualization of niches of colonization of Firmicutes with *Bacillus* spp. in the Rhizosphere, Rhizoplane, and Endorhiza of grapevine plants at flowering stage of development by fish microscopy. In: BRUIJN, F. J. (Ed.). **Molecular microbial ecology of the rhizosphere**. Hoboken: John Wiley, 2013. v. 1-2.
- D'AQUILA, R. et al. Maximizing sensitivity and specificity of PCR by pre-amplification heating. **Nucleic Acids Research**, London, v. 19, no. 13, p. 3749, 1991.
- DE ANGELIS, K. et al. Selective progressive response of soil microbial community to wild oat roots. **The ISME Journal**, London, v. 3, no. 2, p. 168-178, 2009.
- DINI-ANDREOTE, F. et al. Bacterial genomes: habitat specificity and uncharted organisms. **Microbial Ecology**, New York, v. 64, no. 1, p. 1-7, 2012.
- FIERER, N. et al. Toward an ecological classification of soil bacteria. **Ecology**, Brooklyn, v. 88, no. 6, p. 1354-1364, 2007.
- FOULONGNE, V. et al. Human skin microbiota: high diversity of DNA viruses identified on the human skin by high throughput sequencing. **PloS one**, San Francisco, v. 7, no. 6, e38499, 2012.
- GARBEVA, P.; VAN VEEN, J. A.; VAN ELSAS, J. D. Predominant *Bacillus* spp. in agricultural soil under different management regimes detected via PCR-DGGE. **Microbial Ecology**, New York, v. 45, no. 3, p. 302-316, 2003.
- GILLER, P. The diversity of soil communities, the 'poor man's tropical rainforest'. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 52, no. 2, p. 135-168, 1997.
- GREENE, E. A.; VOORDOUW, G. Analysis of environmental microbial communities by reverse sample genome probing. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 53, no. 2, p. 211-219, 2003.
- GRIFFITHS, B.; PHILIPPOT, L. Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 37, no. 2, p. 112-129, 2013.

HE, Z. et al. GeoChip: a comprehensive microarray for investigating biogeochemical, ecological and environmental processes. **The ISME Journal**, London, v. 1, no. 1, p. 67-77, 2007.

HORZ, H. P. et al. Detection of methanotroph diversity on roots of submerged rice plants by molecular retrieval of *pmoA*, *mmoX*, *mxoF*, and 16S rRNA and ribosomal DNA, including *pmoA*-based terminal restriction fragment length polymorphism profiling. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D.C., v. 67, no. 9, p. 4177-4185, 2001.

HUGENHOLTZ, P. et al. Impact of culture independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology**, Washington, D.C., v. 180, no. 18, p. 4765-4774, 1998.

KIRK, J. et al. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 58, no. 2, p. 169-188, 2004.

LAWTON, J. et al. Carbon flux and diversity of nematodes and termites in Cameroon forest soils. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 5, no. 2, p. 261-273, 1996.

LEE, D. H.; ZO, Y. G.; KIM, S. J. Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR single-strand-conformation polymorphism. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D.C., v. 62, no. 9, p. 3112-3120, 1996.

LIU, W. T. et al. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D.C., v. 63, no. 11, p. 4516-4522, 1997.

LOY, A. et al. Oligonucleotide microarray for 16S rRNA gene-based detection of all recognized lineages of sulfate-reducing prokaryotes in the environment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D.C., v. 68, no. 10, p. 5064-5081, 2002.

MIRANSARI, M. Soil microbes and the availability of soil nutrients. **Acta Physiologiae Plantarum**, Warszawa, v. 35, no. 11, p. 3075-3084, 2013.

MUYZER, G. et al. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D.C., v. 59, no. 3, p. 695-700, 1993.



MUYZER, G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems.

**Current Opinion in Microbiology**, London, v. 2, no. 3, p. 317-322, 1999.

NEVES, S. M. N.; GUEDES, R. M. C. Hibridização in situ fluorescente: princípios básicos e perspectivas para o diagnóstico de doenças infecciosas em medicina veterinária.

**Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 79, no. 4, p. 627-632, 2012.

OCHMAN, H.; LAWRENCE, J. G.; GROISMAN, E. A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. **Nature**, London, v. 405, no. 6784, p. 299-304, 2000.

OROS-SICHLER, M. et al. Molecular fingerprinting techniques to analyze soil microbial communities. In: VAN ELSAS, J. D.; JANSSON, J. K.; TREVORS, J. T. (Ed.). **Modern soil microbiology**. London: CRC Press, 2007. p. 355-386.

PAULA, F. S. et al. Land use change alters functional gene diversity, composition and abundance in Amazon forest soil microbial communities. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 23, no. 12, p. 2988-2999, 2014.

PÉREZ, M. C. et al. Evolution of bacterial community in a full-scale biotrickling filter by Fluorescence in Situ Hybridization (FISH). **Procedia Engineering**, Amsterdam, v. 42, p. 666-671, 2012.

RAYMOND, J. et al. The natural history of nitrogen fixation. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 21, no. 3, p. 541-554, 2004.

RODRIGUES, J. et al. Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America**, Washington, D.C., v. 110, nO. 3, p. 988-993, 2013.

SAIKI, R. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, New York, v. 239, no. 4839, p. 487-491, 1988.

SCHLEPER, C.; JURGENS, G.; JONUSCHEIT, M. Genomic studies of uncultivated archaea. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, no. 6, p. 479-488, 2005.

SELENSKA-POBELL, S. et al. Bacterial diversity in soil samples from two uranium waste piles as determined by rep-APD, RISA and 16S rDNA retrieval. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 79, no. 2, p. 149-161, 2001.

SMALLA, K. et al. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D.C., v. 67, no.10, p. 4742-4751, 2001.

STALEY, J.; KONOPKA, A. Measurement of in situ activities of non-photosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 39, no. 1, p. 321-346, 1985.

SPRENT, J. **Nodulation in legumes**. London: Royal Botanic Gardens, 2001.

TYMENSEN, L.; BARKLEY, C.; McALLISTER, T. Relative diversity and community structure analysis of rumen protozoa according to T-RFLP and microscopic methods. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 88, no. 1, p. 1-6, 2012.

WEINSTEIN, J. et al. High-throughput sequencing of the zebrafish antibody repertoire. **Science**, New York, v. 324, no. 5928, p. 807-810, 2009.

ZACHOW, C. et al. Differences between the rhizosphere microbiome of *Beta vulgaris* ssp. *maritima*—ancestor of all beet crops—and modern sugar beets. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2014.00415/full>>. Acesso em: 10 dez. 2014.

ZHANG, J. et al. The impact of next-generation sequencing on genomics. **Journal of Genetics and Genomics**, China, v. 38, no. 3, p. 95-109, 2011.

ZOETENDAL, E.; RAJILIĆ-STOJANOVIĆ, M.; DE VOS, W. High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. **Gut**, London, v. 57, no. 11, p. 1605-1615, 2008.



# Controle biológico e simbiótico de insetos-pragas e doenças por micro-organismos endofíticos

---

Paulo Teixeira Lacava, Itamar Soares de Melo, José Odair Pereira

## 4.1 Introdução

Micro-organismos endofíticos são aqueles que colonizam o interior das plantas, sendo encontrados em órgãos e tecidos vegetais sadios como folhas, ramos e raízes, sem produzir estruturas externas visíveis (HALLMANN et al., 1997). Essa comunidade endofítica é constituída principalmente por fungos e bactérias, e ao contrário dos micro-organismos fitopatogênicos, não causa prejuízos à planta hospedeira. Mendes e Azevedo (2007) propuseram a redefinição do termo micro-organismo endofítico, considerando a definição anterior, e, adicionalmente, dividindo os endófitos em dois tipos: Tipo I, os que não produzem estruturas externas à planta; e Tipo II, os que produzem estruturas externas à planta. Dessa forma, são incluídos, por definição, os fungos micorrízicos, bactérias simbióticas nodulantes no Tipo II e excluídos os micro-organismos epifíticos e patogênicos.

Aproximadamente 300.000 espécies vegetais existem no planeta Terra e cada planta, individualmente, é hospedeira de um ou mais endófitos. Entretanto, apenas uma pequena parcela dessas plantas tem sido estudada com relação à sua microbiota endofítica. Consequentemente, a oportunidade de encontrar um novo e benéfico micro-organismo endofítico entre a diversidade de plantas existentes nos diferentes ecossistemas terrestres é considerável. Com o acúmulo de informações a respeito da interação planta-endófitos, tem sido dada uma atenção especial ao estudo de micro-organismos endofíticos como agentes de controle biológico de inúmeros insetos-pragas e doenças (AZEVEDO et al., 2000).

Os endófitos, da mesma forma que os fitopatógenos, apresentam a capacidade de penetrar na planta e se disseminar sistemicamente no hospedeiro, habitando de forma ativa o apoplasto, vasos condutores e ocasionalmente pode haver colonização intracelular. Dessa forma, os micro-organismos endofíticos colonizam um nicho

ecológico semelhante àquele ocupado por fitopatógenos, o que permite seu uso como agentes de controle biológico de doenças de plantas. Esse controle biológico pode ocorrer principalmente pela atuação direta sobre o fitopatógeno no interior da planta hospedeira, por antagonismo, e/ou por competição por nutrientes (HALLMANN et al., 1997).

A colonização sistêmica das plantas pelos endófitos também pode alterar as condições fisiológicas e morfológicas do hospedeiro. Além disso, o estudo de substâncias produzidas pelos micro-organismos endofíticos e seu potencial de antagonismo são importantes não somente para o entendimento de papel ecológico e de relações interespecíficas, mas também para viabilizar a aplicação desses organismos no controle biológico de fitopatógenos ou mesmo o isolamento de compostos de importância agrícola e biotecnológica (LACAVA; AZEVEDO, 2013).

O controle biológico de insetos-pragas e doenças de culturas agrícolas de interesse pode ser realizado de forma indireta. Nesta estratégia, o endófito não atua diretamente sobre o patógeno ou inseto, mas induz uma resposta na planta que leva a uma resistência sistêmica. Estudos têm mostrado que a aplicação de rizobactérias em sementes ou na raiz pode induzir resistência a múltiplos patógenos dos tecidos foliares como vírus, fungos e bactérias. Em tomate, a aplicação da rizobactéria promotora de crescimento *Pseudomonas* sp. (linhagem PsJN) induziu resistência sistêmica a *Verticillium dahliae*. Os resultados desses estudos indicaram que a colonização endofítica da planta pela rizobactéria foi necessária para a indução de resposta contra o fitopatógeno (SHARMA et al., 1998).

A indução da resistência sistêmica está associada a alterações bioquímicas e estruturais na planta hospedeira. Estas alterações podem afetar adversamente o estabelecimento, crescimento e o desenvolvimento do fitopatógeno (SHARMA et al., 1998).

Estudos pioneiros nos anos 80 do século passado mostraram que a presença de fungos endofíticos podia reduzir o ataque de insetos à planta hospedeira. Posteriormente, verificou-se que esta redução da herbivoria no hospedeiro ocorria pela produção de compostos que reduzem a atratividade da planta, aumento da susceptibilidade do inseto a doenças ou inibindo o seu desenvolvimento. Estes estudos foram realizados principalmente em gramíneas dos gêneros *Lolium* e *Festuca* em associação com o fungo *Neotyphodium*. Este fungo endofítico apresenta a capacidade de diminuir a incidência de insetos de diferentes ordens como afídios, coleópteros, hemípteros e lepidópteros (AZEVEDO et al., 2000).

Inúmeros fungos endofíticos produzem alcaloides quando em associação com o hospedeiro. Estes alcaloides podem apresentar atividade inseticida e nematocida, protegendo a planta desses herbívoros. Em alguns casos o controle de pragas por

fungos endofíticos é indireto, pois o metabólito produzido pelo fungo retarda o desenvolvimento da larva, e esse aumento do tempo de desenvolvimento leva o inseto à morte. Assim, a morte da larva ocorre, como observado em carvalho, quando o inseto é eliminado juntamente com as folhas velhas do hospedeiro. É importante salientar também que fatores ambientais podem estar envolvidos, pois foi verificado que em baixos níveis de nutrientes para a planta, o endófito *Neothyphodium coenophialum* torna o hospedeiro resistente a larvas de *Spodoptera frugiperda*. Entretanto, quando o nível de nutriente é elevado não foi verificada significativa redução da herbivoria. Esses resultados mostram que a interação entre esse endófito e a planta é dependente das condições ambientais, podendo ser benéfica ou simplesmente neutra para a planta hospedeira. Nesse exemplo, a planta mantém o endófito para que potencialmente, no futuro, ela tenha maior capacidade de evitar a herbivoria comparada com outras plantas desprovidas do endófito.

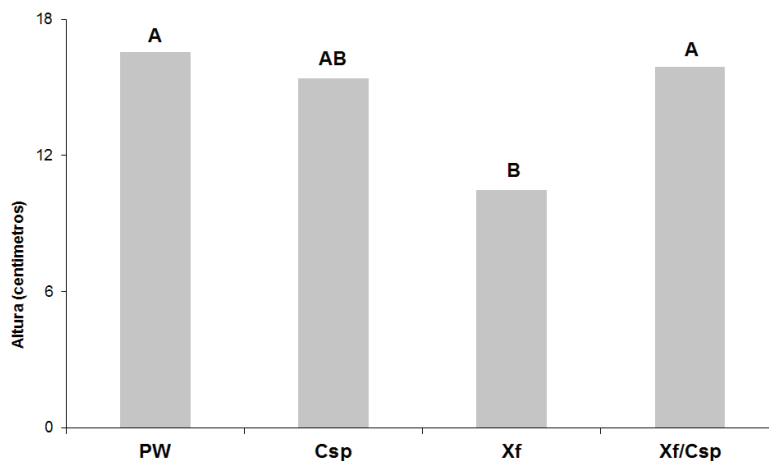
A interação entre esses organismos é tão complexa que em alguns casos, um inseto pode reconhecer a região da planta infectada pelo endófito, evitando essa região e os efeitos do micro-organismo endofítico. Há também casos em que o endófito atua sobre outro fungo aumentando ou reduzindo a capacidade infectiva do mesmo sobre o inseto. Dessa forma, a utilização prática destes micro-organismos endofíticos no controle biológico de insetos-pragas e fitopatógenos depende de inúmeros fatores relacionados à interação planta-patógenos-endofitos, pois, a competição existente entre os micro-organismos nesse habitat pode reduzir a eficiência do controle, inviabilizando a sua utilização. Na maioria dos casos, o controle biológico que ocorre naturalmente é devido a uma mistura de micro-organismos antagonistas, sendo, portanto, muito importante avaliar a interação de diferentes micro-organismos para o controle de fitopatógenos.

## **4.2 Controle biológico de doenças de plantas por bactérias endofíticas antagonistas**

Estudos indicam que o controle biológico de doenças de plantas pode ocorrer utilizando bactérias antagonistas ao agente causal e, diferentes espécies bacterianas tais como *Alcaligenes* spp., *Bacillus megaterium*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *Clavibacter michiganensis*, *Curtobacterium* spp., *Flavobacterium* spp., *Kluyvera* spp., *Microbacterium* spp., *Pseudomonas alcaligenes*, *P. fluorescens* e *P. putida* têm sido reportadas como endofitos com atividade inibitória, por antagonismos, a fitopatógenos (AZEVEDO et al., 2000).

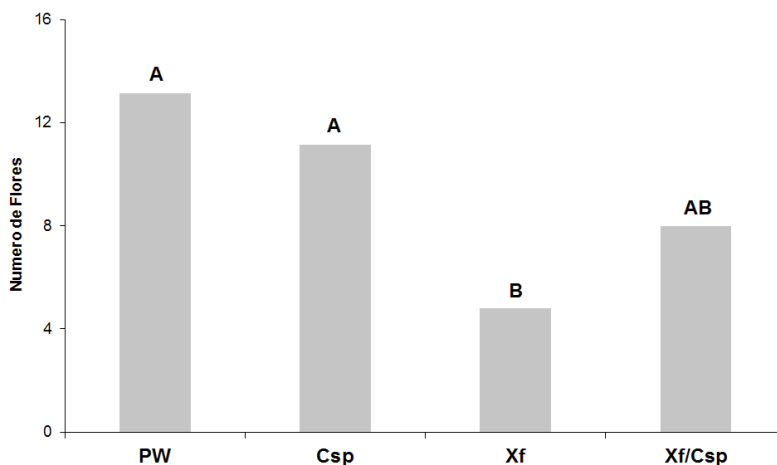
Ramesh, Joshie Ghanekar (2009) têm sugerido que a família Pseudomonadaceae; que compreende o gênero *Pseudomonas* spp. são as principais bactérias com potencial para supressão, por antagonismo, de *Rhizoctonia solanacearum* na cultura de berinjela (*Solanum melongena* L.). Esses autores ainda reportam que 28 isolados bacterianos endofíticos foram eficientes, *in vitro*, na inibição de *R. solanacearum* e mais de 50% desses isolados testados foram identificados como *Pseudomonas fluorescens* (RAMESH; JOSHI; GHANEKAR, 2009). Em experimentos em casa de vegetação, plantas tratadas com as linhagens de *Pseudomonas* (IEB9 e EB67), *Enterobacter* (EB44 e EB89) e *Bacillus* (EC4 e EC13) reduziram a incidência em 70% do sintoma de murcha (RAMESH; JOSHI; GHANEKAR, 2009). A avaliação em larga escala, condições de campo e o detalhamento dos mecanismos de antagonismos poderão subsidiar uma efetiva estratégia de biocontrole para as doenças que causam o murchamento em culturas de importância agrícola como as pertencentes à família *Solanaceae*.

Estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que a bactéria endofítica *Curtobacterium flaccumfaciens*, isolada de plantas cítricas, pode inibir a bactéria *Xylella fastidiosa*, bactéria fitopatogênica causadora da clorose variegada dos citros (CVC) (LACAVA et al., 2004, 2007). Após verificar a inibição de *X. fastidiosa in vitro*; foi caracterizado *in vivo* a interação dessa bactéria com *C. flaccumfaciens* em condições de casa de vegetação e utilizando a planta modelo *Catharanthus roseus*. Para isso, plantas de *C. roseus* foram inoculadas separadamente com *C. flaccumfaciens*, *X. fastidiosa* e com ambas as bactérias. O número de flores, altura das plantas e sintomas de doença foram os parâmetros avaliados para verificar o potencial de biocontrole de *C. flaccumfaciens* em relação à *X. fastidiosa*. Plantas inoculadas somente com *X. fastidiosa* tiveram redução no desenvolvimento e no número de flores; considerando estes parâmetros fitopatológicos (Figuras 1 e 2). Ao inocular-se *C. flaccumfaciens* em conjunto com *X. fastidiosa* não houve redução na altura das plantas. O número de flores produzidas por essa inoculação dupla foi intermediária entre o número produzido pelas plantas inoculadas com qualquer uma das bactérias separadamente. Esses dados indicam que a bactéria endofítica de citros *C. flaccumfaciens* pode interagir com *X. fastidiosa* na planta modelo *C. roseus* reduzindo a severidade e sintomas da doença (LACAVA et al., 2007).



**Figura 1** - Efeito da interação da bactéria fitopatogênica *Xylella fastidiosa* e a bactéria endofítica de citros *Curtobacterium flaccunfaciens* no desenvolvimento da planta hospedeira. O gráfico representa a altura da planta modelo (*Catharanthus roseus*) quando inoculada apenas com meio de cultura (PW); *C. flaccunfaciens* (Csp); *X. fastidiosa* (Xf) e inoculada em conjunto *X. fastidiosa* e *C. flaccunfaciens* (Xf/Csp). Tratamentos com as mesmas letras representa não diferença significativa (Teste de Tukey – 5%).

Fonte: Lacava et al. (2007).



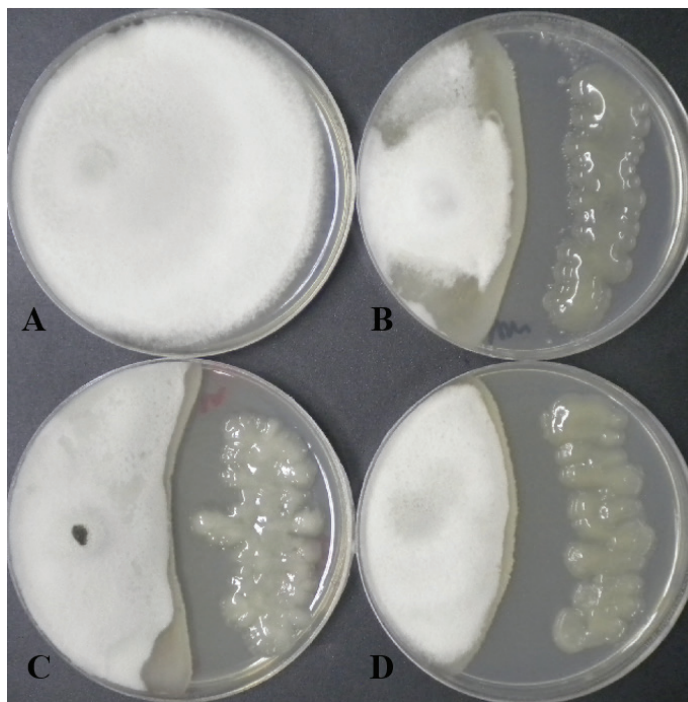
**Figura 2** - Efeito da interação da bactéria fitopatogênica *Xylella fastidiosa* e a bactéria endofítica de citros *Curtobacterium flaccunfaciens* no desenvolvimento da planta hospedeira. O gráfico representa o número de flores da planta modelo (*Catharanthus roseus*) quando inoculada apenas com meio de cultura (PW); *C. flaccunfaciens* (Csp); *X. fastidiosa* (Xf) e inoculada em conjunto *X. fastidiosa* e *C. flaccunfaciens* (Xf/Csp). Tratamentos com as mesmas letras representa não diferença significativa (Teste de Tukey – 5%).

Fonte: Lacava et al. (2007).



Em projeto de pesquisa financiado pela *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas* (Fapeam) e *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* (Fapesp – Proc. no. 09/53376-2), foi verificado, *in vitro*, atividade antagonista de bactérias endofíticas versus o fungo *Colletotrichum* spp., agente que causa a antracnose do guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* Mart. Ducke) (Figura 3). Os frutos do guaraná são de grande importância econômica e social para o Brasil. Refrigerantes, xaropes, sucos e vários produtos farmacêuticos são produzidos a partir de grãos torrados do guaraná. Uma diminuição significativa na área de produção de guaraná, particularmente na região da Amazônia brasileira, pode ser atribuído à antracnose. Nesse projeto, as bactérias testadas com atividade antagonista contra *Colletotrichum* spp. foram isoladas endofiticamente das plantas de guaraná.

Em recente publicação, Bogas et al. (2015) estudaram a diversidade da comunidade bacteriana endofítica associada a plantas de guaraná (*P. cupana*) com e sem sintomas de antracnose; doença causada pelo fungo *Colletotrichum* spp.. Esses autores utilizaram técnicas dependentes de cultivo, ou seja, o isolamento de bactérias endofíticas em meio de cultura e independente do cultivo como, por exemplo, a clonagem e sequenciamento de bibliotecas de genes para 16S rRNA e a técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (PCR-DGGE). Os resultados apresentados por estes sugerem a possibilidade de interação entre o agente causal da antracnose do guaraná e a comunidade bacteriana endofítica encontrada; pois bactérias endofíticas com histórico de proteção de plantas foram detectadas em plantas assintomáticas em relação à antracnose. Esses resultados abrem uma possibilidade para melhor entendimento sobre os mecanismos que envolvem a resistência de algumas plantas do guaraná em relação ao fungo fitopatogênico *Colletotrichum* spp. pela presença e interação com bactérias endofíticas; possibilitando, como estratégia futura, a exploração dessas bactérias no controle biológico da antracnose do guaraná.



**Figura 3** - Atividade antagonista, *in vitro*, de bactérias endofíticas contra o fungo fitopatogênico *Colletotrichum* spp. (A) Crescimento do fungo *Colletotrichum* spp. em meio de cultura (controle). (B), (C) e (D): atividade antifúngica de isolados bacterianos endofíticos (*Bacillus* sp.) oriundos da planta de guaraná (*Paullinia cupana*) contra *Colletotrichum* spp.

Fonte: Foto por P. T. Lacava (2012).

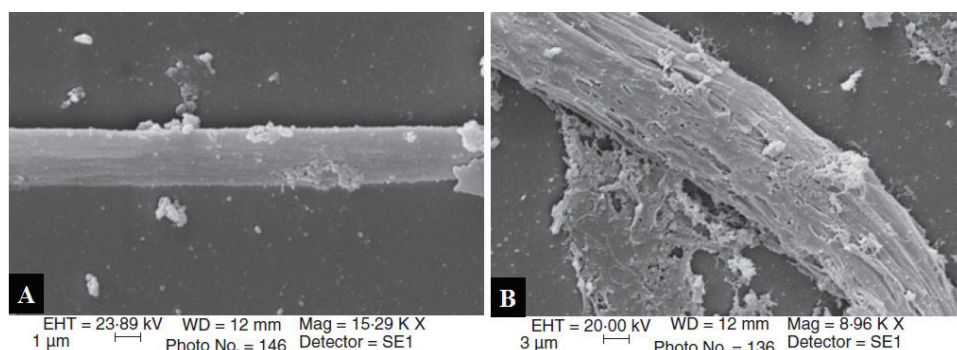
### 4.3 Actinomicetos endofíticos no controle biológicos

Actinomicetos vêm sendo isolados endofiticamente de uma grande variedade de plantas e frequentemente são identificados como pertencentes aos gêneros *Microbispora*, *Nocardia*, *Micromonospora* e *Streptomyces*; sendo este último o mais abundante. De fato, o gênero de actinomiceto mais estudado é o *Streptomyces*; possuindo um complexo ciclo de vida e a produção de numerosos metabólitos secundários (SEIPKE et al., 2012).

*Streptomyces* endofíticos não são apenas micro-organismos comensais, mas confere benefícios à planta hospedeira que pode seguir em dois sentidos: promoção de crescimento vegetal e proteção contra fitopatógenos (LACAVA; AZEVEDO, 2014). O gênero *Streptomyces* é notoriamente reconhecido como um produtor de compostos antimicrobianos e linhagens de *Streptomyces* isoladas endofiticamente não são

exceções (SEIPKE et al., 2012). Numerosos isolados de *Streptomyces* endofíticos possuem a capacidade de inibir o crescimento de fungos fitopatogênicos *in vitro* e *in planta*. Antibiose é o mecanismo proposto pela qual esses endófitos inibem doenças em plantas. Actinomicetos endofíticos têm sido isolados de várias espécies de plantas hospedeiras e têm demonstrado proteção aos hospedeiros contra diferentes fungos fitopatogênicos que têm sua origem no solo; incluindo *Fusarium oxysporum*, *Gaeumannomyces graminis var. tritici*, *Plectosporium tabacinum*, *Rhizoctonia solani* e *Verticillium dahliae* (ROSENBLUETH; MARTINEZ-ROMERO, 2006).

Quecine et al. (2008) avaliaram a produção da enzima quitinase por actinomicetos endofíticos e o potencial de biocontrole destes em relação a fungos fitopatogênicos. Actinomicetos são utilizados extensivamente na indústria farmacêutica e agricultura por sua grande diversidade na produção de enzimas. Estes autores avaliaram linhagens endofíticas de *Streptomyces* crescidos em meio de cultura mínimo suplementado com quitina e a produção de quitinase foi quantificada. As linhagens endofíticas foram avaliadas para qualquer atividade de inibição *in vitro* de fungos fitopatogênicos em ensaios de cultura dupla. A correlação entre a produção de quitinase e inibição de fitopatógenos foi calculada e confirmada pela observação da parede celular do fungo *Colletotrichum sublineolum* em microscopia eletrônica de varredura (Figura 4). Nesse mesmo estudo, os autores reportam a correlação genética entre a produção de quitinase e o potencial de biocontrole de actinomicetos endofíticos em antagonismos com diferentes fitopatógenos; sugerindo que este controle pode ocorrer na planta hospedeira. Este tipo de resultado fornece melhor compreensão das atividades do gênero *Streptomyces* isolado endofiticamente e o seu potencial como agente no controle biológico.



**Figura 4** - Análise de microscopia eletrônica do fungo *Colletotrichum sublineolum*. (A) Controle: hifa de *C. sublineolum* em solução salina. (B) Ação da enzima quitinase: hifa do fungo após incubação de 3 h por 28°C na presença do extrato quitinolítico da linhagem A8 de actinomiceto endofítico.

Fonte: Quecine et al. (2008).

Os actinomicetos são um grupo amplamente explorado de micro-organismos que produzem enzimas e antibióticos com aplicações para fins agrícolas de forma mais sustentável para a proteção de culturas. Entre os actinomicetos, o gênero *Streptomyces* é particularmente eficiente na quebra de quitina por meio de enzimas quitinolíticas (QUECINE et al., 2008). Existe uma grande variedade de quitinases e uma vastagam de temperaturas e valores de pH ótimos correspondente para a atividade de quitinase com o objetivo de determinar qual quitinase é mais adequada para o biocontrole de insetos-pragas.

Quecine et al. (2011) caracterizaram parcialmente o extrato quitinolítico produzido por um linhagem endofítica (A8) de *Streptomyces* sp.. O extrato produzido pela linhagem A8 foi testado contra o inseto-praga *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae); também conhecido popularmente como o bicudo do algodoeiro e considerado o principal inseto-praga da cultura do algodão nas Américas; sendo encontrado desde os EUA, México, América Central, Cuba, Haiti, Venezuela, Colômbia, Argentina, Paraguai e Brasil. O extrato quitinolítico, obtido a partir da linhagem A8, foi adicionado a uma dieta artificial e oferecida ao inseto-praga *A. grandis* experimentalmente. O desenvolvimento da fase de ovo para estágio adulto durante o experimento foi prolongado e a porcentagem de adultos que emergiu foi de aproximadamente 66% menos do que quando comparado com a dieta controle.

Os resultados desse estudo indicam que o desenvolvimento larval de *A. grandis* foi inibido pela presença do extrato quitinolítico adicionado na dieta artificial; demonstrando uma base experimental para o uso de quitinase oriunda de um *Streptomyces* sp. endofítico como uma alternativa no controle do inseto-praga *A. grandis*.

#### **4.4 Fungos endofíticos no controle biológico**

Os micro-organismos endofíticos têm sido considerados uma ferramenta emergente no controle biológico. O uso combinado de controle biológico e químico utilizando micro-organismos endofíticos em associação com agentes químicos pode resultar em um efeito sinérgico sobre um ou vários agentes causadores de doenças e pragas. Vários papéis têm sido atribuídos aos fungos endofíticos, incluindo a proteção contra insetos herbívoros, nematoides parasitas de plantas e micro-organismos fitopatogênicos (LACAVA; AZEVEDO, 2014).

Pesquisas focadas na utilização de fungos endofíticos na agricultura são divididas em duas áreas, a primeira voltada para a influência econômica benéfica ou prejudicial que fungos endofíticos possam ter dentro da produção e colheita. A segunda voltada para o estudo de metabólito secundários de fungos endofíticos, principalmente para descobrir moléculas ou compostos bioativos que possam ser utilizados no controle de insetos-pragas, fitopatógenos e plantas daninhas (AZEVEDO et al., 2000).

Alguns fungos endofíticos também podem atuar como fungos entomopatogênicos, por exemplo, *Beauveria bassiana*, que tem sido reportado como endófito de importantes culturas como milho, batata, algodão, tomate, cacau, banana e café.

O efeito negativo de fungos endofíticos sobre insetos herbívoros é associado com a produção de metabólitos ou toximas pelo fungo (AZEVEDO et al., 2000). Estudos com *B. bassiana* endofítica de milho sugerem que o modo de ação na supressão do inseto-praga *Ostrinia nubilalis* está ligado à presecção de metabólitos produzidos pelo fungo endofítico inibindo a presença do inseto, o que causa a sua não alimentação ou ainda inibição por antibiose.

Vega et al. (2008) especulam o modo de ação de fungos endofíticos contra insetos, descartando o controle por ação direta de infecção ou desenvolvimento de micose no inseto-praga, sugerindo que a ação do fungo endofítico está associada à produção de metabólitos e toxinas. Nessa revisão, esses autores listam uma série de toxinas produzidas por fungos com ação comprovada contra insetos e que podem ser encontrados endofiticamente, tais como *Beauveria* spp., que produz uma série de metabólitos, incluindo bassianim, beauvericim, bassianolide, beauveriolide, bassiacridim, oosporeim e tenellim.

Estudo indica que o fungo *B. bassiana*, colonizando endofiticamente tecidos de bananeira (*Musa* sp.), no controle do inseto-praga *Cosmopolites sordidus*. Nesse estudo, foi inoculado artificialmente o fungo na planta de banana e foi verificada a sua colonização endofítica sem causar qualquer dano à planta hospedeira. Os bioensaios, após infecção de cinco dias pelo inseto *C. sordidus*, demonstraram a princípio não haver efeito na taxa de ovoposição e na habilidade de eclosão dos ovos. Entretanto, após 15 semanas a presença de *B. bassiana* como um endófito no tecido de banana reduziu a população e danos causados pelo inseto. Entre 53,4 e 57,7% de adultos de *C. sordidus* morreram pela infecção de *B. bassiana*, reduzindo assim os danos causados na planta em cerca de 30 a 63% dependendo da parte da planta analisada (AKELLO et al., 2007).

Dentro deste contexto, Rubini et al. (2005) isolaram e analisaram a diversidade genética de fungos endofíticos de cacau (*Theobroma cacao* L.), associado à doença conhecida como 'vassora de bruxa', na qual o agente causal é o fungo *Crinipellis*

*perniciosa*. A ‘vassora de bruxa’ é uma importante doença que afeta a produção de cacau em toda a América. Para avaliar o potencial dos fungos endofíticos de *T. cacao* como agentes de controle biológico de *C. perniciosa* foi analisada a comunidade fúngica endofítica de plantas de cacau afetada e não afetada pela doença. Os resultados demonstraram que essa comunidade é composta pelos seguintes gêneros *Acremonium*, *Blastomyces*, *Botryosphaeria*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Cordyceps*, *Diaporthe*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Gibberella*, *Gliocladium*, *Lasiodiplodia*, *Monilochoetes*, *Nectria*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Pleurotus*, *Pseudofusarium*, *Rhizopycnis*, *Syncephalastrum*, *Trichoderma*, *Verticillium* e *Xylaria*. Os fungos endofíticos isolados foram também avaliados *in vitro* e *in vivo* quanto à habilidade de inibir *C. perniciosa*. Entre os fungos testados muitos foram identificados como potenciais antagonistas, mas somente o gênero *Gliocladium catenulatum* reduziu a incidência da doença em cerca de 70% em mudas de cacau.

Hanada et al. (2010) também apresentaram resultados interessantes com fungos endofíticos isolados de caule e ramos de plantas sadias de *Theobroma cacao* (cacau) e *Theobroma grandiflorum* (cupuaçu) contra *Phytophthora palmivora* que causa manchas escuras nos frutos de cacau e cupuaçu. Em experimentos de campo, 70% dos isolados endofíticos apresentaram algum tipo de biocontrole contra o fitopatógeno. O endófito mais promissor foi uma linhagem de *Trichoderma martiale* (HANADA et al., 2009), classificada como uma nova espécie de *Trichoderma* (HANADA et al., 2008).

O uso de estratégias de controle biológico de fitopatógenos, envolvendo fungos endofíticos, vem crescendo cada vez mais e com o acúmulo de informações a respeito da diversidade, modo de ação e biologia do endófito pode-se vislumbrar um controle que minimize o uso de agentes químicos, ou mesmo, como único caminho para a redução da doença, como no caso de *C. perniciosa*, que de forma contínua e devastadora vem diminuindo a produção de cacau no mundo, com prejuízos acima de 700 milhões de dólares americanos (BOWERS et al., 2001).

Os esforços para o controle biológico de fitopatógenos de cacau (*T. cacao*), utilizando endófitos, estão sendo conduzidos de forma contínua como demonstrado no trabalho de Mejía et al. (2008), em que fungos endofíticos isolados de tecidos sadios de *T. cacao* foram testados *in vitro* para verificar o antagonismo contra patógenos causadores de doença em cacau. Os resultados mostraram antagonismo de 65% contra *Phytophthora palmivora*, 40% contra *Moniliophthora roreri* e 27% contra *Moniliophthora perniciosa*. Além disso, esses autores realizaram testes em campo utilizando os endófitos dos seguintes gêneros *Colletotrichum gloeosporioides*, *Clonostachys rosea* e *Botryosphaeria ribis*. Os resultados em campo sugerem redução na doença causada por *Phytophthora* spp., assim como na esporulação do patógeno *M. roreri*, suportando a hipótese de uso desses endófitos

no controle de doenças causadas por esses patógenos. Além disso, é sugerido que a combinação de informações obtidas em estudos de campo, em laboratório (*in vitro*) e de experimentos conduzidos em casa de vegetação sobre fungos endofíticos, pode indicar num primeiro momento atributos favoráveis para potenciais agentes no controle biológico.

#### 4.5 Micro-organismos endofíticos e o controle simbiótico

Um novo conceito de transformação genética, denominado paratransgênese, tem sido proposto para a prevenção de transmissão de patógenos por insetos vetores. Paratransgênese nesse tipo de aplicação significa a alteração genética de micro-organismos simbióticos que possam ser transmitidos via vetor. Esta estratégia de prevenção de doença vem sendo denominada de controle simbiótico, como uma variação da denominada terapia simbiótica (AHMED, 2003).

A técnica de paratransgênese é empregada para criar condições de impedir a transmissão do patógeno pelo inseto vetor. A estratégia de controle simbiótico pode empregar dois métodos: o de paratransgênese e o de não manipulação genética, para o controle de insetos-pragas e doenças. Em muitos casos a solução pode estar simplesmente na competição como forma de controle, pois a manipulação genética pode implicar no aumento de custo na estratégia de controle.

A chave do controle simbiótico está em ter um micro-organismo candidato que coexista no mesmo nicho ou ecossistema onde reside o problema, isto é, para o agente controlador ter acesso ao patógeno e atuar no seu controle ou eliminação. O controle simbiótico é diferente do controle biológico clássico. Neste último, não necessariamente é utilizado um agente de controle nativo do nicho para uma estratégia de controle. Por outro lado, o controle simbiótico busca preferencialmente agentes de controle já adaptados a aquele nicho afetado por um inseto-praga ou doença; ou seja, no controle simbiótico todos os elementos estão presentes e estabelecidos no ecossistema (LACAVAL; AZEVEDO, 2013).

Em contraste com os métodos de controle de doenças transmitidas por insetos vetores na agricultura e na saúde, o controle simbiótico não visa controlar diretamente o vetor da doença, mas sim afetar o patógeno, ou seja, diretamente afetando sua habilidade de sobreviver ou indiretamente bloqueando a sua transmissão pelo inseto vetor (MILLER, 2007). Em muitos casos isto é alcançado pela interação/competição do patógeno com um micro-organismo simbiótico. De fato, nenhuma doença causada por patógeno que é transmitida por inseto vetor

não possui realmente uma cura. Dessa forma, o controle simbiótico oferece uma nova estratégia alternativa para o controle de doenças que envolvem insetos vetores (MILLER, 2007).

Associações simbióticas possuem importante papel em ecossistemas naturais, possuindo grande potencial para aplicação em diversas áreas de interesses com potencial uso na indústria, agricultura e saúde. Em ecossistemas naturais, várias associações simbióticas são bem conhecidas e estudadas. Dessas associações podem ser citadas: *Rizhobium*-leguminosa, micro-organismos do trato intestinal animal, micorrizas arbusculares, líquens e micro-organismos endofíticos (LACAVAL; AZEVEDO, 2013). Embora associações simbióticas tenham sido estudadas extensivamente, os resultados ainda são limitados para aplicações práticas. Particularmente, pesquisas na utilização de micro-organismos simbióticos são limitadas pelas dificuldades de isolamento e manutenção de culturas puras de simbiotes.

Como colocado anteriormente o acúmulo de informações a respeito da interação planta-endófitos e com os resultados promissores observados, tem sido dada especial atenção ao estudo de micro-organismos endofíticos como agentes de controle biológico de inúmeras doenças de plantas, insetos-pragas e promotores de crescimento vegetal (HALLMANN et al., 1997; AZEVEDO et al., 2000).

O estudo de micro-organismos associados a insetos em diferentes estratégias de controle biológico tem sido desenvolvido, primeiramente pela utilização de micro-organismos patogênicos ao inseto (SCHNEPF et al., 1998). Outra estratégia adicional é a exploração de micro-organismos simbióticos, com o objetivo de reduzir insetos vetores competentes na transmissão de doenças. Esta redução da capacidade de um inseto vetor como um agente transmissor de doença pode estar baseado em micro-organismos que interferem naturalmente na presença do patógeno ou ainda poderia ser alcançado por meio da manipulação genética de micro-organismos simbióticos em insetos. Micro-organismos os quais possuem a capacidade de se multiplicarem em populações de insetos hospedeiros são particularmente promissores, desde que eles também possam ser explorados para expressar uma característica genética desejada.

Um pré-requisito para o desenvolvimento de futuras estratégias para o controle simbiótico da população de insetos e insetos vetores é a identificação de associações que possuam características promissoras entre micro-organismos e insetos. Estas características incluem a presença de micro-organismos simbióticos nos organismos hospedeiros, que estes também sejam hospedeiros de patógenos e ainda que possuam potencial para propagar-se rapidamente entre a população hospedeira.



Uma vez que o agente de controle simbiótico seja identificado para atuar, todas as manipulações devem ser realizadas considerando o local da ação. Entretanto, uma solução alcançada, utilizando a estratégia de controle simbiótico em uma localização específica, pode não atuar satisfatoriamente em outro local e condição, diferentemente do que pode ocorrer no controle biológico clássico. Após identificado um micro-organismo com potencial para ser um candidato no controle simbiótico, este deve ter a habilidade de ser cultivado e reintroduzido no seu nicho original e ainda ser conveniente para alterações genéticas, caso necessário.

#### 4.6 Paratransgênese e o controle simbiótico

A manipulação genética de insetos transmissores de doenças é uma estratégia alternativa cujo objetivo é a eliminação do inseto vetor dentro de uma população. A expressão de genes que produzem produtos que possuam a habilidade de bloquear ou eliminar a transmissão por parte de insetos vetores poderia prover a uma valiosa ferramenta no controle de diversas doenças causadas por insetos transmissores. Dentro deste contexto, existem duas abordagens para a transformação genética de inseto vetores. A primeira envolve a transformação direta via inserção de material genético exógeno (DURVASULA et al., 2003). Isto é realizado utilizando elementos móveis, como os transposons, para a transformação genética. A segunda abordagem envolve a expressão de genes exógenos utilizando um micro-organismo simbiótico, transformado geneticamente e que seja nativo ao inseto transmissor da doença. Esse método tem recebido especial atenção recentemente sendo um típico exemplo de paratransgênese.

Paratransgênese é uma nova abordagem para controlar insetos vetores transmissores de doenças, principalmente artrópodes; derivado da ocorrência natural de interações entre vetor e patógeno e populações de micro-organismos simbióticos que colonizam o inseto. Considerando que a presença de tais micro-organismos dentro do inseto vetor é fundamental na paratransgênese, as exigências descritas a seguir são necessárias para o sucesso da estratégia de paratransgênese (DURVASULA et al., 2003): a) os micro-organismos selecionados para cultivo e manipulação genética *in vitro* devem coexistir com o inseto transmissor da doença; b) métodos simples para isolar e transformar micro-organismos simbióticos devem estar presentes; c) a transformação genética de micro-organismos simbióticos tem que resultar em mutantes estáveis, sem perda de aptidão, reprodutibilidade e manter a característica de uma relação simbiótica, além de manter taxas comparáveis às da linhagem selvagem; d) a manipulação

genética de um micro-organismo simbiótico não deve afetar suas funções simbióticas no inseto vetor e hospedeiro; e) a expressão de produtos oriundos de micro-organismos geneticamente alterados deve atingir o patógeno e ser capaz de interromper o ciclo de transmissão da doença pelo inseto vetor; f) a manipulação genética de bactérias simbióticas não deve ser virulenta contra o inseto vetor em questão ou mesmo contra outros organismos presentes no ambiente. Além disso, bactérias selecionadas para serem utilizadas em paratransgênese não devem ser patogênicas contra elas mesmas.

A paratransgênese para a manipulação de insetos vetores transmissores de doenças requer uma avaliação da biologia da população do inseto; assim como assegurar uma taxa de transmissão dos micro-organismos simbiótico dentro da dinâmica da população de vetores. A reprodutibilidade da estratégia de paratransgênese deve ser baseada na observação de como o inseto/micro-organismo interage com o ambiente, para que esta se apresente o mais próximo do que ocorre na natureza, visando assim o sucesso do controle simbiótico.

## **4.7 Controle simbiótico na agricultura**

Nos sub-itens a seguir, serão apresentados exemplos de controle simbiótico de doenças de culturas economicamente importantes para a agricultura, a citar a ‘Doença de Pierce’ em videira e a Clorose Variegada dos Citros.

### **4.7.1 Controle simbiótico da ‘Doença de Pierce’**

A ‘Doença de Pierce’ em videira é causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, a qual bloqueia os vasos xilemáticos das plantas afetadas. A linhagem de *X. fastidiosa* que causa a doença em videira nos EUA, provavelmente é originária dos Estados da Flórida, passando pelo estado do Texas. Essa doença agravou-se quando foi introduzida na Califórnia a cigarrinha vetora *Homalodisca coagulata*, também conhecida como *glassy-winged sharpshooter* (GWSS).

Atualmente na Califórnia, pesquisas estão sendo desenvolvidas cujo objetivo é o controle simbiótico da doença a fim de interromper o seu ciclo desde a transmissão pelo inseto vetor até o bloqueio da *X. fastidiosa* na planta hospedeira. Três potenciais candidatos bacterianos para o controle simbiótico desta doença foram selecionados de GWSS no sul da Califórnia. Todos os três candidatos

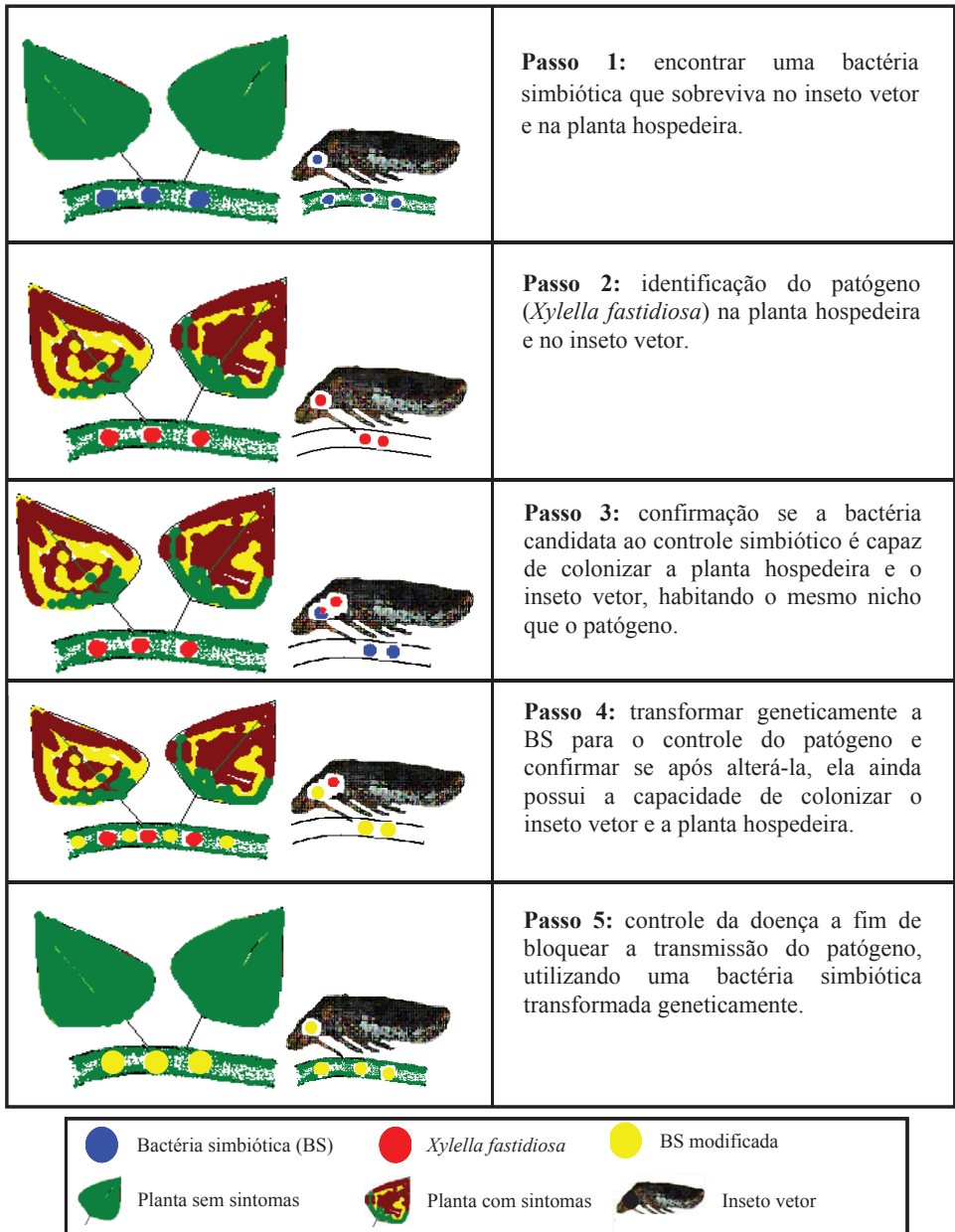
foram também detectados como endófitos em diferentes plantas hospedeiras e transmitidos pelo inseto vetor da ‘Doença de Pierce’, indicando que o candidato para o controle simbiótico pode colonizar a planta hospedeira e o inseto vetor (BEXTINE et al., 2004).

Dentre estes três candidatos selecionados, a espécie *Alcaligenes denitrificans* var. *xylosoxidans* (*Axd*) foi selecionada para desenvolver a estratégia de controle simbiótico para a doença. *Axd* foi alterada geneticamente para expressar uma proteína vermelha fluorescente (*DsRed*), introduzindo assim uma marca genética para o monitoramento na planta hospedeira e no inseto vetor.

Um número de candidatos como peptídios antimicrobianos já foi testado para o possível uso no controle simbiótico da ‘Doença de Pierce’ (KUZINA et al., 2006). Além de anticorpos de cadeia simples, específicos para a linhagem de *X. fastidiosa* da videira, com objetivo de utilizar esses anticorpos no controle simbiótico e utilizando bactérias endofíticas expressando esse tipo de agente antimicrobiano. De acordo com Bextime et al. (2004), a Figura 5 mostra os passos para a adoção do controle simbiótico da ‘Doença de Pierce’.

#### 4.7.2 Controle simbiótico da Clorose Variegada dos Citros (CVC)

A Clorose Variegada dos Citros (CVC) é causada pela *Xylella fastidiosa*, uma bactéria Gram-negativa, sem motilidade, limitada ao xilema. Ela é transmitida naturalmente por insetos succionários (Hemiptera: Cicadellidae) que se alimentam da seiva bruta do xilema. Ainda há divergências no que diz respeito ao modo de ação de *X. fastidiosa* que causa patogênese em citros. Contudo, a hipótese mais aceita é que a *X. fastidiosa* leva a disfunções no sistema condutor de água em plantas de citros. O principal mecanismo de patogênese seria a falta de translocação de água e nutrientes pela oclusão de vasos do xilema pelos agregados bacterianos, devido a deposição de pectina e de goma fastidiana (DA SILVA et al., 2001), em conjunto com reações de resistência da própria plantas. A formação de agregados de células de *X. fastidiosa* dever-se-ia à liberação de polissacarídeos extracelulares que facilitariam a adesão célula-célula e apontam que a formação do biofilme por *X. fastidiosa* dentro dos vasos da planta com posterior bloqueio no sistema de água é causa da patogênese desta bactéria em citros.



**Figura 5** - Cronologia para adoção do controle simbiótico em estratégia de paratransgênese utilizando uma bactéria endofítica (simbiótica) no ciclo de doenças onde o agente causal é a *Xylella fastidiosa*.

Fonte: Lacava et al. (2009).

Azevedo e Araújo (2003) descrevem o potencial uso do gênero *Methylobacterium* spp., a qual coloniza o mesmo nicho que *X. fastidiosa* em citros, numa estratégia de reintroduzir esse endófito geneticamente modificado em plantas de citros, com o objetivo de controlar a CVC. Nesse estudo foi descrita a utilização de um vetor replicativo PegIA160 para produzir um isolado geneticamente modificado de *Methylobacterium* expressando resistência a um antibiótico além do gene da endoglucanase. É sabido que *X. fastidiosa* produz uma goma, denominada goma fastidiana (DA SILVA et al., 2001), a qual pode ser responsável pela obstrução dos vasos de xilema em plantas afetadas pela CVC. Dessa forma, a produção de endoglucanase por um endófito oriundo de plantas cítricas poderá transformar este endófito em um agente de controle simbiótico contra *X. fastidiosa* visando o controle da CVC.

Baseado na premissa do controle simbiótico, Ferreira Filho et al. (2012) modificaram geneticamente a linhagem bacteriana de *Methylobacterium extorques* (AR1.6/2), isolada endofiticamente do xilema de plantas de citros e avaliaram a capacidade de colonização e interação com a *X. fastidiosa* na planta modelo *Catharanthus roseus*. A linhagem AR1.6/2 foi geneticamente transformada para a expressão heteróloga da proteína verde fluorescente (GFP) e endoglucanase A (EglA); gerando assim duas linhagens mutantes ARGFP e AREglA, respectivamente. Por microscopia de fluorescência e, após inoculação artificial, foi possível comprovar que a linhagem ARGFP possui a habilidade de colonizar os vasos xilemáticos de *C. roseus*. Por microscopia eletrônica de varredura foi observado que a linhagem AREglA e *X. fastidiosa* podem co-habitar os vasos de *C. roseus*. Além disso, os resultados indicam que a colonização dos vasos xilemáticos de *C. roseus* pela bactéria endofítica *M. extorques* contribui para o decréscimo da formação de biofilme por *X. fastidiosa*; quando esta também está colonizando o xilema. A formação de goma fastidiana é um importante fator de virulência para a bactéria fitopatogênica *X. fastidiosa*. A inoculação da linhagem mutante AREglA na planta modelo *C. roseus* reduziu a obstrução do xilema causado pela *X. fastidiosa*. Os mecanismos relatados para esta interação entre essa linhagem endofítica geneticamente transformada de *M. extorques* ainda é desconhecido, mas os resultados permitem especular que a linhagem AREglA poderia induzir uma resistência sistêmica na planta ou a despolimerização da goma fastidiana; reduzindo a formação de biofilme. Esses autores demonstraram o potencial da bactéria endofítica *M. extorques* como um candidato a paratransgênese; objetivando o controle simbiótico da *X. fastidiosa*, agente causal da CVC.

## 4.8 Conclusões

O controle e o manejo de pragas e doenças tem sido um desafio significativo e constante para os profissionais da área agrícola. O surgimento de problemas relacionados à produção e colheita de alimentos nos remete à preocupação do uso exagerado de insumos e defensivos agrícolas, criando a necessidade de regulamentos ambientais mais rigorosos, gerando assim a necessidade do desenvolvimento de novas tecnologias para a produção de alimentos mais sustentáveis em relação ao controle de insetos-pragas e doenças, sem prejuízos ambientais. Dentro deste contexto, o desenvolvimento de pesquisas que envolvam estratégias de controle biológico e simbiótico, vem sendo pesquisados, sobretudo em interações que envolvam a presença de insetos vetores para a transmissão de uma determinada doença. Novas abordagens para o desenvolvimento sustentável do controle biológico de insetos e insetos-vetores de doenças vem sendo desenvolvidas, baseadas nas relações simbióticas, que são ecologicamente menos prejudiciais ao meio-ambiente do que os métodos atuais de controles químicos em uso. O controle biológico e simbiótico é essencialmente um tema interdisciplinar que requer métodos e protocolos provenientes de diferentes áreas de estudos, incluindo a biologia molecular, microbiologia, fitopatologia, virologia, entomologia, imunologia, genética e ecologia.

## Referências

AHMED, F. Genetically modified probiotics in foods. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 21, no. 11, p. 491-497, 2003.

AKELLO, J. et al. *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin as an endophyte in tissue culture banana (*Musa* spp.). **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 96, no. 1, p. 34-42, 2007.

AZEVEDO, J. L. et al. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, Chile, v. 3, no. 1, p. 40-65, 2000.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Genetically modified crops: environmental and human health concerns. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 544, no. 2-3, p. 223-233, 2003.

BEXTINE, B. et al. Delivery of a genetically marked *Alcaligenes* sp. to the glassy-winged sharpshooter for use in a paratransgenic control strategy. **Current Microbiology**, New York, v. 48, no. 5, p. 327-331, 2004.

BOGAS, A. C. et al. Endophytic bacterial diversity in the phyllosphere of Amazon *Paullinia cupana* associated with asymptomatic and symptomatic anthracnose. **SpringerPlus**, Switzerland, v. 4, no. 1, p. 4, p. 258, 2015.

BOWERS, J. et al. The impact of plant diseases on world chocolate production. **Plant Health Progress**, St. Paul, 2001. Disponível em: <www.apsnet.org/online/feature/cacao/>. Acesso em: 15 set. 2010.

DA SILVA, F. R. et al. Fastidious gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 203, no. 2, p. 165-171, 2001.

DURVASULA, R. et al. *Rhodnius prolixus* and its symbiont, *Rhodococcus rhodnii*: a model for paratransgenic control of disease transmission. In: BOURTZIS, K.; MILLER, T. (Ed.). **Insect symbiosis**. Boca Raton: CRC, 2003. p. 83-95.

FERREIRA FILHO, A. S. et al. Endophytic *Methylobacterium extorquens* expresses a heterologous -1,4-endoglucanase A (EglA) in *Catharanthus roseus* seedlings, a model host plant for *Xylella fastidiosa*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 28, no. 4, p. 1475-1481, 2012.

HALMANN, J. et al. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 43, no. 10, p. 895-914, 1997.

HANADA, R. et al. *Trichoderma martiale* sp. nov., a new endophyte from sapwood of *Theobroma cacao* with a potential for biological control. **Mycological Research**, Cambridge, v. 112, no. 11, p. 1335-1343, 2008.

HANADA, R. et al. Biocontrol potential of *Trichoderma martiale* against the black-pod disease (*Phytophthora palmivora*) of cacao. **Biological Control**, Orlando, v. 50, no. 2, p. 143-149, 2009.

HANADA R. et al. Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuaçu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of black-pod disease. **Fungal Biology**, Oxford, v. 114, no. 11-12, p. 901-910, 2010.

KUZINA, L. et al. *In vitro* activities of antibiotics and antimicrobial peptides against the plant pathogenic bacterium *Xylella fastidiosa*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 42, no. 5, p. 514-520, 2006.

LACAVA, P. T. et al. Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus variegated chlorosis. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 39, no. 1, p. 55-59, 2004.

LACAVA, P. T. et al. The endophyte *Curtobacterium flaccumfaciens* reduces symptoms caused by *Xylella fastidiosa* in *Catharanthus roseus*. **Journal of Microbiology**, Seoul, v. 45, no. 5, p. 388-393, 2007.

LACAVA, P. T. et al. Interactions of *Xylella fastidiosa* and endophytic bacteria in citrus: a review. **Tree and Forestry Science and Biotechnology**, Jamaica, v. 3, p. 40-48, 2009.

LACAVA, P. T.; AZEVEDO, J. L. Endophytic bacteria: a biotechnological potential in agrobiological system. In: MAHESHWARI, D.; SARAF, M.; AERON, A. (Ed.). **Bacteriain agrobiology: crop productivity**. Berlin: Springer-Verlag, 2013. p. 1-44

LACAVA, P. T.; MILLER, T. A.; AZEVEDO, J. L. Micro-organismos no controle simbiótico de pragas e doenças. **Microbiologia in Foco**, São Paulo, v. 20, p. 21-30, 2013.

LACAVA, P. T.; AZEVEDO, J. L. Biological control of insect-pest and diseases by endophytes. In: VERMA, V. C.; GANGE A. C. (Ed.). **Advances in endophytic research**. Berlin: Springer-Verlag, 2014. p. 231-256.

MEJÍA, L. et al. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. **Biological Control**, Orlando, v. 46, no. 1, p. 4-14, 2008.

MENDES, R.; AZEVEDO, J. L. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In: COSTA-MAIA, L.; MALOSSO, E.; YANO-MELO, A. M. (Org.). **Micologia: avanços no conhecimento**. Recife: UFPR, 2007. v. 1, p. 129-140.

MILLER, T. A. Symbiotic control in agriculture and medicine. **Symbiosis**, Philadelphia, v. 42, p. 67-74, 2007.

QUECINE, M. C. et al. Chitinolytic activity of endophytic *Streptomyces* and potential for biocontrol. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 47, no. 6, p. 486-491, 2008.



QUECINE, M. C. et al. Partial characterization of chitinolytic extract from endophytic *Streptomyces* sp. and its effects on the boll weevil. **Journal of Agricultural Science and Technology**, Tehran, v. 5, p. 420-427, 2011.

RAMESH, R.; JOSHI, A. A.; GHANEKAR, M. P. *Pseudomonas*: major endophytic bacteria to suppress bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* in the egg plant (*Solanum melongena* L.). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 25, no. 1, p. 47-55, 2009.

ROSENBLUETH, M.; MARTINEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant Microbe Interaction**, St. Paul, v. 19, no. 8, p. 827-837, 2006.

RUBINI, M. et al. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao*, L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso* causal agent of Witches' Broom disease. **International Journal of Biological Science**, Lake Haven, v. 1, p. 24-33, 2005.

SCHNEPF, Ernest et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, D.C., v. 62, no. 3, p. 775-806, 1998.

SEIPKE, R. et al. *Streptomyces* as symbionts: an emerging and widespread theme? **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 36, no. 4, p. 862-876, 2012.

SHARMA, V. et al. Enhancement of *Verticillium* wilt resistance in tomato transplants by in vitro co-culture of seedlings with a plant growth promoting rhizobacterium (*Pseudomonas* sp. strain PsJN). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, Canada, v. 44, no. 6, p. 528-536, 1998.

VEGA, F. et al. Entomopathogenic fungal endophytes. **Biological Control**, Orlando, v. 46, no. 1, p. 72-82, 2008.

# Mecanismos de promoção de crescimento vegetal por endófitos e rizobactérias

---

Bruna Durante Batista, Maria Carolina Quecine-Verdi, Paulo Teixeira Lacava

## 5.1 Introdução

Micro-organismos que se associam benéficamente às plantas têm sido isolados, multiplicados, formulados e utilizados como prática agrônômica rotineira em alguns países favorecendo o desenvolvimento e a produtividade das plantas. Entre esses micro-organismos, destacam-se fungos e bactérias que podem estar associados às plantas em dois níveis em um sistema agrobiológico: endofítico e rizosférico. Nas relações endofíticas, fungos e bactérias promotoras de crescimento residem nos espaços apoplásticos da planta hospedeira nos mais diversos tecidos, enquanto rizobactérias colonizam a rizosfera, zona de solo ao redor da raiz sob influência imediata do sistema radicular.

Vários estudos já comprovaram que plantas reinoculadas com micro-organismos geralmente crescem mais rápido e com mais vigor que aquelas não reinoculadas. Diversas culturas de grande importância econômica já foram avaliadas e apresentaram aumento de produtividade e redução da necessidade de insumo quando inoculadas com micro-organismos. Como exemplo, destaca-se a cultura da soja inoculada com rizóbios fixadores de nitrogênio, resultando numa economia anual de bilhões de dólares em adubo nitrogenado para o Brasil.

A promoção de crescimento vegetal por esses micro-organismos pode ser realizada por mecanismos diretos por meio da fixação biológica de nitrogênio; produção de fitormônios, tais como ácido indol acético (AIA) e citocinas, ou pelo aumento da biodisponibilidade de minerais (ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006).

Indiretamente, os micro-organismos, principalmente os endófitos, promovem o crescimento vegetal por meio do controle biológico de fitopatógenos, uma vez que esses organismos colonizam o mesmo nicho ecológico, o interior das plantas, e endofíticos podem produzir e liberar moléculas com ação antimicrobiana, tais como antibióticos e sideróforos, ou ainda induzir a resistência sistêmica da planta hospedeira. Além disso,

diversos estudos indicam que a colonização de tecidos vegetais por micro-organismos pode conferir tolerância a estresses bióticos e abióticos (LACAVA; AZEVEDO, 2013).

Até o momento não há estudos que relatam plantas livres de micro-organismos. Como apenas uma ínfima parcela das espécies vegetais foram estudadas em relação à microbiota associada, a possibilidade de se encontrar um novo e benéfico micro-organismos entre a diversidade de plantas existentes nos diferentes ecossistemas terrestres é considerável.

No presente capítulo, serão apresentados os principais mecanismos e papéis desempenhados por micro-organismos endofíticos e bactérias rizosféricas como promotores de crescimento vegetal.

## 5.2 Micro-organismos endofíticos

Diversas definições de endófitos estão descritas na literatura. Originalmente o termo endófito, descrito por De Bary (1866), refere-se a qualquer micro-organismos que vive nos tecidos de plantas, distinguindo-se dos epifíticos que vivem na superfície. Outra definição, proposta por Hallmann et al. (1997), sugere que endófitos podem ser considerados micro-organismos que são isolados de tecidos vegetais desinfetados superficialmente e que não causam aparentemente danos às plantas hospedeiras. Mendes e Azevedo (2007) definiram micro-organismos endofíticos da mesma maneira como outros autores, no entanto, dividiram os endófitos em dois tipos, sendo: tipo I, os que não produzem estruturas externas à planta; e tipo II, os que produzem estruturas externas à planta, como fungos micorrízicos e bactérias simbiotes noduladoras que fixam nitrogênio. De modo geral, as plantas possuem uma microbiota endofítica característica importante para sua sanidade e manutenção. A capacidade de sobreviver dentro do vegetal é uma vantagem para os micro-organismos endofíticos já que os mesmos não estão expostos às adversidades ambientais e encontram pouca ou nenhuma competição.

Endófitos podem ser encontrados em diferentes órgãos e tecidos vegetais como folhas, ramos, raízes, frutos, sementes e flores (LACAVA; AZEVEDO, 2013). Sua penetração nos vegetais se dá por aberturas naturais ou artificiais, tais como estômatos, ferimentos causados por instrumentos agrícolas, microferimentos nas raízes ocasionados pelo atrito destas com as partículas do solo etc., disseminando de maneira sistêmica ou restrita a diversas partes da planta, habitando de forma ativa o apoplasto, vasos condutores e, em alguns casos, pode ocorrer colonização intracelular (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007).

A classificação de uma bactéria como endofítica é apenas didática, isso porque além das bactérias endofíticas no interior das plantas, existem bactérias patogênicas causadoras de doenças ao hospedeiro e a diferenciação entre endófito e patógeno não é definitiva. Isso ocorre, pois a relação benéfica ou patogênica depende de fatores como as condições ambientais ou do equilíbrio com as outras populações bacterianas. Assim, uma bactéria endofítica pode, dependendo das condições, tornar-se patogênica. Ou ainda, uma epifítica pode entrar na planta, tornando-se endofítica ou patogênica, mas, em geral, as bactérias endofíticas estão em maior densidade em relação a bactérias patogênicas (ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006).

O mesmo ocorre com a classificação de fungos. Esses podem mudar seu estilo de vida de patogênico para mutualista ou comensal mediante alterações abióticas e bióticas como mudanças na composição de micro-organismos na superfície foliar, ou mudanças na planta hospedeira, alteração na disponibilidade de nutrientes, fermentos ou senescência como endófito.

Didaticamente, os fungos endofíticos podem ser divididos em dois grupos: endófitos clavicipitáceos e endófitos não clavicipitáceos (SIEBER, 2007). Os primeiros compreendem espécies pertencentes à família Clavicipitaceae, que formam simbioses quase que exclusivamente com gramíneas (Poaceae) de clima temperado. Esses fungos são reconhecidos por potencializar o *fitness* da planta hospedeira pela produção de substâncias alcaloides que inibem a herbivoria por insetos, pela produção de metabólitos que estimulam o crescimento vegetal e por conferirem tolerância à escassez hídrica.

Já os fungos endofíticos não clavicipitáceos abrangem espécies filogeneticamente distintas resultando em uma elevada diversidade, o que dificulta discernir suas funções dentro das plantas, embora interações benéficas sejam frequentemente relatadas (RODRIGUEZ et al., 2009). Estes fungos podem promover o crescimento e o aumento da produção vegetal, podem produzir fito-hormônios, conferir tolerância a altas temperaturas e estresse salino, proteger as plantas contra fitopatógenos e induzir a resistência, captar nutrientes minerais como nitrato e fósforo e garantir a sobrevivência e o estabelecimento das plantas em ambientes extremos (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007).

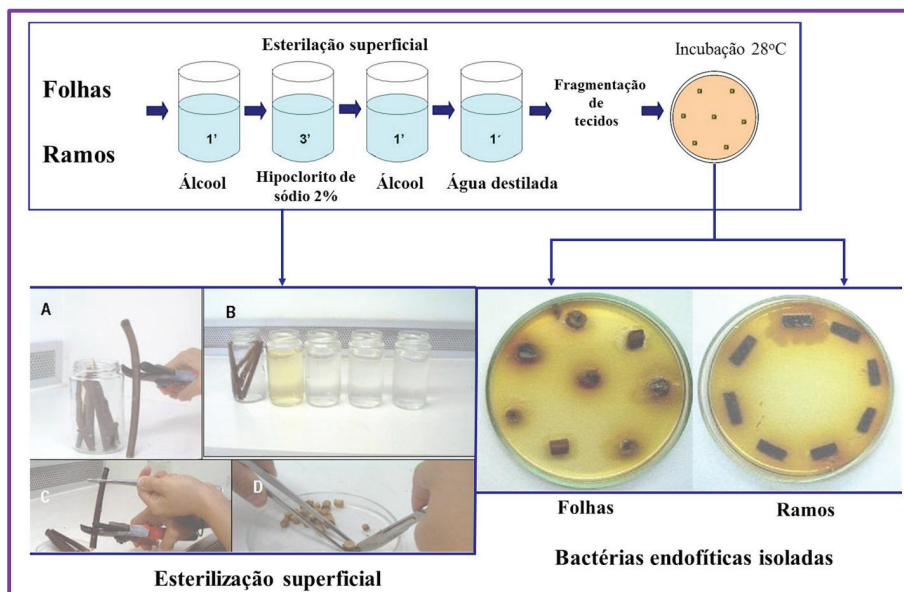
Endófitos podem ser observados diretamente em tecidos de plantas por meio de microscopia óptica, eletrônica ou de fluorescência, ocupando espaços intercelulares e intracelulares, além do interior de tecidos vasculares. Alguns endófitos são facilmente isolados em meios de cultura em condições controladas dos mais diferentes tecidos e órgãos vegetais. Até o presente momento, praticamente todas as espécies vegetais avaliadas revelaram a existência de comunidade endofítica. Normalmente, o isolamento de micro-organismos endofíticos é realizado a partir de raízes, caules, ramos, folhas, mas sementes e estruturas florais como pólen, ovário, anteras e estames também

podem ser utilizadas (Figura 1). A superfície dos tecidos vegetais deve ser desinfestada de forma que a microbiota epifítica seja eliminada, mantendo somente a comunidade endofítica (ARAÚJO et al., 2014) (Figura 2).

Uma forma de estudo de endófitos não cultivados baseia-se no uso de técnicas de biologia molecular, as quais podem permitir o estudo desses endófitos em seu habitat natural, nos diferentes locais no interior da planta hospedeira, sem a necessidade de cultivo, sendo esse o princípio da metagenômica e outras técnicas descritas em capítulo anterior.

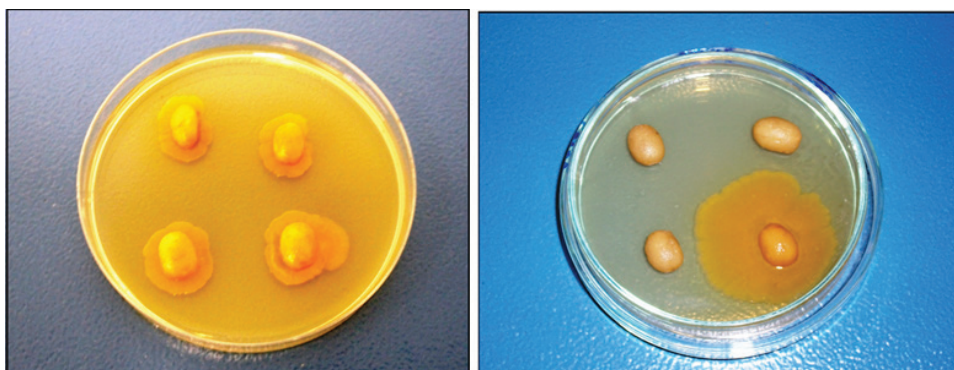
### 5.3 Rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (rpcp)

A rizosfera pode ser definida como qualquer volume de solo influenciado especificamente pelas raízes das plantas e/ou em associação com raízes, pelos e material produzido pela planta. Os compostos secretados pelas raízes no solo tais como aminoácidos e açúcares, são genericamente conhecidos como exsudados e provem uma rica fonte de energia e nutrientes, a qual resulta em maior população e em intensa atividade microbiana na rizosfera (AHEMAD; KIBRET, 2014).



**Figura 1** - Etapas de isolamento de bactérias endofíticas

Fonte: Araújo et al. (2014).



**Figura 2** - Isolamento de bactérias endofíticas de grãos de café. As setas indicam o crescimento bacteriano.

Fonte: Os autores.

Bactérias que se associam às plantas, colonizando suas rizosferas, são denominadas rizobactérias. Cerca de 2-5% das rizobactérias, quando reintroduzidas na planta por inoculação em um solo contendo uma microflora competitiva, exercem efeito benéfico de crescimento vegetal e são denominadas rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (RPCP) (KLOEPPER; SCHROTH, 1978). Similarmente aos fungos e bactérias endofíticas, a promoção do crescimento vegetal por rizobactérias pode ocorrer direta ou indiretamente. Há várias maneiras pelas quais RPCPs podem afetar diretamente o crescimento da planta: por meio da fixação biológica de nitrogênio, da solubilização de minerais, tais como o fósforo, produção de sideróforos (moléculas que solubilizam e sequestram ferro do solo), ou pela produção de reguladores de crescimento vegetal (hormônios) que acentuam o crescimento vegetal em vários estágios de desenvolvimento. A promoção indireta de crescimento ocorre quando RPCPs diminuem ou impedem os efeitos deletérios de um ou mais organismos fitopatogênicos, a exemplo da síntese de toxinas entomopatogênicas, antibióticos e sideróforos e produção de quitinases nocivas a nematoides. Além disso, RPCPs são capazes de melhorar a estrutura do solo e biorremediar solos poluídos por sequestrarem metais pesados tóxicos e degradarem compostos xenobióticos, como pesticidas.

O isolamento de bactérias do solo rizosférico geralmente é realizado a partir de amostras homogeneizadas de solo coletado próximo à superfície de raízes das espécies vegetais. As amostras são misturadas em solução salina autoclavada a fim de desagregar células e partículas do solo. Em seguida, são realizadas diluições seriadas, as quais são transferidas para placas de Petri, contendo um meio de cultura específico, de acordo com o objetivo do estudo (BATISTA, 2012).

Os efeitos de RPCPs sobre o desenvolvimento das plantas são amplos e incluem, além do crescimento vegetal, efeitos benéficos na germinação de sementes e na emergência de plântulas. Por isso, essas bactérias têm sido isoladas, multiplicadas, formuladas e utilizadas como bioinoculantes em alguns países, favorecendo o desenvolvimento e a produtividade de diversas culturas (GHEVARIYA; DESAI, 2014).

O uso de RPCPs como bioinoculantes tem obtido crescente aceitação e importância no mundo devido ao seu potencial de substituir, parcial ou totalmente, fertilizantes químicos visando uma agricultura sustentável e economicamente viável (HUNGRIA; MEGÍAS, 2013).

## 5.4 Micro-organismos promotores de crescimento vegetal

Recentemente, tem-se investido muito em pesquisas para disponibilizar fontes alternativas de nutrientes às plantas e em metodologias alternativas de controle de patógenos com enfoque no uso de micro-organismos associados às plantas. Com o acúmulo de informações sobre a interação entre plantas e micro-organismos e com a determinação das diferentes funções desses micro-organismos no interior das plantas, tem sido dada atenção ao estudo de micro-organismos que podem atuar na promoção de crescimento vegetal (HALLMANN et al., 1997).

Com grande destaque como promotor de crescimento vegetal, o gênero *Burkholderia* tem sido constantemente descrito como bactéria endofítica e rizosférica cultivável que possui a habilidade de colonizar, entre diversas culturas, a cana-de-açúcar. Espécies do gênero *Burkholderia*, associados a essa cultura, são geralmente endófitos fixadores de  $N_2$ . Além disso, outros estudos têm descrito a importância do gênero *Burkholderia* no cultivo de cana-de-açúcar (LUVIZOTTO et al., 2010). Linhagens endofíticas de *Burkholderia* também foram encontradas nas culturas de banana, abacaxi e milho (ESTRADA et al., 2002).

Outro gênero com numerosas espécies de bactérias endofíticas que colonizam diferentes plantas hospedeiras é o *Methylobacterium*. Bactérias desse gênero são bem estudadas como metilotróficas facultativas e são capazes de crescer em compostos de um carbono. Sy et al. (2001) descreveram linhagens de *Methylobacterium nodulans* que apresentaram atividade da enzima nitrogenase e a capacidade de nodulação em espécies de crotalaria, incluindo *Methylobacterium* no quarto grupo filogenético dos rizóbios. Membros do gênero *Methylobacterium* são capazes de influenciar o crescimento de plantas por meio da produção de citocininas e auxinas ou induzir resistência sistêmica contra doenças (MADHAIYAN et al., 2006).

Bactérias do gênero *Klebsiella* são comumente encontradas como endófitos de diversas culturas como milho (*Zea mays*), trevo vermelho, videira, arroz, batata doce, alfafa e soja. *Klebsiella pneumoniae* Kp342 foi capaz de melhorar o crescimento de milho ao colonizar os tecidos internos das raízes da planta hospedeira pela fixação biológica de nitrogênio pela presença da proteína dinitrogenase redutase (CHELIUS; TRIPLETT, 2000). Lacava, Araújo e Azevedo (2007) relataram a colonização endofítica de *Catharanthus roseus* utilizando essa linhagem. Estes autores marcaram a linhagem Kp342 com o gene da 'proteína fluorescente verde' (GFP) e inocularam em mudas de *C. roseus*. A colonização desse endófito foi observada utilizando microscopia de fluorescência. Os resultados sugerem que a *C. roseus* pode ser utilizado como um modelo de planta para estudar bactérias endofíticas.

Além das bactérias endofíticas, hoje é uma realidade muito promissora a possibilidade da aplicação de RPCPs nos solos, trazendo benefícios diretos para a produção agrícola e, ao mesmo tempo, sendo uma alternativa sustentável de cultivo com menor uso de insumos agrícolas. Rizobactérias que incluem espécies como *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcous*, *Pseudomonas*, *Serratia*, entre outras têm sido reportadas por promover o crescimento de plantas (BHATTACHARYYA; JHA, 2012).

Destaca-se ainda que as RPCPs têm obtido crescente aceitação e importância no mundo devido aos efeitos benéficos produzidos em culturas comerciais economicamente relevantes como trigo, arroz, cana-de-açúcar, feijão, milho, soja, algodão. No entanto, um problema relatado com muita frequência nos artigos com RPCPs é a variabilidade dos resultados obtidos, sendo considerada a principal dificuldade para a produção de inoculantes de RPCPs comercialmente viáveis.

O exemplo mais estudado e convertido em produtos globalmente é o do *Azospirillum* (HUNGRIA; MEGÍAS, 2013). Muitos estudos têm demonstrado que *Azospirillum* estimula o crescimento e a produtividade de várias espécies de plantas, sendo muitas delas com grande relevância agrônômica e ecológica (HUNGRIA, 2011). Em uma revisão de trabalhos conduzidos por duas décadas com *A. brasilense* e *A. lipoferum*, Okon e Labandera-Gonzalez (1994) verificaram uma taxa de sucesso de 60 a 70% dos ensaios, com incrementos de 5 a 30%, estatisticamente significativos, no rendimento de grãos. Outro exemplo inclui estudos na Argentina, onde na análise de 273 ensaios com trigo (*Triticum aestivum*), houve resposta positiva em 76% dos casos; no caso do milho (*Zea mays*), na análise de 110 ensaios, 85% foram positivos (DÍAZ-ZORITA; FERNANDEZ CANIGIA, 2008). No Brasil, com reduções de 50% em N-fertilizantes e inoculação com *A. brasilense* foi possível observar ganhos superiores a 4000 kg/ha no rendimento de trigo (HUNGRIA; MEGÍAS, 2013). Os resultados de outros experimentos conduzidos na Argentina e no Brasil nas últimas décadas foram recentemente compilados e a grande



maioria indica benefícios da inoculação com *Azospirillum* no crescimento das plantas e/ou no aumento da produtividade (HUNGRIA, 2011).

Além disso, muitos trabalhos têm demonstrado aumento da eficiência da inoculação consorciada de bactérias endofíticas e RPCP com bioinoculantes já utilizados comercialmente. Araújo et al. (2009), estudando os efeitos da coinoculação entre *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium* sp. em *Vigna unguiculata*, observaram que esta associação favoreceu o aumento da nodulação, conseqüentemente houve incremento na fixação biológica de nitrogênio, revertendo num melhor desenvolvimento da leguminosa. O efeito benéfico da coinoculação entre *A. brasiliense* e *Bradyrhizobium* sp., observado por Ferlini (2006), se deve, em maior parte, à capacidade que a *A. brasiliense* tem de produzir fitormônios. Isto determina maior desenvolvimento do sistema radicular e, portanto, a possibilidade de explorar um volume mais amplo de solo.

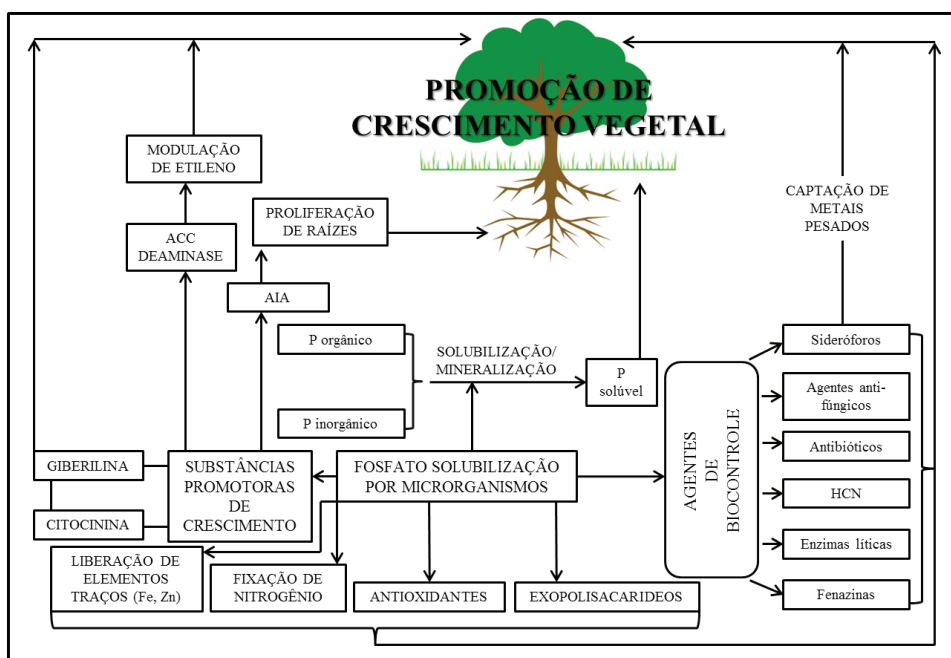
Chebotar, Assis e Akao (2001) estudaram os efeitos da coinoculação de soja com *B. japonicum* A1017 e as linhagens *Pseudomonas fluorescens* 2137, *P. fluorescens* WCS365, *Azomonas agilis* 125 e *Azospirillum lipoferum*. Todas as rizobactérias foram capazes de colonizar as raízes de soja. Entretanto, segundo os autores, a coinoculação de *P. fluorescens* 2137 e *B. japonicum* A1017 claramente aumentou as raízes de soja por *B. japonicum* A1017, aumentando o número de nódulos, bem como a atividade da nitrogenase do rizóbio utilizado.

Como exemplo de fungos promotores de crescimento vegetal, podemos citar o fungo *Piriformospora indica*, conhecido por promover o crescimento de diferentes plantas, nas quais o mesmo foi encontrado colonizando endofiticamente as raízes. Na interação do fungo *Curvularia protuberata* com a planta *Dichanthelium lanuginosum*, nem a planta nem o fungo, quando crescidos isoladamente, toleram temperaturas acima de 40°C, entretanto quando crescidos interagindo simbioticamente, ambos são capazes de tolerar temperaturas próximas a 65°C (MÁRQUEZ et al., 2007).

## 5.5 Mecanismos de promoção de crescimento vegetal por micro-organismos

Fungos e bactérias promotores de crescimento vegetal estimulam o crescimento da planta por meio de efeitos biofertilizantes e bioestimulantes, aumentam a resistência a doenças e melhoram a habilidade da planta de resistir aos estresses (QUECINE, BATISTA; LACAVA, 2014).

Os mecanismos envolvidos na promoção de crescimento vegetal podem ser os mais diversos possíveis e ainda não são amplamente compreendidos (Figura 3). Dentre os mecanismos melhor estudados e explorados há o estímulo do crescimento das plantas por meio de mecanismos diretos com destaque para a fixação biológica de nitrogênio, a solubilização de fósforo, a produção de substâncias ou metabólitos análogos a hormônios como auxinas e sideróforos e, por mecanismos indiretos, como o antagonismo contra fitopatógenos. O estudo das interações micro-organismos-planta visando melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na promoção de crescimento vegetal permite a exploração para o aumento na produtividade agrícola e industrial, além de melhor entendimento da ecologia microbiana e ambiental.



**Figura 3** - Mecanismos envolvidos na promoção de crescimento vegetal mediado por micro-organismos

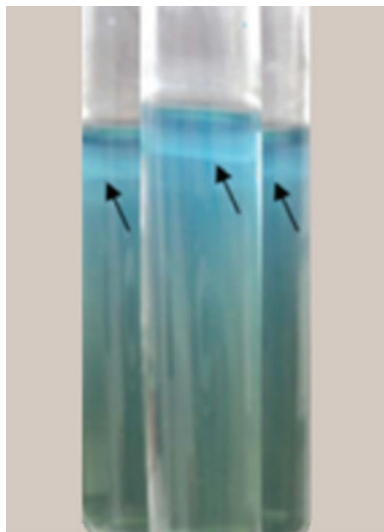
Fonte: Sharma et al. (2013).

## 5.6 Fixação biológica de nitrogênio

O nitrogênio, depois do C, H e O é o elemento mais demandado pelos vegetais, sendo o elemento mais abundante do planeta. Esse elemento é utilizado na síntese de proteínas vegetais e ácidos nucleicos, incluindo o DNA, no entanto, apesar de 78%

do ar atmosférico ser constituído por nitrogênio livre na forma de gás ( $N_2$ ), a maioria dos seres vivos é incapaz de aproveitá-lo no seu metabolismo nessa forma. Assim, as principais fontes de nitrogênio para a planta são os materiais de origem vegetal e animal no solo (matéria orgânica), fertilizantes industriais, sais de amônio e nitrato trazidos da atmosfera pelas chuvas e o mecanismo de fixação biológica de nitrogênio (MUNEES; KIBRET, 2014).

Na natureza, somente um pequeno número de bactérias, denominados diazotróficos ou fixadores de nitrogênio, é capaz de reduzir nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ) a amônia ( $NH_3$ ) (Figura 4) em um processo biológico denominado de fixação biológica de nitrogênio (FBN). Essa reação é catalisada pela enzima nitrogenase que é encontrada em todos os organismos diazotróficos. As bactérias fixadoras de nitrogênio conseguem quebrar a tripla ligação do  $N_2$  por meio da adição de um complexo enzimático denominado dinitrogenase. Deste modo, são incorporados íons  $H^+$  abundantes nas células das bactérias a esta amônia, ocorrendo a transformação em íons  $NH_4^+$  que serão distribuídos para a planta e incorporados na forma de nitrogênio orgânico. A utilização das bactérias diazotróficas pode representar grande estratégia para reduzir a dependência de fertilizantes nitrogenados sintéticos, e pode suprir parcialmente as necessidades de N requeridas por diversas culturas reduzindo, dessa forma, o uso de fertilizantes nitrogenados com consequente diminuição de custos para o produtor e da poluição ambiental (MOREIRA et al., 2010).



**Figura 4** - Fixação de nitrogênio observada pela formação da película em meio NFb semissólido inoculado com o isolado endofítico bacteriano. As setas indicam a formação da película.

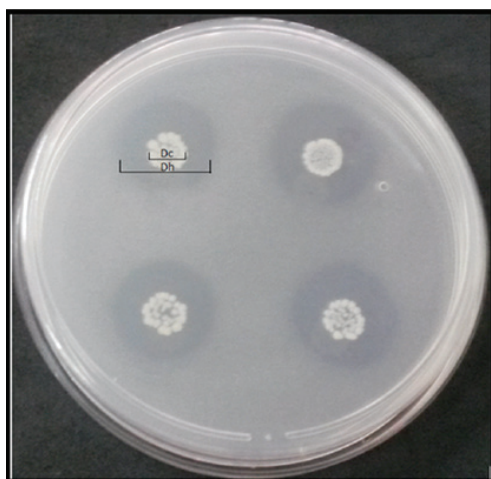
Fonte: Os autores.

## 5.7 Solubilização de fosfato

O fósforo é um elemento essencial para o estabelecimento e desenvolvimento das plantas, pois melhora todo o sistema radicular e, conseqüentemente, a parte aérea. Os solos são ricos em fósforo, tanto nas formas orgânicas como inorgânicas, porém, apenas uma pequena parte encontra-se disponível às plantas. A utilização de processos microbiológicos visa aperfeiçoar o aproveitamento do fosfato e está entre as possíveis medidas para evitar a deficiência nutricional de fósforo, cuja maior reserva mineral ocorre nas rochas em uma forma não disponível para as plantas (LACAVA; AZEVEDO, 2013).

Os micro-organismos solubilizadores de fosfato participam do ciclo do fósforo e facilitam a conversão de formas insolúveis para solúveis, tornando esse elemento disponível para a planta (Figura 5). Nesse sentido, a utilização de micro-organismos solubilizadores de fósforo é uma alternativa viável ao uso da adubação convencional para o melhor aproveitamento do fósforo já existente no solo (QUECINE; BATISTA; LACAVA, 2014).

Destaca-se que, além das micorrizas, vários fungos endofíticos são ótimos solubilizadores de fosfato, desempenhando um papel vital no ciclo desse elemento. Dentre os gêneros solubilizadores de fosfato encontram-se representantes dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (WHITELAW, 1999).



**Figura 5** - Representação do diâmetro dos halos indicadores de solubilização (Dh) e do diâmetro da colônia (Dc), em meio contendo fosfato de cálcio insolúvel, formados por isolado bacteriano positivo.

Fonte: Os autores.

## 5.8 Produção de ácido indol acético

O termo ‘regulador de crescimento’ é normalmente empregado para compostos naturais (fito-hormônios e substâncias naturais de crescimento) ou sintéticos (hormônio sintético e regulador sintético) que exibem atividade no controle do crescimento e desenvolvimento da planta. O conhecimento dos hormônios promotores de crescimento vegetal é de extrema importância, pois favorecem o crescimento ou alteram mecanismos fisiológicos vegetais beneficiando a colonização da planta hospedeira por alguns micro-organismos em detrimento de outros. (LACAVAL; AZEVEDO, 2013).

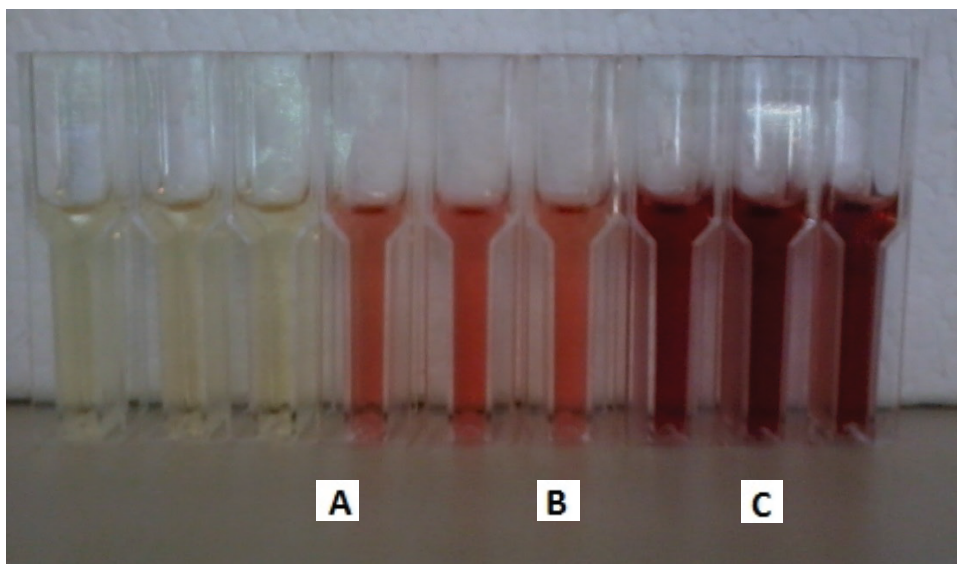
Os hormônios vegetais (auxinas, citocininas, giberelinas etileno e ácido abscísico) são substâncias orgânicas que desempenham funções na regulação do crescimento em plantas. Micro-organismos são capazes de produzir metabólitos secundários, que possuem substâncias também capazes de promover o desenvolvimento vegetal. Dentre esses metabólitos secundários, destaca-se a produção de análogos de fito-hormônios, como auxinas, citocinas e giberelinas.

As auxinas, do grego ‘crescer’, são uma classe de fito-hormônios que pode ser produzida por plantas em ápices foliares, meristemas, frutos e sementes em desenvolvimento, bactérias e fungos. O ácido indol acético (AIA), principal auxina encontrada em baixas concentrações nas plantas, é capaz de atuar na expansão e no alongamento celular, ajudando também na divisão celular em cultura de tecidos, principalmente no enraizamento. Entretanto, altas concentrações de hormônios podem causar a inibição da elongação celular afetando o desenvolvimento das raízes em algumas culturas.

A habilidade de sintetizar auxinas é amplamente distribuída entre bactérias associadas com plantas (ETESAMI; ALIKHANI; HOSSEINI, 2015). A produção microbiana de AIA é, em muitos casos, dependente do aminoácido triptofano e realizada em diversas vias biossintéticas (Figura 6).

Diversas bactérias produtoras de AIA associadas às plantas produtoras de AIA relacionadas ao estímulo de crescimento vegetal têm sido descritas, tais como *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Kocuria* sp., *Pantoea*, *Pseudomonas*, e *Xantomonas* (LACAVAL; AZEVEDO, 2013).

Fito-hormônios como auxina e giberelina também são produzidos por fungos endofíticos como exemplo, os isolados do gênero *Phoma* e *Penicillium*.



**Figura 6** - Teste em triplicata de produção de Ácido Indol Acético (AIA) de 3 diferentes isolados – (A) Sem produção de AIA. (B) Média produção de AIA. (C) Alta produção de AIA.

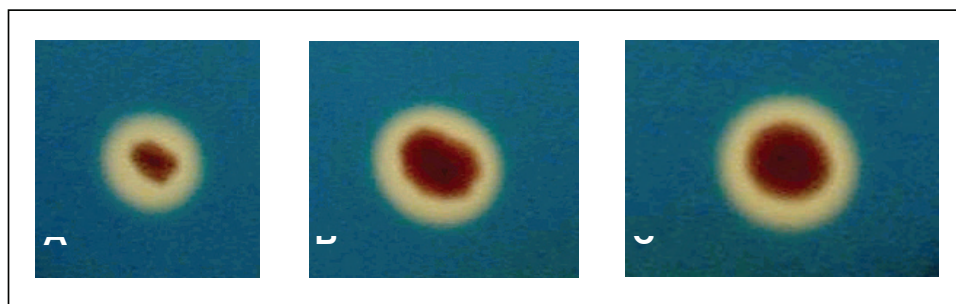
Fonte: Os autores.

## 5.9 Produção de sideróforos

Para satisfazer as exigências nutricionais de ferro, micro-organismos evoluíram vias altamente específicas que empregam quelantes de ferro de baixo peso molecular, denominados sideróforos. Os sideróforos microbianos são secretados para solubilizar ferro de seu ambiente circundante (Figura 7), formando um complexo ferro-sideróforo que pode mover-se por difusão e ser devolvido à superfície da célula (ANDREWS; ROBINSON; RODRÍGUEZ-QUIÑONES, 2003) ficando então, o ferro disponível para o desenvolvimento bacteriano. Essa ligação ferro-sideróforo impede a proliferação de patógenos, pelo sequestro do ferro do meio ambiente, assim esses compostos atuam como promotores indiretos de crescimento pela capacidade de prevenir a proliferação desses fitopatógenos no ambiente rizosférico. Há muito tempo já se comprovou que isolados do grupo fluorescente do gênero *Pseudomonas* podem promover o crescimento vegetal por privar de ferro potenciais fitopatógenos (KLOPPER et al., 1980).

A atividade de produção de sideróforos desempenha também um papel central na capacidade de diferentes micro-organismos em melhorar o desenvolvimento das plantas. Ao contrário dos fitopatógenos microbianos, as plantas não são prejudicadas

com a depleção de ferro por micro-organismos endofíticos e RPCPs. Algumas plantas podem capturar o complexo ferro-sideróforo microbiano, transportando-o para dentro de suas células, onde o ferro é liberado do sideróforo e fica disponível para a planta (DIMKPA et al., 2008). Na variedade de micro-organismos conhecidos que sintetizam sideróforos estão incluídas bactérias dos gêneros *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Micobacterium* e *Pseudomonas* (BENITE; MACHADO, 2002).



**Figura 7** - Detalhes da mudança de cor e formação de halo utilizando o método CAS-ágar para detecção de sideróforos em isolados de *Methylobacterium* endofítico de citros. A) isolado AR5.1/6; B) isolado AR5.1/5, C) isolado AR1.6/2.

Fonte: Os autores.

## 5.10 Controle biológico de fitopatógenos e insetos-pragas

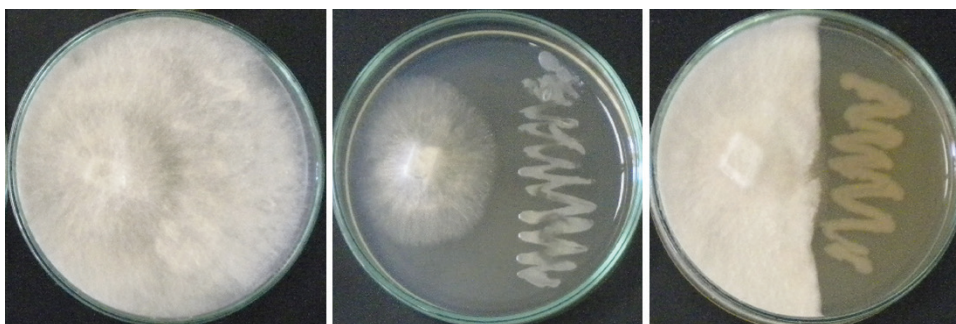
O controle natural e biológico de pragas e doenças que afetam plantas cultivadas ganhou muita atenção nas últimas décadas como uma forma de reduzir o uso de pesticidas na agricultura. O biocontrole tem sido frequentemente utilizado em países tropicais, como o Brasil, e é apoiado pelo desenvolvimento de pesquisa básica e aplicada no local. Neste contexto, os endófitos e rizobactérias tropicais têm atraído atenção especial para desenvolver suas funções no controle de doenças causadas por fungos fitopatogênicos e insetos-praga (LACAVA; AZEVEDO, 2014).

Os micro-organismos endofíticos colonizam um nicho ecológico semelhante àquele ocupado por fitopatógenos, o que permite seu uso como agentes de controle biológico de doenças (HALLMANN et al., 1997).

A ação de micro-organismos endofíticos e rizobactérias com potencial de biocontrole pode ser direta ou indireta. A ação direta inclui a interação entre o agente de biocontrole e o agente fitopatogênico, com consequente inibição do último. O biocontrole pode ser classificado em quatro categorias: (1) antibiose, (2) competição

por espaço e nutrientes, (3) parasitismo e (4) por indução de resistência sistêmica. A ação indireta de biocontrole pode ser a simples ocupação de espaço por um endófito no interior de uma planta hospedeira que impede que um fitopatógeno se estabeleça (GRIFFIN, 2014).

O biocontrole por antibiose se dá por meio da produção de antibióticos por micro-organismos endofíticos, mas também se aplica a qualquer composto metabolizado capaz de matar ou inibir o crescimento ou a reprodução de micro-organismos fitopatogênicos, tais como a produção de enzimas que degradam sua parede celular (GRIFFIN, 2014) (Figura 8).



**Figura 8** - Antagonismo entre bactérias endofíticas e o fungo fitopatogênico *F. verticillioides*. (1) Controle - *F. verticillioides*; (2) Inibição; (3) Inibição.

Fonte: Os autores.

Outro mecanismo envolvido no controle biológico de doenças é por meio da indução de resistência sistêmica (IRS). Neste tipo de controle, a penetração ativa do micro-organismos endofítico induz a planta hospedeira a sintetizar compostos que atuam sobre o patógeno ou alteram a morfologia vegetal. Estas alterações morfológicas e fisiológicas podem incluir aumento da parede celular por deposição de lignina e glucanas e aumento da espessura da cutícula, bem como a síntese de fitoalexinas, dificultando a entrada do patógeno e o seu desenvolvimento na planta hospedeira.

Algumas espécies de fungos endofíticos, como *Fusarium oxysporum*, apresentam linhagens não patogênicas que possuem efeito supressivo nas linhagens patogênicas (FRAVEL; OLIVAIN; ALABOUVETTE, 2003), provavelmente em função da competição por carbono, espaço e sítios de infecção. Aliás, uma grande variedade de espécies fúngicas é capaz de atuar como agente de controle biológico de fitopatógenos, sendo que fungos do gênero *Trichoderma* apresentam grande destaque nessa função (WHIPPS; LUMSDEN, 2001). Inclusive, *Trichoderma* spp. exibem outras formas de contribuir com o desenvolvimento e saúde da planta, pois também são capazes de promover



crescimento vegetal, induzir respostas de defesa e atuar como biorremediadores (HARMAN, 2006).

## 5.11 Conclusões

Existem provas contundentes na literatura que indicam que o uso de rizobactérias e micro-organismos endofíticos promotores de crescimento vegetal apresentam o potencial de serem histórias de sucesso na agricultura sustentável. De fato, por meio de seus numerosos mecanismos de ação, sejam eles diretos ou indiretos, que levam aos seus efeitos benéficos de promoção de crescimento de plantas, aumentos de rendimento e qualidade nas culturas e controle biológico de doenças e pragas, esses micro-organismos têm o potencial de reduzir significativamente a utilização de fertilizantes, pesticidas químicos e reguladores de crescimento artificiais.

Mais pesquisas visando compreender os mecanismos de ação desses micro-organismos podem abrir caminho para a descoberta de cepas e formulações mais eficientes, capazes de funcionar em diversificadas condições agroecológicas. O avanço do conhecimento nessa área é claramente muito promissor e provavelmente terá impactos econômicos e ambientais significativos no futuro à medida que for se transformando em produtos ou serviços para os agricultores e para a sociedade.

## Referências

ANDREWS, S. C.; ROBINSON, A. K.; RODRÍGUEZ-QUIÑONES, F. Bacterial iron homeostasis. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 27, no. 2-3, p. 215-237, 2003.

ARAÚJO, A. S. F. et al. Coinoculação rizóbio e *Bacillus subtilis* em feijão-caupi e leucena: efeito sobre a nodulação, a fixação de N<sub>2</sub> e o crescimento das plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, no. 1, p. 182-185, 2009.

ARAÚJO, W. L. et al. **Micro-organismos endofíticos**: aspectos teóricos e práticos de isolamento e caracterização. 1. ed. Santarém: Ufopa, 2014. v. 1.

AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. **Journal of King Saud University - Science**, Riyadh, v. 26, no. 1, p. 1-20, 2014.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B. N.; DESHMUKH, S. K. (Ed.). **Fungi: multifaceted microbes**. Boca Raton: CRC, 2007. p. 189-207.

BATISTA, B. D. **Promoção de crescimento em milho (*Zea mays* L.) por rizobactérias associadas à cultura do guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*)**. 2012. 44 f. Dissertação (Mestrado)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2012.

BENITE, A. M. C.; MACHADO, S. P. Sideróforos: uma resposta dos microorganismos. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6b, p. 1155-1164, 2002.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 28, no. 4, p. 1327-1350, 2012.

CHEBOTAR, V. K.; ASSIS, C. A.; AKAO, S. Production of growth-promoting substances and high colonization ability of rhizobacteria enhance the nitrogen fixation of soybean when coinoculated with *Bradyrhizobium japonicum*. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 34, no. 6, p. 427-432, 2001.

CHELIUS, M. K.; TRIPLETT, E. W. Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumoniae* in association with *Zea mays* L. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D.C., v. 66, no. 2, p. 783-787, 2000.

DE BARY, A. **Morphologie und physiologie der pilze, flechten, und myxomyceten. hofmeister's handbook of physiological botany**. Engelmann: Leipzig, 1866. v. 2,

DÍAZ-ZORITA, M.; FERNANDEZ CANIGIA, M. V. Analisis de la producción de cereales inoculados con *Azospirillum brasilense* en la República Argentina. In: CASSÁN, F. D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.). **Azospirillum sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p. 155-166.

DIMKPA, C. et al. Hydroxamate siderophores produced by *Streptomyces acidiscabies* E13 bind nickel and promote growth in cowpea (*Vigna unguiculata* L.) under nickel stress. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 54, no. 3, p. 163-172, 2008.

ESTRADA, P. et al. A N<sub>2</sub>-fixing endophytic *Burkholderia* sp. associated with maize plants cultivated in Mexico. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 48, no. 4, p. 285-294, 2002.

ETESAMI, H.; ALIKHANI, H. A.; HOSSEINI, H. M. Indole-3-acetic acid (IAA) production trait, a useful screening to select endophytic and rhizosphere competent bacteria for rice growth promoting agents. **Methods X**, Amsterdam, v. 2, p. 72-78, 2015.

FERLINI, H. A. Co-Inoculación en Soja (*Glycine max*) con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense*. 2006. Disponível em: <[http://www.engormix.com/co\\_inoculacion\\_soja\\_glycine\\_s\\_articulos\\_800\\_AGR.htm](http://www.engormix.com/co_inoculacion_soja_glycine_s_articulos_800_AGR.htm)>. Acesso em: 12 jun. 2012.

FRAVEL, D.; OLIVAIN, C.; ALABOUVETTE, C. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. **New Phytologist**, Cambridge, v. 157, no. 3, p. 493-502, 2003.

GHEVARIYA, K. K.; DESAI, P. B. Rhizobacteria of sugarcane: in vitro screening for their plant Growth Promoting potentials. **Research Journal of Recent Sciences**, Indore v. 3, p. 52-58, 2014.

GRIFFIN, M. R. Biocontrol and bioremediation: two areas of endophytic research which hold great promise. In: VERMA, V. C.; GANGE A. C. (Ed.). **Advances in Endophytic Research**. [S.L]: Springer-Verlag, 2014. p. 231-256.

HALLMANN, J. et al. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, no. 10, p. 895-914, 1997.

HARMAN, G. E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, St. Paul, v. 96, no. 2, p. 190-194, 2006.

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

HUNGRIA, M.; MEGÍAS, M. Uma década de ouro se aproxima para a microbiologia do solo: expectativas da pesquisa, da indústria, dos agricultores e da sociedade. In: IBEROAMERICAN CONFERENCE ON BENEFICIAL PLANT - MICROORGANISM -

ENVIRONMENT INTERACTIONS, 2.; NATIONAL MEETING OF THE SPANISH SOCIETY OF NITROGEN FIXATION, 14.; LATIN AMERICAN MEETING ON RHIZO BIOLOGY, 26.; SPANISH-PORTUGUESE CONGRESS ON NITROGEN FIXATION, 3., 2013, Sevilla.

**Proceedings...** Sevilla: Universidad de Sevilla, 2013. p. 510-517.

KLOEPPER, J. W. et al. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth rhizobacteria. **Nature**, London, v. 286, no. 5776, p. 885-886, 1980.

KLOEPPER, J. W.; SCHROTH, M. Plant growth promoting Rhizobacteria on rashes. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 4., 1978, Angers.

**Proceedings...** Angers: Gilbert-Clarey, 1978. v. 2, p. 879-882.

LACAVAL, P. T.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L. Evaluation of endophytic colonization of *Citrus sinensis* and *Catharanthus roseus* seedlings by endophytic bacteria. **Journal of Microbiology**, London, v. 45, no. 1, p.11-14, 2007.

LACAVAL, P. T.; AZEVEDO, J. L. Biological Control of Insect-Pest and Diseases by Endophytes. In: VERMA, V. C.; GANGE, A. C. (Org.). **Advances in endophytic research**. 1<sup>st</sup> ed. New Delhi: Springer-Verlag, 2014. p. 231-243.

LACAVAL, P. T.; AZEVEDO, J. L. Endophytic bacteria: a biotechnological potential in agrobiological system. In: MAHESHWARI, D. K.; SARAH, M.; AERON, A. (Ed.). **Bacteria in agrobiological**: crop productivity. New Delhi: Springer-Verlag, 2013. p. 1-44.

LUVIZOTTO, D. M. et al. Genetic diversity and plant-growth related features of *Burkholderia* spp. from sugarcane roots. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Berlin, v. 26, no. 10, p. 1829-1836, 2010.

MADHAIYAN, M. et al. Regulation of ethylene levels in canola (*Brassica campestris*) by 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase-containing *Methylobacterium fujisawaense*. **Planta**, Berlin, v. 224, no. 2, p. 268-278, 2006.

MÁRQUEZ, L. M. et al. A virus in a fungus in a plant-three way symbiosis required for thermal tolerance. **Science**, v. 315, no. 5811, p. 513-515, 2007.

MENDES, R.; AZEVEDO, J. L. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 5., 2007, Recife. **Abstract...** Recife: UFPE, 2007. p. 129-140.

MOREIRA, F. M. S. et al. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, Piauí, v. 1, n. 2, p. 74-99, 2010.

MUNEES, A.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. **Journal of King Saud University - Science**, Riyadh, v. 26, no. 1, p. 1-20, 2014.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C. A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology & Biochemistry**, San Diego, v. 26, no. 12, p. 1591-1601, 1994.

QUECINE, M. C.; BATISTA, B. D.; LACAVA, P. T. Diversity and biotechnological potential of plant-associated endophytic bacteria. In: KUMAR, A. P.; OVIL, J. N. (Org.). **Biotechnology**. 1st ed. Houston: Studium Press, 2014. v. 2, p. 377-423.

RODRIGUEZ, R. et al. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytologist**, London, v. 182, no. 2, p. 314-330, 2009.

ROSENBLUETH, M.; MARTINEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant Microbe Interaction**, New York v. 19, no. 8, p. 827-837, 2006.

SHARMA, S. B. et al. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **Springer Plus**, New York, v. 2, no. 1, p. 587, 2013.

SIEBER, T. N. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? **Fungal Biology Reviews**, Amsterdam, v. 21, no. 2-3, p. 75-89, 2007.

SY, A. et al. Certaines légumineuses du genre *Crotalaria* sont spécifiquement nodulées par une nouvelle espèce de *Methylobacterium*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, no. 6, p. 503-508, 2001.

WHIPPS, J. M.; LUMSDEN, R. D. Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: status and prospects. In: BUTT, T. M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. (Ed.). **Fungal biocontrol agents: progress, problems and potential**. Wallingford: CABI, 2001. p. 9-22.

WHITELAW, M. A. Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Advances in Agronomy*, Amsterdam, v. 69, p. 99-151, 1999.

# Fixação biológica de nitrogênio: fundamentos e aplicações

---

Fábio Bueno dos Reis Junior, Lêda de Carvalho Mendes, Mariangela Hungria

## 6.1 Introdução

O nitrogênio (N) é um elemento essencial para a vida de todos os organismos terrestres, pois está presente nos aminoácidos, nas proteínas, nas moléculas de DNA e RNA, além de outras estruturas celulares.

O N não é considerado um elemento raro, já que o gás  $N_2$  representa 78% do ar atmosférico. No entanto, devido à estabilidade da tripla ligação entre os dois átomos de N, nessa forma, esse elemento é inacessível à grande maioria dos organismos. Um grupo de procaríotos, bactérias e arqueas, porém, possui a capacidade converter o  $N_2$  em amônia ( $NH_3$ ), por meio de um aparato enzimático conhecido como nitrogenase. Essa conversão do  $N_2$  a  $NH_3$  é denominada de fixação biológica de nitrogênio (FBN) e os organismos envolvidos nesse processo são conhecidos como diazotróficos (di = dois, azoto = nitrogênio, tróficos = consumidores) ou fixadores de nitrogênio. Imediatamente a amônia formada recebe íons hidrogênio, sendo transformada em amônio ( $NH_4^+$ ), sendo então exportada das células, podendo ser transformada em outros compostos nitrogenados; em diversos casos, esses compostos são disponibilizados para plantas que se associam a esses micro-organismos.

A FBN é responsável por mais de 97% de todo o 'novo' N introduzido nos ecossistemas naturais. Se considerarmos toda a biosfera, englobando sistemas naturais e sistemas agrícolas, a FBN contribui com cerca de 65% do total de N introduzido no planeta. O N limita a produção primária em ecossistemas terrestres e dentre os nutrientes minerais essenciais é, em geral, o mais limitante à produção vegetal. Por isso, a FBN pode ser considerada, após a fotossíntese, o processo biológico mais importante do planeta.

Na agricultura, principalmente nos solos tropicais, pobres em N, a contínua adição desse nutriente é necessária para manter a fertilidade dos solos e a nutrição e produtividade das plantas. A grande demanda atual por alimentos, associada à limitada

disponibilidade de N e à alta dependência das culturas por esse elemento estimularam mundialmente o crescimento da indústria de fertilizantes nitrogenados, dobrando o fluxo de nitrogênio no ciclo terrestre. Tal perturbação é insustentável e resulta em consequências para o meio ambiente, incluindo a produção de potentes gases de efeito estufa e a eutrofização de sistemas aquáticos. Dessa maneira, pode-se afirmar que a FBN representa a via mais barata e ambientalmente correta de fornecimento de N para as plantas. Se a associação entre estes micro-organismos diazotróficos e as plantas for eficiente, o N fixado pode suprir quase todas as necessidades de diversas espécies de importância econômica e ambiental, dispensando o uso de fertilizantes nitrogenados. A fórmula para se alcançar a crescente demanda global por alimentos, fibras e bioenergia passam, necessariamente, pelo uso eficiente de recursos, sendo a chave para a sustentabilidade do setor agropecuário. A FBN, sem sombra de dúvidas, é parte importante dessa equação.

## 6.2 Organismos fixadores de nitrogênio

Apesar de ocorrerem vários tipos de associações e interações entre organismos diazotróficos e seus hospedeiros, de maneira geral, pode-se considerar que a FBN ocorre por meio de duas vias principais, a simbiótica e a de vida livre. Geralmente, a FBN simbiótica é relacionada com a associação mutualística entre plantas e seus microsimbiontes diazotróficos, que ocupam nódulos formados, principalmente, nas raízes do hospedeiro e na grande maioria de casos com leguminosas. No entanto, também existem outras interações simbióticas, que podem ocorrer entre os micro-organismos diazotróficos e uma diversidade de parceiros eucarióticos, como animais, fungos e protistas. O restante, incluindo aqui a FBN realizada por bactérias epífitas (localizadas na superfície da parte aérea de plantas), endofíticas (localizadas no interior de plantas), por bactérias associadas à rizosfera das plantas, ou mesmo não associadas a plantas, pode ser considerado de vida livre.

Os procariotos fixadores de nitrogênio são praticamente ubíquos nos ecossistemas terrestres, habitam uma ampla variedade de ambientes, desde solos, plantas, mares e oceanos, até o sistema digestivo de alguns insetos e mamíferos. Esses micro-organismos podem ser autotróficos, heterotróficos, quimiolitotróficos, foto-heterotróficos e metanogênicos. Eles são representados tanto por aeróbios obrigatórios, quanto por anaeróbios facultativos ou obrigatórios. Essa grande diversidade metabólica é a principal responsável pela miríade de ambientes que podem ser ocupados por esses micro-organismos. A lista conhecida de diazotróficos ainda está longe de ser considerada completa e novas técnicas que envolvem a utilização de ferramentas da biologia

molecular têm identificado novos táxons a cada dia, também acessando informações sobre a porção ainda não cultivada da microbiota. As nitrogenases de arqueas e bactérias são relacionadas filogeneticamente e, supostamente, o último ancestral comum entre esses dois domínios era um organismo diazotrófico. Outra hipótese é de que a FBN tenha sua origem em arqueas metanogênicas e, posteriormente, foi transferida dessas para as bactérias. Nesse capítulo será dada ênfase à FBN associada aos vegetais.

### 6.3 A nitrogenase

A reação da FBN, governada pela nitrogenase, pode ser representada pela equação  $N_2 + 8H^+ + 6e^- \rightarrow 2NH_3 + H_2$  e é acoplada à hidrólise de 16 equivalentes de ATP. Esse é um dos processos de maior custo metabólico conhecido, o que é traduzido pela alta demanda por ATP e poder redutor. Além disso, o hidrogênio molecular ( $H_2$ ) obrigatoriamente produzido nessa reação resulta em perda de energia e elétrons. Algumas bactérias diazotróficas, porém, possuem uma segunda enzima, a hidrogenase, capaz de oxidar o  $H_2$ , produzindo ATP e recuperando parte dessa energia perdida durante a FBN.

Na maioria dos diazotróficos, as nitrogenases, classificadas como metaloproteínas, contêm duas unidades, a dinitrogenase redutase (ferro (Fe)-proteína) e a dinitrogenase (molibdênio (Mo)-Fe-proteína). Essas unidades interagem durante a FBN, com a Fe-proteína sendo responsável pela transferência de elétrons para a redução do  $N_2$  e a Mo-Fe-proteína apresentando o sítio ativo da reação. Contudo, existem também diazotróficos que possuem nitrogenases alternativas, como aquelas onde o vanádio (V) substitui o Mo. Essa alternativa pode ser vantajosa em condições onde o Mo é limitante.

Pelo menos 20 genes e seus produtos são necessários para a síntese completa e funcional do aparato enzimático responsável pela FBN. Esses genes envolvidos na síntese da nitrogenase são conhecidos coletivamente como genes *nif*. Os genes acessórios *fix* também são necessários para o funcionamento e regulação da nitrogenase em bactérias diazotróficas microaeróbias e aeróbias.

De maneira geral, a nitrogenase é extremamente sensível ao  $O_2$ , sendo desnaturada irreversivelmente na presença desse gás. Desse modo, vários mecanismos de proteção foram desenvolvidos. Como exemplos, podem-se citar o isolamento da FBN em locais onde a concentração de  $O_2$  é mantida baixa, usando componentes celulares; a separação da FBN, no tempo, de processos que resultam em evolução de  $O_2$ , como a fotossíntese; o incremento da respiração para manter níveis mínimos de  $O_2$ ;



entre outros. Esses mecanismos de proteção serão citados especificamente para cada sistema fixador apresentado nesse capítulo.

## 6.4 Regulação da FBN

A FBN pode ser afetada por diferentes fatores bióticos e abióticos, como a disponibilidade de N reativo, a limitação de recursos (energia e nutrientes), extremos de temperatura, condições de seca ou alagamento, pH etc. Como a maquinaria genética e bioquímica que realiza FBN é altamente conservada em toda a ampla gama de micro-organismos diazotróficos, as condições ambientais e fisiológicas que poderiam controlar a FBN tendem a ser semelhantes entre os distintos táxons.

Em razão da FBN ter elevado custo energético, os micro-organismos (particularmente bactérias) diazotróficos e as plantas associadas a essas bactérias geralmente paralisam o processo na presença de formas reativas de N. Diferentes mecanismos têm sido identificados associados a essa paralisação, como a inibição da atividade da nitrogenase e a repressão da expressão dos genes *nif* em resposta à presença de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ , e/ou N na forma de aminoácidos. Nas associações simbióticas entre rizóbios e leguminosas, a nodulação pode ser drasticamente afetada pela presença de N reativo no solo. As leguminosas desenvolveram um mecanismo para detectar compostos nitrogenados no solo, tais como nitrato e amônio, o que lhes permite reduzir a nodulação quando essas fontes de nitrogênio estão disponíveis em grande quantidade. De maneira geral, a FBN é estimulada quando existe disponibilidade de carbono (C) e escassez de N no ambiente.

A disponibilidade de outros nutrientes também é importante para a FBN. O fósforo (P) é relatado como um dos nutrientes mais limitantes à FBN, particularmente pela alta demanda do processo por ATP. Como observado em diversos estudos, à fertilização com P estimula a FBN. Assim como no caso do P, a deficiência de Mo também limita a FBN. Aparentemente, a Mo-nitrogenase é a mais eficiente em termos de FBN e quando o Mo não está disponível os diazotróficos utilizam nitrogenases alternativas, menos efetivas.

A FBN é mais elevada nos biomas mais quentes e, em geral, incrementos na disponibilidade de água resultam em incrementos nas taxas de fixação do  $\text{N}_2$ . Pequenas alterações na umidade dos substratos podem apresentar grandes efeitos sobre esse processo biológico, principalmente em ambientes mais secos. Contudo, o alagamento também prejudica a FBN, pois, em muitos sistemas fixadores deve haver  $\text{O}_2$  disponível

para os micro-organismos aeróbios, que é necessário para a produção de ATP requerido para o processo de fixação do  $N_2$ .

O pH do ambiente tem efeito sobre os organismos diazotróficos e, conseqüentemente, sobre a FBN. Nos solos, os diazotróficos podem ter seu crescimento, sobrevivência e abundância altamente influenciados pelo pH. Em pH baixo, o aumento da concentração e solubilidade de íons metálicos tóxicos alumínio, cobre e manganês ( $Al^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$  e  $Mn^{2+}$ ) representam a principal causa de inibição do crescimento desses organismos.

Vale ressaltar que, no caso das simbioses, a FBN é regulada por ambos os simbioses. Desse modo, se o hospedeiro for limitado por fatores bióticos (ex.: pragas e doenças) ou abióticos (ex.: deficiência de nutrientes, acidez do solo, salinidade, seca etc) o fornecimento de energia (C) para os organismos diazotróficos será afetado e, conseqüentemente, a FBN será limitada.

## 6.5 Simbiose entre rizóbios e leguminosas

Nas interações simbióticas as bactérias fornecem o N reduzido para as plantas, que em contrapartida disponibilizam compostos de carbono para seus microssimbiontes.

Por ser considerada a mais eficiente e por abranger culturas vegetais importantes para a alimentação humana, a FBN, proveniente da simbiose de bactérias diazotróficas com plantas leguminosas, é a mais estudada e, conseqüentemente, a mais conhecida. Dada a sua eficiência, a contribuição da FBN em leguminosas é fundamental para o ciclo global do N e para a recuperação e manutenção da fertilidade do solo.

Os microssimbiontes mais conhecidos nessas interações pertencem à ordem Rhizobiales, incluindo os gêneros *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (*Ensifer*), denominados corriqueiramente como rizóbios. Entretanto, com o incremento nos estudos de filogenia, utilizando técnicas de biologia molecular, diversas outras  $\alpha$ -proteobactérias foram identificadas como microssimbiontes de leguminosas, incluindo estirpes de *Methylobacterium*, *Blastobacter*, *Devosia*, *Phyllobacterium*, *Ochrobactrum*, *Shinella* e *Microvirga*. Além disso, também foram descobertos membros das  $\beta$ -proteobactérias, em especial *Burkholderia* spp. e *Cupriavidus* spp., em simbiose com leguminosas tropicais, que passaram imediatamente a serem conhecidos como os  $\beta$ -rizóbios (MOULIN et al., 2002). Na maior parte dos casos, os  $\beta$ -rizóbios são encontrados em associação com leguminosas da subfamília Mimosoideae. No entanto, novas descobertas sugerem que a interação de leguminosas com essas bactérias parece ser muito mais ampla do que inicialmente

imaginado. *Burkholderia* spp. foram encontradas em simbiose com plantas de gêneros diversos, como *Rhynchosia*, *Podalyria*, *Virgilia*, *Cyclopia* e *Hypocalyptus*. Essas bactérias também já foram isoladas de nódulos de leguminosas de importância agrícola, como o feijoeiro comum e feijão-caupi. Até o momento foram descritas 197 espécies de rizóbios, que são distribuídas em 14 gêneros nas classes Alpha ( $\alpha$ -Proteobacteria) e Betaproteobactéria ( $\beta$ -Proteobacteria) (PEIX et al., 2015).

As bactérias diazotróficas se associam simbioticamente às leguminosas formando estruturas especializadas nas raízes denominadas nódulos (Figura 1), nos quais ocorre o processo de FBN. Nos nódulos, íons hidrogênio ( $H^+$ ), abundantes nas células das bactérias, são incorporados à amônia sintetizada, que é transformada em amônio ( $NH_4^+$ ), que será distribuído para a planta hospedeira e incorporado em diversas formas de N orgânico, como os ureídeos, aminoácidos e amidas.



**Figura 1** - Nódulos nas raízes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). Dentro dos nódulos ocorre o processo de fixação biológica de  $N_2$ , pela ação do complexo enzimático da nitrogenase, responsável pela redução do  $N_2$  atmosférico a amônia.

Fonte: Acervo particular da Dra. Solange Andrade – Embrapa Cerrados.

De maneira geral, a formação dos nódulos requer duas etapas de desenvolvimento, a infecção bacteriana e a organogênese do nódulo. Ambos os processos requerem, inicialmente, uma troca de sinais moleculares entre as plantas e as bactérias. As plantas produzem flavonoides ou compostos relacionados (compostos aromáticos), enquanto os rizóbios sintetizam os fatores de nodulação (fatores Nod), identificados como lipoquitoligossacarídeos, permitindo a interação específica entre os dois parceiros simbiotes. Esses sinais irão induzir a transcrição de genes que levarão à formação do nódulo e, conseqüentemente, à FBN. Os genes de nodulação dos rizóbios são essenciais

para a formação dos nódulos e estão envolvidos na síntese e transporte dos fatores de nodulação. A especificidade hospedeira é baseada nas variações estruturais entre os fatores Nod produzidos por diferentes rizóbios.

Antes de a simbiose ser formada, os rizóbios podem sobreviver de forma saprofítica no solo e na rizosfera das plantas. O reconhecimento dos rizóbios pelas raízes das plantas hospedeiras inicia o processo de formação dos nódulos; em poucos casos os nódulos são formados no caule de algumas espécies. A infecção das raízes pelos rizóbios pode ocorrer via pelos radiculares (ex.: soja, ervilha, trevo, feijão), feridas nas raízes (ex.: amendoim) ou de modo intersticial entre as células da epiderme (ex.: *Sesbania*, *Aeschynomene*).

No modo de infecção mais comum, a adesão das bactérias estimula uma série de alterações morfológicas e fisiológicas no pelo radicular, causando seu encurvamento. O cordão de infecção é uma invaginação do pelo radicular, que segue até o córtex, onde ocorre o aumento de tamanho e a divisão celular, levando ao início da formação do nódulo. No ponto de contato com as células corticais há uma degradação da parede celular e os rizóbios são liberados no interior dos nódulos. A fonte de enzimas para essa degradação da parede celular pode ser originada das plantas, das bactérias ou, possivelmente, de ambos os organismos.

Dentro dos nódulos os rizóbios se diferenciam em bacteroides e são envolvidos por uma membrana produzida pela planta, conhecida como membrana peribacteroide, formando o simbiossoma. Assim, as bactérias permanecem separadas do citoplasma celular do hospedeiro. Com os nódulos formados os feixes vasculares da planta são estendidos até eles para permitirem a troca de nutrientes. Após a formação do simbiossoma, o rizóbio fixa o nitrogênio que é fornecido à planta recebendo, em troca, compostos ricos em carbono, aminoácidos e vitaminas.

Os nódulos radiculares diferem em aparência e estrutura, dependendo da espécie hospedeira. Algumas leguminosas desenvolvem nódulos de crescimento determinado que são, geralmente, esféricos e não possuem meristema ativo (ex.: soja, feijão). Outras espécies possuem nódulos de crescimento indeterminado, com formato cilíndrico e meristemas ativos, o que permite o crescimento e a produção de novas células corticais em resposta ao crescimento da planta (ex.: alfafa, trevo).

Os nódulos têm sua estrutura e função voltadas para fornecerem um ambiente microaeróbio para a FBN. Uma baixa concentração de  $O_2$  dentro do nódulo é essencial, devido à sensibilidade da nitrogenase a esse gás, mas, ao mesmo tempo, os rizóbios são aeróbios obrigatórios e necessitam de  $O_2$ . Esse problema é solucionado com a produção, pelas células corticais infectadas das plantas, de uma proteína carreadora, conhecida como leghemoglobina, que permite a transferência de  $O_2$  para as bactérias nas concentrações adequadas. Os rizóbios em simbiose desenvolvem alto grau de

dependência da planta em muitos aspectos de seu metabolismo, que de certa forma é análogo ao de uma organela.

É interessante notar que, mesmo sendo considerado um ambiente mais restrito à colonização, a diversidade bacteriana no nódulo pode ser muito maior do que poderia ser esperado, com grande número de bactérias coabitando essa estrutura junto com os rizóbios. De Meyer et al. (2015), por exemplo, identificaram uma larga diversidade de bactérias não nodulantes no interior de nódulos. Nesse trabalho, foram caracterizados 654 isolados obtidos de nódulos de 30 espécies de leguminosas. Esses isolados estavam relacionados a 50 gêneros diferentes, a maioria pertencente à *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Paenibacillus*. Segundo os autores, dos 50 gêneros encontrados, 33 foram reportados pela primeira vez em nódulos, como *Pantoea*, *Corynebacterium*, *Chryseobacterium*, *Sphingomonas* e *Xanthomonas*. Os mecanismos de colonização dessas bactérias ainda não estão bem estabelecidos e o seu papel no interior dos nódulos ainda é pouco conhecido. No entanto, a maioria delas geralmente apresenta características fisiológicas que as qualifica como promotoras de crescimento de plantas.

## 6.6 A simbiose actinorrízica

As denominadas plantas actinorrízicas têm a capacidade de desenvolver simbiose com o actinomiceto diazotrófico *Frankia*. O estabelecimento dessa simbiose também resulta na formação de nódulos nas raízes, assim como em rizóbio-leguminosa. Essas plantas, arbustos ou árvores não leguminosas, são representadas por um grupo diverso de cerca de 200 espécies pertencentes a oito famílias, distribuídas em três diferentes ordens (Fagales, Rosales e Cucurbitales). As espécies actinorrízicas compartilham um ancestral comum com as leguminosas, de onde se sugere que a capacidade de nodulação foi adquirida. Plantas actinorrízicas podem ser utilizadas como pioneiras na recuperação de áreas degradadas (ex.: *Alnus*, *Shepherdia*, *Elaeagnus*, *Hippophae*, *Casuarina*), na formação de quebra-ventos, em projetos paisagísticos, na produção de madeira e até na alimentação humana e animal (ex.: *Ceanothus*, *Purshia*).

As taxas de FBN em associações actinorrízicas podem ser similares àquelas observadas na simbiose rizóbio-leguminosa, atingindo até 300 kg N/ha/ano (WHEELER; MILLER, 1990). Um levantamento da quantificação da FBN em ambientes naturais mostrou que a porcentagem de N proveniente do ar foi maior em plantas actinorrízicas que em leguminosas (ANDREWS et al., 2011). Adicionalmente, ao contrário dos rizóbios, além de fixar N<sub>2</sub> em condições simbióticas, *Frankia* também apresenta essa capacidade em condições aeróbias em vida livre.

Filogeneticamente, *Frankia*, um actinomiceto filamentosso Gram-positivo, é distante dos rizóbios, que são bactérias unicelulares Gram-negativas. As dificuldades para crescer e isolar *Frankia* em meio de cultivo limita maior entendimento sobre as simbioses actinorrízicas. Algumas estirpes tiveram seus genomas sequenciados, mas a ausência de ilhas simbióticas, como nos rizóbios, dificulta a identificação dos genes simbióticos. Contudo, existem indícios de que, como observado na simbiose rizóbio-leguminosa, *Frankia* possua genes similares aos *nod* e que a nodulação e a interação com plantas actinorrízicas também sejam mediadas pela troca específica de sinais moleculares entre os parceiros simbióticos.

Existem dois modos de infecção/colonização descritos para *Frankia*, que variam de acordo com a planta hospedeira, um intracelular, por meio dos pelos radiculares e outro intercelular. A infecção intracelular começa com a deformação dos pelos radiculares e uma deposição de material de parede celular, quando *Frankia* se torna envolvida em uma estrutura análoga ao cordão de infecção da simbiose rizóbio-leguminosa. Durante o processo de infecção as hifas filamentosas de *Frankia* se proliferam nas células infectadas do hospedeiro. Em seguida, as pontas das hifas se diferenciam em vesículas, onde o nitrogênio será fixado. Na infecção intercelular as hifas seguem via apoplasto entre as células corticais, junto a uma matriz eletro-densa, que pode representar o equivalente ao encapsulamento descrito nos cordões de infecção. Em ambos os modos de infecção, a entrada de *Frankia* estimula a divisão celular no córtex radicular formando uma zona mitótica ativa denominada pré-nódulo. Quando o pré-nódulo é infectado ocorre aumento do tamanho de suas células e o processo de FBN é ativado.

Existem diferentes modos de proteção da nitrogenase contra o O<sub>2</sub> nas associações actinorrízicas. Em vida livre, *Frankia* forma vesículas de parede celular espessa, onde a nitrogenase fica protegida. Em simbiose, os sistemas de proteção irão depender da planta hospedeira, e envolvem lignificação da parede celular e formação de vesículas, além das leghemoglobinas.

## 6.7 A simbiose *Parasponia*-rizóbios

*Parasponia* spp. são plantas (árvores tropicais restritas ao arquipélago malaio) que pertencem à família Ulmaceae e formam simbiose com rizóbios. Essas plantas são as únicas não leguminosas capazes de desenvolver uma relação simbiótica com essas bactérias. Essa associação é considerada recente quando comparada à simbiose rizóbio-leguminosa. *Parasponia andersonii*, a espécie mais estudada, é capaz de formar simbiose com quatro diferentes gêneros de rizóbios, sendo assim considerada uma planta promíscua.

Essa simbiose também é dependente de fatores de nodulação. A infecção das bactérias se dá por meio de feridas nas raízes e se assemelha ao processo descrito para plantas actinorrízicas. Ao contrário do que ocorre em leguminosas, os rizóbios permanecem no cordão de infecção durante o processo simbiótico. Proteínas do tipo leghemoglobina foram isoladas de *Parasponia*.

Apesar de serem plantas restritas a um local muito específico, a interação *Parasponia*-rizóbios pode ser valiosa na pesquisa sobre a simbiose entre plantas e bactérias diazotróficas. Como essa simbiose é mais recente, estudos evolutivos podem permitir maior compreensão dos mecanismos envolvidos na simbiose.

## 6.8 As cianobactérias

As cianobactérias representam um grupo diverso de procariotos fotossintéticos que ocorrem em ambientes marinhos, aquáticos e terrestres. As cianobactérias fixadoras de nitrogênio formam simbiose com diversos hospedeiros, como fungos e plantas briófitas, cicadófitas, pteridófitas (*Azolla*) e a angiosperma *Gunnera*, além de esponjas e corais.

Estudos da simbiose entre as cianobactérias *Nostoc* *Richelia* com seus hospedeiros *Gunnera* e *Rhizosolenia*, respectivamente, mostraram que os microsimbiontes podem ser adquiridos do ambiente, ou serem transmitidos de geração em geração. Com exceção, principalmente, da simbiose com *Azolla*, que é tida como obrigatória para o microsimbionte, a maioria das outras associações é facultativa e ambos os parceiros simbióticos podem ser isolados ou cultivados de maneira independente.

Essas bactérias, principalmente *Nostoc* sp., têm a capacidade de colonizar diferentes órgãos das plantas, seja no interior das células, como no caso da família Gunneraceae, ou extracelularmente, como em *Azolla* e *Cycadaceae*.

Para o estabelecimento da simbiose, os organismos hospedeiros devem atrair e internalizar as cianobactérias e, em seguida, regular o seu crescimento e diferenciação. A cianobactéria, por sua vez, deve evitar o estímulo das respostas de defesa da planta e adaptar seu metabolismo ao novo ambiente. Esses eventos requerem uma sofisticada comunicação entre a planta e a cianobactéria. A simbiose causa alterações em ambos os parceiros. As estruturas simbióticas e os órgãos do hospedeiro que alojam as cianobactérias são aumentados. Com relação ao microsimbionte, após infectar o hospedeiro, suas células vegetativas sofrem alterações morfológicas, aumentando de tamanho e alterando sua forma. O desenvolvimento de heterocistos após a infecção das plantas é essencial para o funcionamento da simbiose. O heterocisto representa

um tipo de célula especializada, presente em espécies de cianobactérias filamentosas diazotróficas, onde ocorre a FBN, suas paredes são espessas, dificultando a troca de gases e, assim, protegendo a nitrogenase do  $O_2$ .

Em *Azolla*, as cianobactérias (*Nostoc* sp. e/ou *Anabaena* sp.) são hospedadas em cavidades altamente especializadas localizadas na parte dorsal das folhas. A simbiose entre essa pteridófita e as cianobactérias tem sido explorada por muitos anos como uma fonte de N para a agricultura e é extensamente utilizada como adubo verde ou biofertilizante na cultura do arroz irrigado, com adições que chegam a até 100 kg de N/ha/ano.

Como a FBN é um processo com alto custo energético, não chega a ser surpreendente que micro-organismos fotossintéticos sejam os maiores fornecedores de N fixado em solos de alguns ecossistemas. Crostas biológicas formadas em solos de regiões áridas e semiáridas são ricas em micro-organismos fotossintéticos, muitos deles fixadores de  $N_2$ . Em um estudo de quantificação da FBN por crostas biológicas, em dunas de areia, em Israel, as taxas de N proveniente da FBN foram da ordem de 10-41 kg N/ha/ano (RUSSOW; VESTE; BÖHME, 2005).

## 6.9 FBN em vida livre (FBN assimbiótica)

Os organismos diazotróficos de vida livre são capazes de fixar  $N_2$  sem a necessidade de um hospedeiro. De maneira geral, utilizam como energia substratos disponíveis no ambiente e não excretam, ou excretam apenas parte do  $NH_4^+$  produzido.

Estimativas em áreas não cultivadas apontam para uma quantidade de N fixado por esses organismos entre 5-35 kg de N/ha/ano, o que contribui para a manutenção dos níveis de fertilidade nesses ambientes naturais (STEVENS et al., 2004). Isso pode representar uma importante entrada de N, particularmente em ambientes com menor número de plantas capazes de formarem associações simbióticas.

O pioneirismo e a dedicação da pesquisadora doutora Johanna Döbereiner fez com que o Brasil se tornasse um dos líderes mundiais na pesquisa sobre bactérias diazotróficas associadas a gramíneas. Já no início da década de 1960, ela publicava seus primeiros trabalhos mostrando a associação de gramíneas com esses micro-organismos e, a partir de então, participou ativamente de novas descobertas envolvendo a associação dessas bactérias com diversas gramíneas, dentre outras plantas.

Em áreas agrícolas, há relatos de que de 10 a 60% do N acumulado na planta podem ser provenientes do  $N_2$  atmosférico, em milho, arroz, cana-de-açúcar, algumas



gramíneas forrageiras e outras não leguminosas. Esses valores são significativos, mostrando que a FBN pode vir a substituir, em parte, os fertilizantes nitrogenados utilizados nas áreas de agricultura moderna e intensiva, tendo ainda um papel mais expressivo em locais onde se pratica agricultura tradicional, ou em sistemas agrícolas onde o aporte de fertilizantes é baixo.

Diferentemente dos rizóbios em simbiose com leguminosas, as bactérias diazotróficas associadas a gramíneas e outras não leguminosas não formam nódulos. Esses organismos podem ser encontrados em ambientes muito diversos, como serapilheira, solo e rizosfera, ou até mesmo no interior de tecidos das raízes, colmos e folhas das plantas, quando são conhecidas como bactérias endófitas ou endofíticas. O termo endófito é utilizado para micro-organismos que podem colonizar o interior de tecidos, promovendo benefícios às plantas. Bactérias diazotróficas de gêneros como *Herbaspirillum* e *Gluconacetobacter*, por exemplo, colonizam o interior de vegetais e apresentam baixa capacidade de sobrevivência no solo.

A colonização endofítica traz vantagens para as bactérias, que recebem os nutrientes diretamente no interior do vegetal, sem sofrer estresses ou competição com outros organismos do solo, além de, provavelmente, poderem colonizar sítios onde o acesso de O<sub>2</sub> é restrito, não tendo assim problemas de inibição da atividade da nitrogenase. Além disso, as bactérias podem prontamente disponibilizar parte do N fixado.

Apesar de não haver uma relação simbiótica estabelecida com os organismos diazotróficos de vida livre e as plantas, existem vários mecanismos que podem controlar essa associação. As bactérias são estimuladas por exsudatos radiculares e atraídas para a região rizosférica. Alguns estudos mostraram que, assim como em algumas associações simbióticas, compostos fenólicos, principalmente flavonoides, também parecem ser importantes sinais emitidos pelas plantas nas interações com bactérias de vida livre. Flavonoides estimularam a colonização de trigo por *Azospirillum brasilense* e *Arabidopsis* por *Herbaspirillum seropedicae* (WEBSTER et al., 1998). Além disso, foi mostrado que a flavonona naringenina é capaz de regular genes de *H. seropedicae* envolvidos no processo de colonização (TADRA-SFEIR et al., 2011). Assim como observado em outras associações planta-bactéria, polissacarídeos de superfície (LPS) também estão envolvidos na colonização de raízes.

Há indicações de que as respostas da planta durante essas associações são controladas tanto pelo seu genótipo, quanto pelas estirpes de bactérias. Em análises de transcriptômica em cana-de-açúcar, por exemplo, vários genes diferencialmente expressos foram identificados durante os estágios iniciais da associação com bactérias diazotróficas (CARVALHO; FERREIRA; HEMERLY, 2011). Esses genes estão ligados

a diversos processos, como o reconhecimento planta/micro-organismo, defesa, sinalização de fitormônios, crescimento e metabolismo do N, indicando que o vegetal participa ativamente da associação com essas bactérias.

No caso das bactérias endofíticas, sua entrada nas plantas ocorre, preferencialmente, em tecidos não diferenciados na ponta das raízes e feridas encontradas em pontos de emergência de raízes laterais. Aparentemente, pectinases e celulasas de alguns diazotróficos contribuem para o processo de infecção, degradando a parede celular das plantas, abrindo caminho através da endoderme, para continuar a colonização no interior do vegetal. Depois de alcançado o interior, alguns endófitos colonizam espaços intercelulares do córtex radicular, ou se movem em direção ao xilema, para em seguida se espalharem nos colmos e folhas das plantas.

Bactérias diazotróficas de vida livre, dos mais diferentes gêneros e espécies, têm sido relatadas em associação com um grande número de plantas não leguminosas nos mais diversos biomas, incluindo *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Dexia*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, entre outras.

Membros da ordem Rhizobiales também são encontrados em associação não simbiótica com plantas não leguminosas. *Azorhizobium caulinodans* foi encontrado colonizando trigo, onde promoveu a produção de biomassa e aumento dos teores de N da planta (SABRY et al., 1997). A presença de *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolium em associação com plantas de trigo e milho estimula o crescimento das plantas, mas isso não está associado à FBN e sim a outros mecanismos de promoção de crescimento, principalmente a produção de fitormônios pelas bactérias (HÖFLICH; WIEHE; HECHT-BUCHOLZ, 1995).

Além da FBN, geralmente, as bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> em vida livre podem apresentar diversos mecanismos envolvidos na promoção de crescimento de plantas, como a produção de hormônios vegetais, a solubilização de fosfatos, a produção de sideróforos, o controle de pragas e doenças, entre outros. Dentre esses mecanismos, o mais citado e estudado é sua capacidade de produzir hormônios de crescimento, tais como auxinas, giberelinas e citocininas. A produção dessas substâncias promotoras de crescimento pode estimular o aumento na densidade de pelos radiculares, a taxa de aparecimento de raízes secundárias e a superfície radicular. Esse incremento resulta na melhora da absorção de água e nutrientes aumentando, assim, a capacidade da planta de produzir e suportar estresses ambientais.

Como diferentes mecanismos, diretos e indiretos, podem estar envolvidos na promoção de crescimento das plantas pelas bactérias diazotróficas em vida livre, o papel da FBN por vezes é contestado. Em associações com *Azospirillum*, por exemplo, a produção de fitormônios é considerada o principal fator para promoção do crescimento

de plantas. Entretanto, não há razão para ceticismo quanto à contribuição da FBN. Alguns trabalhos já demonstraram que essas bactérias podem fixar  $N_2$  ativamente quando em associação com as plantas. Em condições de limitação de N, plantas de cana-de-açúcar inoculadas com *Gluconacetobacter diazotrophicus* cresceram melhor e apresentaram maior conteúdo de N do que plantas não inoculadas; além disso, a incorporação de  $^{15}N_2$  (uma técnica para comprovar a utilização do  $N_2$ ) nos tecidos das plantas mostrou que essas estavam se beneficiando da FBN (SEVILLA et al., 2001). A FBN em trigo em associação com *Klebsiela pneumoniae* também foi demonstrada em um trabalho onde plantas inoculadas apresentaram incrementos na concentração de N e no N total e a diluição isotópica de  $^{15}N$  (outra metodologia para comprovar a utilização de  $N_2$ ) nos tecidos das plantas confirmou a presença de N da FBN (INIGUEZ; DONG; TRIPLETT, 2004). Pankiewicz et al. (2015) utilizaram  $^{13}N_2$  e *Setaria viridis* como modelo para mostrar, com evidências diretas, que as plantas incorporaram N da FBN em proteínas, em condições de limitação de N, quando inoculadas com uma estirpe de *Azospirillum brasilense*.

## 6.10 FBN na agricultura

O alto custo do N e os problemas ambientais que podem acompanhar o uso da fertilização nitrogenada têm estimulado abordagens que enfatizam a FBN nos sistemas de produção. Dentro desse contexto, os inoculantes contendo bactérias selecionadas pela pesquisa, eficientes em fixar o  $N_2$  atmosférico, assumem papel importante. O sucesso dos inoculantes deve refletir em ganho econômico, oriundo do aumento da produtividade das culturas e/ou da redução da aplicação de fertilizantes nitrogenados. Os inoculantes podem ser vistos como componentes de uma estratégia de manejo integrado, que estimula a aquisição de nutrientes pelas plantas nos sistemas de produção.

## 6.11 FBN na cultura da soja

Das leguminosas produtoras de grãos, a soja é a de maior importância econômica e a que recebe maior contribuição da FBN. A campo, quando inoculadas com estirpes eficientes de *Bradyrhizobium* spp., a soja pode apresentar taxas muito elevadas de FBN, superiores a 300 kg de N/ha/safra. Resultados de pesquisa indicam que não existe razão

para a utilização de fertilizantes nitrogenados em nenhum estágio do cultivo da soja no Brasil (HUNGRIA; MENDES, 2015).

Hoje, quatro estirpes são autorizadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para a formulação de inoculantes para a cultura da soja no Brasil. Essas estirpes são pertencentes às espécies *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079 = CPAC 15), *B. elkanii* (SEMIA 587; SEMIA 5019 = 29w) e *B. diazoefficiens* (SEMIA 5080 = CPAC 7). O programa brasileiro de seleção de estirpes para a cultura da soja certamente representa uma das etapas mais bem sucedidas da pesquisa brasileira e um bom exemplo a ser citado é o da seleção de estirpes com alta capacidade de FBN e adaptadas às condições particulares dos cerrados (PERES et al., 1993), que hoje representam a principal área produtora de grãos.

Considerando a quantidade de N necessária para produzir 3.000 kg de grãos de soja/ha (produtividade média brasileira), a economia obtida com a FBN nos pouco mais de 30 milhões de hectares cultivados com essa cultura no Brasil, gira em torno de 15 bilhões de dólares anualmente (HUNGRIA; MENDES, 2015), dependendo do preço do fertilizante e cotação da moeda americana.

Os solos brasileiros originalmente não possuem população estabelecida de rizóbios capazes de formar uma simbiose eficaz com soja, uma cultura nativa do continente asiático. As áreas já cultivadas com soja, porém, também já foram inoculadas e apresentam população estabelecida de *Bradyrhizobium* spp., que podem sobreviver saprofiticamente no solo por longos períodos. Apesar disso, tem-se mostrado que é vantajoso inocular (reinocular) as áreas de produção de soja a cada safra e que os incrementos médios na produção de grãos giram em torno de 8% (HUNGRIA et al., 2006). Isso provavelmente ocorre porque os rizóbios do solo em geral estão limitados por condições ambientais adversas, provocando um atraso na nodulação até que o ambiente da rizosfera esteja adequado. Desse modo, a adição de células fisiologicamente prontas na reinoculação garante o estabelecimento mais rápido da simbiose.

Recentemente, a coinoculação de sementes de soja com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum brasilense* foi avaliada (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013, 2015). Os resultados desses trabalhos mostraram que essa prática é benéfica para a cultura da soja, promovendo incrementos na produtividade. A coinoculação foi responsável por um incremento adicional médio na produtividade de 7,7% em relação às plantas que receberam apenas *Bradyrhizobium* como inoculante. A presença de *Azospirillum* estimula a produção de pelos radiculares, onde os nódulos são iniciados, resultando em maior nodulação, o que deve levar à maior contribuição da FBN e, conseqüentemente, maior produção de grãos. Não está claro se o benefício da coinoculação está relacionado somente à maior nodulação e FBN, uma vez que *Azospirillum* pertence ao grupo das

bactérias promotoras de crescimento e possui diferentes mecanismos que podem estimular o desenvolvimento das plantas.

Considerando-se todos os benefícios advindos das pesquisas brasileiras em FBN, e que o potencial genético de rendimento da soja, inicialmente estimado em de 8.000 kg/ha, já foi superado em fazendas nos E.U.A., deve-se garantir que as novas cultivares estabeleçam simbioses altamente eficazes. Em relação às estirpes, o bem sucedido programa de seleção das mais eficientes no processo de FBN e mais competitivas nos solos brasileiros deve continuar, possivelmente acelerado por marcadores moleculares. Estudos de ecologia dos rizóbios também devem ser complementados, uma vez que taxas elevadas de recombinação gênica e de transferência horizontal de genes, entre estirpes inoculantes e rizóbios nativos, foram observadas nos solos brasileiros, e podem afetar, no futuro, as respostas à inoculação. Finalmente, é necessário dar continuidade ao desenvolvimento e à validação de novos inoculantes e tecnologias de inoculação. Nesse contexto podem-se citar como exemplos a inoculação no sulco para a compatibilização com o tratamento de sementes com fungicidas e o enriquecimento das sementes em molibdênio. Ainda nessa linha, a pulverização de inoculantes diluídos na interface solo-raiz, após a emergência das plântulas, apresenta-se como alternativa interessante para se evitar condições adversas, especialmente quando seca e/ou altas temperaturas ocorrem logo após a semeadura (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2015). A utilização de metabólitos concentrados (MC) de estirpes de rizóbio, junto à inoculação, também tem mostrado bom potencial para aumentar o desempenho das bactérias diazotróficas. Os benefícios advindos da aplicação de MCs devem estar relacionados a uma combinação de efeitos, envolvendo exopolissacarídeos, fitormônios e fatores Nod. A simbiose com a cultura da soja representa um caso de extremo sucesso, aportando taxas elevadas de N em todas as regiões produtoras do mundo, com contribuições relevantes para a agricultura (HUNGRIA; MENDES, 2015).

## 6.12 FBN na cultura do feijoeiro

O feijão representa a principal fonte de proteínas para a população brasileira e o Brasil é o maior produtor e consumidor de grãos dessa leguminosa, que também se beneficia do processo da FBN. Essa leguminosa é bastante promíscua, sendo capaz de nodular com uma grande variedade de espécies de *Rhizobium*, incluindo tanto espécies que formam nódulos eficientes (*R. leguminosarum* sv. *phaseoli*, *R. phaseoli*, *R. tropici*, *R. etli*, *R. leucaenae*, *R. giardinii* sv. *phaseoli*, *R. gallicum*, *R. lusitanum*, *R. pisi*, *R. freirei*, *R. mesoamericanum*, *R. paranaense*, *R. ecuadorensis*) como ineficientes (*R. giardinii* sv.

giardinii, *R. miluonense*) na FBN. Além disso, estirpes pertencentes a outros gêneros, como *Sinorhizobium* (= *Ensifer*), *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, bem como estirpes sem posição taxonômica conhecida, podendo representar novas espécies, também têm capacidade de formar nódulos em associação com essa planta (GOMES; ORMENO-ORRILLO; HUNGRIA, 2015).

A distribuição de rizóbios capazes de nodular o feijoeiro varia de acordo com a localização geográfica. *R. etli* tem sido indicado como o microssimbionte dominante no centros de diversificação genética mesoamericanos e andinos (AGUILAR; RIVA; PELTZER, 2004), enquanto que *R. tropici* é encontrado abundantemente em solos tropicais ácidos (GOMES; ORMENO-ORRILLO; HUNGRIA, 2015).

Ao contrário da soja, existe abundância de estirpes de rizóbio nativas nos solos brasileiros capazes de nodular o feijoeiro e que, geralmente, são de baixa eficiência fixadora, representando uma das principais limitações ao sucesso da inoculação. Como agravante, o cultivo sucessivo do feijoeiro em uma mesma área favorece o aumento de populações nativas dessa bactéria, capazes de competir com as estirpes selecionadas introduzidas por meio da inoculação. Além disso, dentre outros fatores limitantes para um bom desempenho da FBN nessa cultura podem ser citados a susceptibilidade do feijoeiro a determinadas condições ambientais, como de estresse hídrico, a variabilidade de resposta das diferentes cultivares à inoculação e a instabilidade genética de algumas estirpes devido à ocorrência de rearranjos genômicos e a perda de plasmídeos.

A resposta do feijoeiro à inoculação, em condições de campo, tem apresentado resultados que variam em função do solo, da cultivar e do histórico de cultivo da área. No entanto, estirpes selecionadas para maior tolerância à acidez, a altas temperaturas e com maior estabilidade genética são capazes de incrementar o rendimento de grãos, mesmo na ausência de N fertilizante (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2003). Produtividades elevadas podem ser obtidas com a inoculação dessas estirpes em associação com pequenas doses de N fertilizante e/ou associadas à aplicação foliar de Mo e Co. Duas estirpes da espécie *R. tropici*, SEMIA 4077 (= CIAT 899) e SEMIA 4088 (= H12), e uma *R. freirei*, SEMIA 4080 (= PRF 81), são hoje autorizadas para o uso em inoculantes comerciais no Brasil, sendo capazes de suprir a necessidade de N de plantas com produtividade de 2.500 kg/ha ou superiores (GOMES; ORMENO-ORRILLO; HUNGRIA, 2015).

Assim como na soja, para o feijoeiro também foram apresentados resultados positivos em resposta à coinoculação com *Rhizobium* e *Azospirillum*. Plantas coinoculadas produziram em média 11.3% a mais de grãos, quando comparadas com aquelas inoculadas exclusivamente com *Rhizobium* (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013).

Embora várias pesquisas realizadas no Brasil tenham mostrado respostas expressivas à inoculação do feijoeiro em condições de campo, o nível de adoção dessa tecnologia ainda é muito baixo e precisa ser estimulado. A adoção da inoculação, aliada ao uso de cultivares melhoradas, técnicas de manejo integrado de pragas e doenças e de correção e adubação do solo poderão, no mínimo, duplicar a média de produtividade nacional a um baixo custo para o agricultor.

### 6.13 FBN em outras leguminosas

Espécies forrageiras, arbustivas e arbóreas assumem papéis importantes, seja na, produção de alimentos, ou na produção de forragem, madeira, lenha, carvão e na recuperação de áreas degradadas, dentre outros. Além disso, diversas espécies produtoras de grãos, para a alimentação humana, ainda podem ser citadas.

O feijão-caupi ou feijão-de-corda é um componente importante dos sistemas de produção da região semiárida brasileira. Essa cultura, geralmente, apresenta baixos níveis de FBN quando nodulada por estirpes nativas. Diversas bactérias são capazes de formar nódulos nas raízes dessa cultura, mas *Bradyrhizobium* spp. são os simbiontes mais comuns. A FBN pode dispensar a necessidade de adubação nitrogenada, já que aumentos significativos no rendimento de grãos do feijão-caupi têm sido alcançados com a inoculação de estirpes eficientes de *Bradyrhizobium* (SILVA JUNIOR et al., 2014). Quatro estirpes (SEMIA 6461, 6462, 6463 e 6464) são autorizadas para a formulação de inoculantes agrícolas para feijão-caupi no Brasil. A estirpe SEMIA 6462, por exemplo, possibilitou incrementos de produtividade de até 40% em condições experimentais e de até 52% nas áreas de agricultores experimentadores (RUMJANEK et al., 2006).

Ervilha, lentilha e grão de bico são exemplos de outras leguminosas produtoras de grãos que são beneficiadas significativamente quando inoculadas com estirpes eficientes de rizóbios. A prática da inoculação pode reduzir ou eliminar a necessidade de utilização de adubos nitrogenados nessas culturas. No Brasil estão disponíveis estirpes recomendadas para a formulação de inoculantes tanto para ervilha (SEMIA 3007, 3033; *Rhizobium leguminosarum* bv viceae), quanto para lentilha (SEMIA 344, 3025, 3026; *Rhizobium leguminosarum* bv viceae) e grão de bico (SEMIA 396; *Mesorhizobium ciceri*), dentre outras (BRASIL, 2011).

Dados experimentais indicam que pastagens com uma composição botânica contendo, aproximadamente, 30% de leguminosas consorciadas com gramíneas seriam suficientes para manter a produtividade vegetal e animal, assim como a

fertilidade dos solos no longo prazo (CADISH; SHUNKE; GILLER, 1994). Diversos trabalhos com pastagens consorciadas mostram sua superioridade quando comparadas às pastagens somente com gramíneas. No consórcio de *Brachiaria ruziziensis* com a leguminosa forrageira *Stylosanthes guianensis*, a produção vegetal e animal da pastagem consorciada foi superior à da pastagem em monocultura (AYARZA et al., 1997). A presença da leguminosa em consórcio, dependendo do manejo aplicado, apresenta resultados que se equiparam a pastos de gramínea pura adubados com até 100 kg N/ha (ZIMMER; CORREA, 1993). Atualmente, no Brasil, existem estirpes de rizóbios recomendadas para diferentes forrageiras de clima temperado (alfafa, cornichão, trevo branco etc) e clima tropical (amendoim forrageiro, desmódio, siratro) (BRASIL, 2011). Apesar dos efeitos positivos observados em diversos estudos, o uso do consórcio em pastagens é pouco significativo. Em geral, isso é atribuído à falta de persistência das leguminosas nas pastagens, à exigência de um manejo mais cuidadoso que em pastagens de gramíneas puras, à necessidade de solos mais férteis, à susceptibilidade a doenças provocadas por fungos e nematoides ou, ainda, pelas leguminosas não se adaptarem às regiões de implantação.

A adubação verde consiste na incorporação de massa verde, com o objetivo de melhorar os atributos químicos, físicos e biológicos do solo. O sucesso da utilização de leguminosas na adubação verde é amplamente relatado e a FBN é responsável, em grande parte, pelos benefícios trazidos por essas plantas para o aumento da qualidade do solo. Perin et al. (2004) avaliaram o efeito do cultivo do adubo verde de verão *Crotalaria juncea* e observaram que a FBN foi responsável por incorporar ao solo até 173 kg N/ha, representando uma excelente estratégia de incremento desse nutriente no sistema. Esse é apenas um dentre muitos trabalhos que comprovam os benefícios da FBN associados à adubação verde com leguminosas. Diversos rizóbios foram selecionados e recomendados para essas plantas (*Cajanus cajan*, *Calopogonium* sp., *Canavalia ensiformis*, *Crotalaria* spp., *Mucuna aterrima* etc) e estão disponíveis para a formulação de inoculantes comerciais (BRASIL, 2011).

A FBN tem papel de destaque em programas de recuperação de áreas degradadas onde leguminosas arbóreas são utilizadas. O uso de espécies nativas ou introduzidas, como *Acacia* spp., *Albizia* spp. e *Mimosa* spp., dentre outras, em associação com rizóbios selecionados pela pesquisa e fungos micorrízicos, tem sido preconizado para a revegetação de áreas degradadas, buscando o restabelecimento de sua fertilidade. A interação entre as plantas e os micro-organismos permite o rápido crescimento das espécies, tornando-as mais tolerantes aos estresses ambientais, o que propicia incremento do conteúdo de matéria orgânica e da atividade biológica do solo por meio do aporte de material orgânico via serapilheira. Diversas estirpes de rizóbios, selecionadas pela pesquisa, são recomendadas para formulação de inoculantes voltados para leguminosas arbóreas (*Acacia* spp., *Albizia*



*lebbeck*, *Dalbergia nigra*, *Enterolobium* spp., *Gliricidia sepium* etc) no Brasil (BRASIL, 2011).

## 6.14 FBN em gramíneas e outras não leguminosas

Diversos experimentos com inoculação, feitos principalmente com *Azospirillum* spp., mostram que estas bactérias são capazes de promover incrementos na produtividade de culturas importantes de gramíneas e outras não leguminosas. Em torno de 70% dos experimentos compilados por Okon e Labandera-Gonzalez (1994), foram observadas respostas positivas à inoculação com *Azospirillum*, com aumentos no rendimento entre 5 a 30%. Utilizando a estratégia de combinar a inoculação com a aplicação de fertilizantes nitrogenados, constatou-se a possibilidade de substituição de até 40% da dose recomendada de nitrogênio para a cultura do milho e até 30% no caso do trigo e aveia (OKON; LABANDERA-GONZALEZ, 1994).

Inoculantes comerciais contendo *A. brasilense* estão presentes há bastante tempo no mercado mundial (OKON; LABANDERA-GONZALEZ, 1994). No Brasil, a inoculação de milho e trigo com estirpes selecionadas de *A. brasilense* foi avaliada de acordo com os critérios da legislação brasileira para inoculantes (HUNGRIA et al., 2010). Os resultados desses ensaios a campo resultaram em incrementos médios de 24% a 30% no rendimento do milho e de 13% a 18% no rendimento do trigo, quando os tratamentos inoculados e os controles sem inoculação foram comparados. Seis estirpes de *A. brasilense* comprovaram a eficiência agrônômica e passaram a ser recomendadas para a produção de inoculantes comerciais para as duas culturas (HUNGRIA et al., 2010). Os efeitos dessa inoculação foram atribuídos à melhoria geral na absorção de diversos macro e micronutrientes e não especificamente à FBN. No entanto, a pesquisa aponta para um potencial de economia de até 50% na utilização de fertilizantes nitrogenados industriais. Como resultados desse trabalho, os inoculantes contendo as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 chegaram ao mercado brasileiro, que hoje já comercializa mais de 2 milhões de doses desse produto anualmente. Atualmente, essas mesmas estirpes também vêm sendo utilizadas em inoculantes para a cultura do arroz e diversos testes com outras espécies vegetais vêm sendo realizados.

Além de *Azospirillum*, outras bactérias diazotróficas de vida livre apresentam potencial para serem utilizadas na agricultura. A inoculação de sementes de arroz com *Herbaspirillum seropedicae* pode promover incrementos na produtividade das plantas equivalentes aqueles obtidos com aplicação de 40 kg de N/ha (PEREIRA; BALDANI, 1995). Guimarães, Baldani e Baldani (2003) também mostraram que a inoculação de arroz

com a estirpe ZAE 94, de *H. seropedicae*, proporcionou aumento na produção de grãos de mais de 50% na variedade Guarani, em condições de sequeiro. A inoculação dessa mesma estirpe em sementes de milho contribuiu para o incremento do rendimento de grãos no híbrido BRS 1010, ao passo que na variedade BRS 4157 este efeito não foi observado (ZILLI et al., 2007).

Resultados de pesquisa mostram que até 60% do N exigido pela cultura da cana-de-açúcar pode ser proveniente da FBN (BODDEY et al., 2001). A cana-de-açúcar é naturalmente colonizada por bactérias diazotróficas, no entanto, alguns estudos têm mostrado o potencial da inoculação dessas plantas com bactérias selecionadas pela pesquisa. Sevilla et al. (2001) mostraram que plantas, quatro meses após terem sido inoculadas com a estirpe padrão de *G. diazotrophicus* (PAL-5), apresentaram produtividade 40% maior que as plantas não inoculadas. Em outro estudo, em experimentos de campo onde foram utilizadas misturas com as bactérias *G. diazotrophicus*, *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica*, foram observados incrementos de até 24,7% na produtividade e 31,4% na produção de matéria seca das plantas inoculadas, que obtiveram até 42,7% do N acumulado proveniente da fixação biológica, dependendo do tipo de solo, do genótipo da planta e da combinação de bactérias utilizadas como inoculante (OLIVEIRA et al., 2006); esse conjunto de estirpes vem sendo utilizado em áreas experimentais e existe potencial para que seja desenvolvido um produto comercial. A princípio, a utilização da inoculação tem como principal impacto a substituição de parte do N utilizado na cana de primeiro ano. Os resultados têm mostrado que, com o uso do inoculante, cerca de 30 kg de N/ha/ano podem deixar de ser aplicados.

Apesar dos resultados animadores, a utilização de inoculantes contendo bactérias diazotróficas requer análise crítica devido à variabilidade observada em alguns casos. De fato, as razões para a variabilidade de resposta da FBN em plantas não leguminosas ainda não foram completamente elucidadas. Tem sido sugerido que a interação genótipo da planta e ambiente exerça um papel decisivo sobre a eficiência das bactérias diazotróficas. Mesmo com a especificidade entre plantas e bactérias associativas ainda sendo tema de estudo, não se pode negar que exista alguma afinidade entre esses organismos. Efeitos dos genótipos das plantas na interação com *Azospirillum* têm sido mostrados para trigo (KAPULNIK; OKON; HENIS, 1987) e milho (GARCIA DE SALOMONE et al., 1996), por exemplo.

A FBN e a promoção de crescimento vegetal podem ajudar as culturas a serem menos dependentes de insumos externos, aumentando a eficiência de utilização dos nutrientes, porém, o sucesso desse processo também passa pela aplicação das técnicas adequadas de manejo do solo, controle integrado de pragas e doenças e irrigação.

## 6.15 Biotecnologia e o futuro da FBN

A aplicação da engenharia genética para a criação de cereais autossuficientes em relação à FBN, ou seja, culturas não leguminosas que possam fixar  $N_2$  atmosférico, dispensando o uso de fertilizantes nitrogenados, tem sido um sonho que acompanha pesquisadores desde os anos 1970, quando a nitrogenase foi transferida de *Klebsiella pneumoniae* para *Escherichia coli* (GEDDES et al., 2015). Contudo, a transferência da nitrogenase para eucariotos, ou a construção de uma associação estável entre cereais e bactérias (rizóbios) mais eficientes em fixar o  $N_2$  atmosférico, ainda é uma probabilidade nebulosa. No entanto, avanços recentes têm apresentado fundamentos importantes para trabalhos futuros e que podem culminar na obtenção dessas soluções biotecnológicas para a problemática do N.

Para que o sonho de se obter cereais fixadores de nitrogênio se tornasse realidade, com a biossíntese da nitrogenase e sua introdução nas células vegetais, de nove a vinte genes deveriam ser transferidos simultaneamente para as plantas, sendo a maior parte deles essenciais. Além disso, o sistema é muito sensível e a atividade fixadora é perdida rapidamente se a expressão de algum gene se apresenta abaixo do ótimo. Outro obstáculo a ser transposto seria o de proteger a nitrogenase contra o  $O_2$ . Para isso, diversos mecanismos sofisticados são apresentados nas simbioses ou pelos diazotróficos de vida livre, resultados de um longo processo evolutivo. Por isso, esse é considerado um desafio extremamente difícil, mesmo na era da engenharia genética.

Avanços no entendimento dos mecanismos da nitrogenase permitem a análise bioquímica de cada etapa na montagem da enzima e a função de cada produto individual dos genes *nif* pode ser monitorada. É possível, portanto, acessar a atividade de cada proteína Nif expressa na planta e determinar onde pode existir algum obstáculo que esteja prejudicando a montagem ou o funcionamento da nitrogenase em organelas de plantas, o que é um passo importante para o futuro dessas pesquisas.

Em outra vertente, busca-se transferir para cereais a habilidade de reconhecer moléculas sinalizadoras de rizóbios, que possam resultar na formação de um tipo de nódulo, capaz de proteger a nitrogenase do  $O_2$  e ser infectado/colonizado pelas bactérias (GEDDES et al., 2015). Atualmente, sabe-se que diversos genes envolvidos na associação entre as plantas e fungos micorrízicos (pelo menos 80% das plantas são capazes de estabelecer essa relação) também são necessários para a interação com rizóbios, indicando uma rota de sinalização molecular conservada entre essas simbioses (PARNISKE, 2008). Aparentemente, a evolução da nodulação envolveu o recrutamento de genes ligados à rota de sinalização já presente nas associações micorrízicas. Desse modo, essa rota de sinalização está presente na maioria das

espécies vegetais, sugerindo que isso pode facilitar o reconhecimento de moléculas sinalizadoras de rizóbios por cereais. Os paralelos entre a sinalização envolvida nessas duas simbioses se estendem à estrutura das moléculas produzidas pelos fungos micorrízicos e pelos rizóbios, em ambos lipoquitoligossacarídeos (MAILLET et al., 2011).

Os pesquisadores estão buscando entender os componentes específicos (genes) de leguminosas que ativam e são ativados pelos sinais envolvidos na simbiose e, a partir daí, transferir esses genes para os cereais, como primeiro passo para obtenção de plantas não leguminosas com maior capacidade de FBN. Os receptores de fatores Nod e os fatores de transcrição associados à nodulação são alvos importantes para a transferência da capacidade de formar simbiose com rizóbios de leguminosas para plantas de outras famílias.

## 6.16 Conclusões

A busca por soluções biotecnológicas para aumentar a capacidade de plantas em fixarem  $N_2$  atmosférico se apresenta como um problema complexo de engenharia genética, mas com potencial para alterar radicalmente a agricultura como hoje é conhecida. O resultado desses estudos não estará disponível em curto prazo, mas o conhecimento já disponível e ainda não aplicado em larga escala também já é suficiente para revolucionar a agricultura. Abordagens de pesquisa, paralelas aos estudos de engenharia genética, devem priorizar um maior aproveitamento da FBN em todos os biomas e com os mais diversos tipos de microorganismos diazotróficos, incluindo desde arqueas ainda pouco estudadas, como as presentes em ambientes extremófilos, até simbioses bem estudadas e com maior nível de conhecimento e uso, como é o caso da associação *Bradyrhizobium*-soja. Há muitas leguminosas com alta capacidade de FBN, incluindo arbóreas utilizadas para a recuperação de áreas degradadas, forrageiras, adubos verdes, que podem aportar centenas de kg de N e que ainda são pouco exploradas. Pode-se dizer que, comparativamente aos rizóbios, o uso de diazotróficos associativos está apenas iniciando e os resultados obtidos têm sido cada vez mais promissores. A difusão da FBN deve ser expandida, devendo haver maior conscientização de que a produção de alimentos pode ser incrementada mesmo com a redução no uso de combustíveis fósseis. Os aspectos ambientais também ocupam uma posição de maior destaque a cada ano, com preocupações sobre a contaminação dos recursos hídricos por nitrato e emissão de gases de efeito estufa associados ao uso de fertilizantes nitrogenados (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013).

As pesquisas recentes confirmam que por meio de FBN pode-se planejar uma agricultura sustentável, mas com altas produtividades.

## Referências

AGUILAR, O. M.; RIVA, O.; PELTZER, E. Analysis of *Rhizobium etli* and its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, D.C., v. 101, no. 37, p. 13548-13553, 2004.

ANDREWS, M. et al. Nitrogen fixation in legumes and actinorhizal plants in natural ecosystems: values obtained using  $^{15}\text{N}$  natural abundance. **Plant Ecology & Diversity**, Oxfordshire, v. 4, no. 2-3, p. 131-140, 2011.

AYARZA, M. et al. Introdução de ***Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão em pastagens de *Brachiaria ruziziensis***: influência na produção animal e vegetal. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1997. (Boletim técnico, n. 1).

BODDEY, R. M. et al. Use of  $^{15}\text{N}$  natural abundance technique for the quantification of the contribution of  $\text{N}_2$  fixation to sugar cane and others grasses. **Australian Journal Agricultural Research**, Victoria, v. 28, p. 889-895, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 13, de 24 de Março de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 58, 25 mar. 2011. Seção 1.

CADISCH, G.; SHUNKE, R. M.; GILLER, K. E. Nitrogen cycling in a pure grass pasture and a grass legume mixture on a red latosol in Brazil. **Tropical Grassland**, v. 28, p. 43-52, 1994.

CARVALHO, T. L. G.; FERREIRA, P. C. G.; HEMERLY, A. S. Sugarcane genetic controls involved in the association with beneficial endophytic nitrogen fixing bacteria. **Tropical Plant Biology**, v. 4, no. 1, p. 31-41, 2011.

DE MEYER, S. E. et al. A large diversity of non-rhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium). **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 83, p. 1-11, 2015.

GARCIA DE SALOMONE, I. E. et al. Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by the  $^{15}\text{N}$  isotope dilution technique. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 23, no. 3, p. 249-256, 1996.

GEDDES, B. A. et al. Use of plant colonizing bacteria as chassis for transfer of  $\text{N}_2$ -fixation to cereals. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 32, p. 216-222, 2015.

GOMES, D. F.; ORMENO-ORRILLO, E.; HUNGRIA, M. Biodiversity, symbiotic efficiency and genomics of *Rhizobium tropici* and related species. In: DE BRUIJN, F. (Org.). **Biological nitrogen fixation**. New Jersey: John Wiley, 2015. p. 747-756.

GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas em arroz de sequeiro. **Revista Agronomia**, Asunción, v. 37, no. 2, p. 25-30, 2003.

HÖFLICH, G.; WIEHE, W.; HECHT-BUCHOLZ, C. Rhizosphere colonization of different crops with growth promoting *Pseudomonas* and *Rhizobium* bacteria. **Microbiological Research**, Jena, v. 150, no. 2, p. 139-147, 1995.

HUNGRIA, M. et al. Contribution of biological nitrogen fixation to the N nutrition of grain crops in the tropics: the success of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) in South America. In: SINGH, R. P.; SHANKAR, N.; JAIWAL, P. K. (Ed.). **Nitrogen nutrition in plant productivity**. Houston: Studium Press, 2006. p. 43-93.

HUNGRIA, M. et al. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant & Soil**, The Hague, v. 331, no. 1-2, p. 413-425, 2010.

HUNGRIA, M.; MENDES, I. C. Nitrogen fixation with soybean: the perfect symbiosis? In: DE BRUIJN, F. (Org.). **Biological nitrogen fixation**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2015. p. 1005-1019.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 39, no. 2, p. 88-93, 2003.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 49, no. 7, p. 791-801, 2013.

- HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Soybean seed co-inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: a new biotechnological tool to improve yield and sustainability. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, no. 6, p. 811-817, 2015.
- INIGUEZ, A. L.; DONG, Y.; TRIPLETT, E. W. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 17, no. 10, p. 1078-1085, 2004.
- KAPULNIK, Y.; OKON, Y.; HENIS, Y. Yield response of spring wheat cultivars (*Triticum aestivum* and *T. turgidum*) to inoculation with *Azospirillum brasilense* under field conditions. **Biology and Fertility of Soils**, v. 4, no. 1-2, p. 27-35, 1987.
- MAILLET, F. et al. Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. **Nature**, Washington, D.C., v. 469, no. 7328, p. 58-63, 2011.
- MOULIN, L. et al. Rhizobia: the family is expanding. In: FINAN, T. et al. (Org.). **Nitrogen fixation: global perspectives**. Wallingford, U.K.: CAB International, 2002. p. 61-65.
- OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C. A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 26, no. 12, p. 1591-1601, 1994.
- OLIVEIRA, A. L. M. et al. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, The Hague, v. 284, no. 1-2, p. 23-32, 2006.
- PANKIEVICZ, V. C. S. et al. Robust biological nitrogen fixation in a model grass-bacterial association. **The Plant Journal**, v. 81, no. 6, p. 907-919, 2015.
- PARNISKE, M. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 6, no. 10, p. 763-775, 2008.
- PEIX, A. et al. Bacterial associations with legumes. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 34, no. 1-3, p. 17-42, 2015.
- PEREIRA, J. A. R.; BALDANI, J. I. Selection of *Azospirillum* spp. and *Herbaspirillum seropedicae* strains to inoculate rice and maize plants. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS - THE ROLE OF

BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION, 1995, Angra dos Reis. **Programme and Abstracts...** Angra dos Reis: Embrapa Agrobiologia, 1995. p. 220-221.

PERES, J. R. R. et al. Eficiência e competitividade de estirpes de rizóbio para a soja em solos de cerrados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 17, p. 357-363, 1993.

PERIN, A. et al. Produção de fitomassa, acúmulo de nutrientes e fixação biológica de nitrogênio por adubos verdes em cultivo isolado e consorciado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 39, n. 1, p. 35-40, 2004.

RUMJANEK, N. G. et al. **Feijão-Caupi tem uma nova estirpe de rizóbio, BR3267, recomendada como inoculante**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2006. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento, n. 15).

RUSSOW, R.; VESTE, M.; BÖHME, F. A natural  $^{15}\text{N}$  approach to determine the biological fixation of atmospheric nitrogen by biological soil crusts of the Negev Desert. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, no. 23, p. 3451-3456, 2005.

SABRY, S. R. S. et al. Endophytic establishment of *Azorhizobium caulinodans* in wheat. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 264, no. 1380, p. 341-346, 1997.

SEVILLA, M. et al. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and  $^{15}\text{N}_2$  incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and mutant strains. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 14, no. 3, p. 358-366, 2001.

SILVA JUNIOR, E. B. et al. Nodulação e produção de feijão-caupi em resposta à inoculação com diferentes densidades rizobianas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 49, n. 10, p. 804-812, 2014.

STEVENS, C. J. et al. Impact of nitrogen deposition on the species richness of grasslands. **Science**, Washington, D.C., v. 303, no. 5665, p. 1876-1879, 2004.

TADRA-SFEIR, M. Z. et al. Naringenin regulates expression of genes involved in cell wall synthesis in *Herbaspirillum seropedicae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D.C., v. 77, no. 6, p. 2180-2183, 2011.



WEBSTER, G. et al. The flavonoid naringenin stimulates the intercellular colonization of wheat roots by *Azorhizobium caulinodans*. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 21, no. 4, p. 373-383, 1998.

WHEELER, C. T.; MILLER, I. M. Current and potential uses of actinorhizal plants in Europe. In: SCHWINTZER, R. C.; TJEPKEMA, J. D. (Org.). **The biology of *Frankia* and actinorhizal plants**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 365-389.

ZILLI, J. E. et al. **Contribuição da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae* para o rendimento de grãos de arroz e milho em Roraima**. Boa Vista: Embrapa, 2007. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento, n. 6).

ZIMMER, A. H.; CORREA, E. S. A pecuária nacional, uma pecuária de pasto? In: ENCONTRO SOBRE RECUPERAÇÃO DE PASTAGENS, 1., 1993, Nova Odessa. **Anais...** Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, 1993. p. 1-25.

# Micro-organismos no monitoramento ambiental

---

Patrícia do Rocio Dalzoto, Wanessa Ramsdorf, Vanessa Kava

## 7.1 Introdução

A ação antrópica, por meio da agricultura, transporte, urbanização e de atividades industriais, gera uma infinidade de resíduos tóxicos, liberados continuamente no ambiente. A melhoria da qualidade de vida e, em consequência, de consumo, levou à elevação da poluição do ar, à contaminação da água e do solo.

O interesse crescente pela manutenção dos ecossistemas naturais do nosso planeta, visando à redução dos níveis de poluição, tem levado à busca e ao desenvolvimento de métodos de monitoramento ambiental. Apesar dos avanços alcançados na área de detecção e análise de poluentes presentes no ambiente em concentrações muito baixas, ainda há compostos que não são detectados em componentes ambientais e tecidos biológicos. Estes podem ser móveis e persistentes no ar, na água, no solo e nos sedimentos, em pequenas concentrações. Suas implicações ecológicas e para a saúde humana ainda não são completamente conhecidas. Os poluentes emergentes (EP) são definidos como novos compostos químicos, ainda não submetidos à regulação, cujos impactos no ambiente e na saúde humana são pouco compreendidos. São substâncias como pesticidas, cosméticos, produtos de cuidado pessoal e de casa, fármacos, entre outros, usados mundialmente e, de certa forma, indispensáveis para a sociedade moderna (GRAVILESCU et al., 2015).

A ação do homem levou, ainda, à contaminação das fontes de água com poluentes biológicos, como bactérias, micoplasmas, protozoários e vírus, denominados patógenos emergentes ou reemergentes, disseminando doenças veiculadas pela água que são as causas principais de mortalidade no mundo (THERON; CLOETE, 2002).

Embora o controle do ambiente seja essencial no monitoramento, os efeitos dos poluentes químicos somente podem ser corretamente dimensionados quando são aplicadas técnicas que envolvem, de alguma forma, organismos vivos ou células. Estes organismos podem ser naturais do ambiente em estudo, ou então geneticamente

modificados para este fim. Em ambos os casos, são denominados espécies-teste e fornecem dados importantes sobre toxicidade e genotoxicidade em ambientes contaminados. A detecção precoce desses compostos, especialmente na água, e o conhecimento sobre os seus efeitos biológicos, são de extremo interesse para a redução dos níveis de poluição. Os métodos analíticos de monitoramento ambiental baseiam-se na determinação da concentração dos poluentes químicos, porém não os relacionam com os reais efeitos sobre os seres vivos. Ainda, em alguns casos, o limite de detecção dos métodos utilizados não contempla substâncias cujos efeitos tóxicos são efetivos em doses muito baixas. Assim, no intuito de refletir a situação real do ambiente, em termos de impactos em sistemas biológicos, métodos adicionais devem ser empregados. Para tal, organismos vivos ou células podem atuar como ferramentas analíticas, fornecendo respostas após exposição a amostras ambientais (MARINSEK-LOGAR; VODOVNIK, 2007).

Testes de monitoramento ambiental iniciaram com o uso de organismos eucariotos multicelulares, como peixes e mamíferos. Questões éticas e a grande demanda de tempo levaram ao desenvolvimento de métodos alternativos. Bactérias, algas unicelulares, protozoários e leveduras passaram a ser empregados em análises ambientais, de forma rápida e com custos reduzidos, em comparação com as técnicas utilizadas previamente.

O biomonitoramento pode ser realizado por meio de bioensaios, biomarcadores e análise da comunidade microbiana no ambiente. Isto pode elevar a confiabilidade na predição de riscos pela exposição aos poluentes químicos comuns, bem como aos emergentes. O uso de sensores pode contribuir com análises em paralelo, visando não apenas o monitoramento, mas uma varredura do referido ambiente, em tempo real.

## 7.2 Bioindicadores

Bioindicadores podem ser definidos como fatores bióticos que permitem acessar informações sobre as condições ambientais, sejam atuais, passadas ou futuras, de um determinado ecossistema. Este conceito está intimamente ligado à qualidade ambiental e ao monitoramento. Sabendo que os seres vivos são adaptados aos ambientes onde habitam, desequilíbrios ecológicos irão resultar em alterações morfológicas, bioquímicas e, em consequência, no ciclo vital destes organismos. Assim, estes indicadores podem fornecer respostas rápidas sobre impactos ambientais, possibilitando que sejam analisadas as causas e efeitos dos poluentes em questão, com base em suas respostas biológicas. Um panorama sobre a situação de determinado ambiente pode, então, ser traçado, e as conclusões podem ser extrapoladas para

as demais espécies que habitam o mesmo ecossistema. E, finalmente, por meio de bioindicadores, é também possível avaliar se as ações destinadas à diminuição do impacto ambiental são eficientes, naquele determinado local e naquele momento específico (ZAMONER, 2007).

Bioindicadores podem tanto alertar para um desequilíbrio ecológico, como exibir uma resposta mensurável às mudanças ambientais, neste caso apresentando um comportamento severamente alterado quando em situações de estresse ambiental.

Micro-organismos e processos microbiológicos têm sido empregados como indicadores de qualidade ambiental, especialmente por sua abundância nos ecossistemas naturais e também à sua relativa sensibilidade aos impactos ambientais.

### **7.3 Bioindicadores de qualidade da água**

Embora a água seja abundante no planeta, a maior parte desta não é acessível, sendo 98% de água salgada e 1,8% de águas retidas em geleiras ou como águas subterrâneas. A pequena porcentagem de água doce disponível para utilização humana e animal é frequentemente contaminada, química e/ou biologicamente. No Brasil, estão 13,7% das águas superficiais do mundo e 70% concentram-se na região Amazônica, sendo os 30% restantes distribuídos de forma desigual nos demais Estados do país.

As fontes de contaminação da água superficial são esgotos, aterros sanitários, fossas sépticas e esquifes. Segundo a Organização Mundial da Saúde, as doenças infecciosas causadas por bactérias, vírus e parasitas (protozoários e helmintos) são as mais comuns e disseminadas pelo consumo de água contaminada. Cerca de 80% das doenças veiculadas pela água acontecem em países em desenvolvimento, e, aproximadamente 5.000 mortes acontecem todos os anos. Destas mortes, 2.000 são de crianças abaixo de dois anos de idade (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011). A água figura em terceiro lugar dentre os alimentos envolvidos em surtos, documentados até o ano de 2014. Visando o controle e a diminuição destas taxas de mortalidade, programas de monitoramento e tratamento da água devem ser preconizados.

A detecção dos patógenos na água, em geral, leva a dificuldades técnicas, assim, o uso de outros organismos torna-se uma estratégia mais viável. Diversos micro-organismos podem ser empregados como indicadores da qualidade da água, pois estão presentes em maior quantidade nas fezes dos animais endotérmicos; são semelhantes aos patógenos, porém mais resistentes às variações ambientais. Ainda,

sua identificação é tecnicamente simples e rápida (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011).

A microbiota fecal humana contém cerca de  $10^{11}$  UFC (Unidades Formadoras de Colônias)/g, sendo que *Escherichia coli* é encontrada na concentração de  $4,0 \times 10^8$  UFC/g, *Enterococcus faecalis*,  $2,0 \times 10^8$  UFC/g e *Clostridium perfringens*,  $4,0 \times 10^6$  UFC/g. Desta forma, estes micro-organismos são considerados bons indicadores de contaminação fecal (MADIGAN et al., 2012).

As águas para consumo humano, segundo a portaria nº 2.914 (BRASIL, 2011), devem ser livres de contaminação por coliformes totais e fecais. Os coliformes são um grupo de bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae, são bacilos Gram-negativos, fermentadores de lactose, com produção de gás a  $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , não esporulados, com atividade de  $\beta$ -galactosidase. Neste grupo, os principais gêneros são *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Escherichia*. Dentro do grupo coliformes, há os coliformes termotolerantes, que fermentam a lactose com produção de gás a  $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$ . Estes organismos são representados pelo coliforme fecal *Escherichia coli*, que apresenta atividade de  $\beta$ -Glucuronidase. A presença de *E. coli* na água indica contaminação fecal recente, uma vez que este organismo não é capaz de realizar divisão celular na água, sobrevivendo por pouco tempo neste ambiente.

Outro organismo indicador importante é *E. faecalis*. São cocos Gram-positivos, e indicadores de contaminação fecal mais resistentes que *E. coli*, permanecendo na água quando a *E. coli* já não está mais presente. *C. perfringens* é um bacilo Gram-positivo, esporulado, anaeróbio estrito, capaz de sobreviver na água por períodos de tempo maiores que os observados para os indicadores previamente citados e é altamente resistente aos desinfetantes empregados. Assim, é um excelente indicador de contaminação fecal remota.

Já a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* também é considerada um indicador de qualidade de água, porém sua pesquisa está restrita às águas minerais. É um bacilo Gram-negativo, e que tem por característica a capacidade de crescer com quantidades mínimas de nutrientes, sendo, portanto, um bom indicador, uma vez que sobrevive por longos períodos de tempo na água e pode ser um agente para monitoramento de condições higiênicas de sistemas industriais.

Outros micro-organismos também são indicadores de qualidade microbiológica, como bactérias heterotróficas, bolores e leveduras e estafilococos coagulase positiva, estes últimos sendo particularmente importantes para a qualidade da água para balneabilidade.

De acordo com a portaria 2.914 (BRASIL, 2011), a água potável, tratada, deve ser livre de coliformes totais e fecais em 100 mL. A água mineral deve ter ausência

de coliformes totais, coliformes termotolerantes ou *E. coli*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* e clostrídios sulfito redutores ou *C. perfringens*.

Além destes micro-organismos, a presença de protozoários também pode ser indicativa de contaminação dos mananciais de água, antes do tratamento. Estes organismos são abundantes em sistemas aquáticos, têm ciclo de vida curto e são altamente sensíveis a alterações ambientais. A presença destes, ao indicar contaminação dos mananciais, pode alertar para a necessidade de instalação de filtros no sistema de tratamento, uma vez que estes indicadores e patógenos deste grupo, como *Giardia* sp., são resistentes aos desinfetantes comumente usados (DIAS; WIELOCH; D'AGOSTO, 2008).

Outros micro-organismos podem ser artificialmente introduzidos no ambiente aquático e, depois de um determinado tempo de exposição, recolhidos e avaliados em relação à sua viabilidade e normalidade em determinadas funções celulares. Um bom exemplo ocorre com as microalgas, utilizadas como biossensores para a avaliação de contaminação em ambientes aquáticos. Estes micro-organismos geralmente são imobilizados em um substrato permeável e deixados no ambiente supostamente contaminado por um determinado intervalo de tempo. Como exemplo, Ferro et al. (2012) selecionaram três microalgas para uso como bioindicadores de toxicidade: *Chlorella vulgaris*, *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlamydomonas reinhardtii*. Estas microalgas foram imobilizadas em hidrogéis de alginato e sílica e expostas a várias concentrações do herbicida atrazina. Alterações celulares foram detectadas e os autores propõem a utilização deste sistema para monitorar bacias hidrográficas próximas de ambientes com alta incidência de utilização de herbicidas como a atrazina e outros agrotóxicos.

## 7.4 Bioindicadores de qualidade do solo

O solo é considerado um recurso natural vivo e dinâmico, responsável pela produção de alimentos e pela regulação do ecossistema. É um reservatório de micro-organismos, os quais têm importante papel na manutenção da fertilidade deste solo, bem como nos ciclos biogeoquímicos.

Assim como previamente descrito, o crescimento populacional e a atividade humana levaram à crise de alimentos no mundo, ocasionando o manejo intensivo do solo e o uso de pesticidas e fertilizantes, visando o aumento da produção agrícola. Diversos contaminantes podem afetar o solo, como agrotóxicos, metais pesados, compostos químicos oriundos de águas de descarte doméstico ou industrial, e

biológico, muitas vezes representado por patógenos vegetais e animais, incluindo humanos (ARAÚJO; MONTEIRO, 2007).

A capacidade de o solo funcionar no ecossistema e sustentar a produtividade biológica, manter a qualidade ambiental e promover a saúde de plantas e animais é denominada qualidade do solo. Embora seja de conhecimento da comunidade científica que o solo precisa ser monitorado em relação à contaminação, à quantidade de fatores químicos, físicos e biológicos envolvidos nos ciclos biogeoquímicos, é um fator limitante para essa avaliação. A identificação de parâmetros que possam indicar o impacto ambiental no solo, portanto, torna-se uma tarefa complexa.

Bactérias, actinobactérias e fungos representam grande parte da biomassa microbiana presente nestes ecossistemas. A biomassa microbiana é a matéria orgânica viva do solo, podendo chegar a representar de 1 a 5% do carbono orgânico total do solo. A atividade biológica é concentrada nas camadas mais superficiais do solo, a profundidade de 1 a 30 cm, e consiste de decomposição da matéria orgânica, disponibilização de nutrientes para as plantas e, ainda, degradação de compostos tóxicos. Assim, um solo com abundância de micro-organismos é mais apto a manter suas características estáveis após um evento de contaminação (BABUJIA et al., 2010; ARAUJO; MONTEIRO, 2007).

Os indicadores biológicos no monitoramento do solo devem ser exatos e precisamente avaliados, fornecendo respostas em ampla escala de tipos e condições do solo; econômicos e de fácil análise; sensíveis aos estresses ambientais, mas robustos, para não gerar falsos resultados positivos, e validados cientificamente.

Os parâmetros utilizados para o monitoramento da qualidade ambiental do solo são a taxa de respiração microbiana, a biomassa microbiana, a taxa de fixação biológica de nitrogênio, bem como da nodulação de leguminosas por bactérias do gênero *Rhizobium* e a atividade das enzimas no solo.

A respiração do solo tem papel fundamental no ciclo do carbono e sua avaliação permite quantificar a atividade microbiana. Ao confrontar a taxa de respiração microbiana com a quantidade de matéria orgânica e biomassa microbiana, pode-se obter um panorama do solo, em relação à sobrevivência e ao metabolismo dos micro-organismos que compõem o ecossistema em estudo. Isso é possível, pois os micro-organismos sofrem mudanças abruptas em resposta às modificações no solo, aumentando sua taxa respiratória e também de utilização de carbono e nitrogênio.

A fixação biológica de nitrogênio também pode ser utilizada como indicadora de impacto ambiental no solo. Como a relação simbiótica entre *Rhizobium* sp. e leguminosas é altamente específica, a nodulação por *Rhizobium* e a taxa de fixação

biológica de nitrogênio podem fornecer informações sobre as condições do referido solo.

As enzimas presentes no solo também figuram como indicadores de qualidade ambiental, uma vez que sua atividade é relacionada com a matéria orgânica e com a biomassa microbiana. As principais enzimas no solo são a desidrogenase,  $\beta$ -glucosidase, celulase, urease, amidase, fosfatase, arilsulfatase (BABUJIA et al., 2010; ARAÚJO; MONTEIRO, 2007).

As micorrizas, associações simbióticas entre fungos e raízes de plantas, são importantes indicadores de qualidade do solo. Presentes em 95% das espécies vegetais, os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) têm papel fundamental no crescimento e nutrição vegetal uma vez que promovem a absorção muito aumentada de P, Cu, Zn e K do solo. Em situações de contaminação do solo por compostos como fósforo, principalmente via adubação, observa-se a redução na taxa de micorrização das raízes (SILVEIRA, 1998).

Técnicas mais recentes, como a metagenômica, permitem acessar a diversidade microbiana no solo sem a necessidade de isolamento dos micro-organismos. Basicamente, o DNA total do solo é purificado e, por métodos de biologia molecular, é possível determinar quais organismos estão presentes. Deste modo, é possível comparar solos férteis, livres de contaminação ou com baixos níveis, e solos altamente comprometidos por impactos ambientais.

## 7.5 Bioindicadores de qualidade do ar

Segundo a resolução Conama nº 03/1990, considera-se poluente, qualquer substância presente no ar e que, pela sua concentração, possa torná-lo impróprio, nocivo ou ofensivo à saúde, inconveniente ao bem-estar público, danosos aos materiais, à fauna e à flora ou prejudicial à segurança, ao uso e gozo da propriedade e às atividades normais da comunidade. O ar é constantemente contaminado pela ação antrópica, principalmente por gases emanados por indústrias, fumaça de chaminés domésticas, emissões de veículos automotivos e também gases vulcânicos. Como indicadores químicos de contaminação podem ser citados fumaça, partículas inaláveis, metais pesados, dióxido de enxofre ( $\text{SO}_2$ ), monóxido de carbono (CO), ozônio ( $\text{O}_3$ ) e óxidos de nitrogênio ( $\text{ON}_x$ ).

Em virtude da poluição crescente, especialmente nos grandes centros urbanos e industriais, o monitoramento da qualidade do ar pode ser realizado por meio da avaliação de micro-organismos indicadores. Dentre estes, os mais sensíveis são os líquens,



associações simbióticas entre fungos e algas fotossintetizantes. Estes organismos respondem de forma bastante eficiente às alterações nas condições atmosféricas, constituindo excelentes indicadores de qualidade do ar. A sua sensibilidade leva à diminuição da sua vitalidade, bem como a alterações na sua biologia como, por exemplo, na ruptura da relação simbiótica, fato difícil de ser observado em situações ambientais estáveis. Os líquens são capazes de absorver elementos radioativos, metais pesados e outros poluentes e sua anatomia, por não possuírem estruturas que permitam a eliminação de compostos tóxicos, é um dos fatores chave para o seu emprego como bioindicador.

Os poluentes presentes no ar podem levar a alterações na quantidade de líquens, no tamanho da área que os mesmos habitam modificações morfológicas e metabólicas nas espécies envolvidas. De uma forma geral, a alga, parte da relação simbiótica é mais sensível e mais rapidamente prejudicada pela ação dos poluentes, chegando a ter a clorofila degradada. Isso reflete em menores níveis de fotossíntese e, em consequência, de menor liberação de oxigênio no ambiente. O monitoramento, neste caso, consiste de avaliação da diversidade, abundância e frequência das espécies liquênicas (MARTINS; KÄFFER; LEMOS, 2008).

Leveduras podem ser importantes indicadores de qualidade do ar. A superfície foliar apresenta uma microbiota diversa e membros da família Sporobolomycetaceae, por sua sensibilidade aos poluentes urbanos e industriais, especialmente ao dióxido de enxofre e ao dióxido de carbono, constituem bioindicadores de poluição atmosférica (SILVA et al., 2014).

## 7.6 Monitoramento físico-químico e ecotoxicológico

A introdução de substâncias tóxicas no ambiente aquático, além de causar efeitos locais e imediatos, pode levar a alterações sistêmicas como a contaminação de bacias hidrográficas e o comprometimento de reservatórios subterrâneos através da infiltração pelo solo. Assim, a comunidade aquática, bem como as comunidades que fazem uso dos recursos hídricos, pode ser exposta e sofrer efeitos de contaminação crônica (THOMPSON; LANGTON; HART, 1995).

Avaliar a quantidade de poluentes presentes no ambiente e nos animais por si só não é suficiente, havendo a necessidade de se detectar e avaliar o impacto destes poluentes nos organismos expostos, pelo fato de existirem diferenças na forma de metabolizar os xenobióticos. Dentre os principais organismos utilizados como

biomonitores estão espécies de moluscos, peixes, anfíbios, mamíferos (COTELLE; FÉRARD, 1999) e algas (AOYAMA; IWAHORI; MIYATA, 2003).

Buscando entender a interação dos xenobióticos com a vida aquática, surgiu a ecotoxicologia, ciência que identifica e avalia os efeitos causados pela presença de xenobióticos no ecossistema. A partir dos resultados de pesquisa nesta área passou-se a indicar se a concentração de um determinado poluente seria capaz de exercer ou não efeitos deletérios sobre uma comunidade específica (HUGGETT et al., 1992).

O monitoramento ambiental, principalmente no que diz respeito a organismos expostos a poluentes, utilizando testes em sistemas biológicos, propicia promissoras ferramentas para a identificação de poluentes capazes de causar dano à saúde humana e ao ambiente (DA SILVA; ERDTMANN; HENRIQUES, 2003).

## **7.7 Ensaios ecotoxicológicos com organismos aquáticos**

A ecotoxicologia é o estudo dos efeitos tóxicos de substâncias químicas e efluentes industriais em uma população, na comunidade e também no ecossistema, bem como das medidas necessárias para prevenir, conter ou tratar os danos causados (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008).

A observação do comportamento e das reações de animais e plantas no contato com contaminações da natureza, particularmente da água, levou no século XIX, a se considerar o emprego de organismos como indicadores de impactos ambientais. A ideia de se utilizar os próprios membros dos ecossistemas para o controle da qualidade destes foi difundida e, após anos de pesquisas e experiências com inúmeros organismos, algumas espécies se mostraram potencialmente aptas para o monitoramento ambiental biológico. Verificou-se que a reação, a sensibilidade das espécies, varia consideravelmente entre os diferentes grupos taxonômicos perante as mesmas substâncias químicas ou amostras ambientais (KNIE, 2004).

A toxicidade de agentes químicos no meio hídrico é avaliada por meio de ensaios ecotoxicológicos com organismos representativos da coluna d'água ou dos sedimentos de ambientes de água doce, estuarina ou marinha. O conhecimento da toxicidade desses agentes a diferentes organismos aquáticos possibilita, além do estabelecimento de limites permissíveis, avaliar o impacto momentâneo que esses poluentes causam à biota dos corpos hídricos (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

O emprego de várias espécies nos bioensaios não é praticável nem economicamente viável. Por esse motivo, por volta dos anos 1950, vários países como Alemanha, Estados Unidos, França e Inglaterra começaram a selecionar organismos típicos dos grupos mais importantes da biocenose aquática, levando em consideração os diferentes níveis tróficos: decompositores (bactérias), produtores primários (algas), consumidores primários (protozoários e microcrustáceos) e consumidores finais (como peixes). Alguns organismos padronizados nesse período se consolidaram como importantes organismos-teste, sendo utilizados até hoje na maioria dos laboratórios de ecotoxicologia do mundo (KNIE, 2004).

Os testes com esses organismos foram normatizados nos respectivos países de origem, logo após terem sido implementados. Depois, foram também padronizados internacionalmente, por exemplo, pela Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) e pela International Organization for Standardization (ISO). Essa padronização se reveste de grande importância, pois a harmonização dos bioensaios possibilita a aplicação uniforme dos métodos de teste mundialmente, assegurando resultados comparáveis entre os diversos laboratórios (KNIE, 2004). Atualmente, vários ensaios de toxicidade já estão bem estabelecidos, sendo alguns padronizados nacionalmente pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Os critérios decisivos para a escolha destas espécies foram, sobretudo, as boas experiências com seu manuseio e a sua importância na cadeia alimentar, sua ampla disseminação e fácil disponibilidade. A esses organismos pertencem as bactérias *Pseudomonas putida* e, a partir do final dos anos 1970, as fotobactérias *Vibrio fischeri*, as algas *Scenedesmus subspicatus* e *Selenastrum capricornutum*, os microcrustáceos *Daphnia magna* e *Ceriodaphnia dubia* e peixes como *Danio rerio*, *Pimephales promelas*, *Leuciscus idus* ou *Poecilia reticulata*, entre outros (KNIE, 2004).

O princípio básico para todos os ensaios de toxicidade é semelhante e requer condições ambientais específicas, como pH, temperatura, oxigênio dissolvido, dureza da água, fotoperíodo e duração do teste. Nesses ensaios, os organismos-teste (peixes, microcrustáceos, algas, bactérias, dentre outros) são expostos a várias concentrações da amostra a ser testada (substância química, efluente, extrato aquoso), em soluções contidas nos frascos-teste por determinado período de tempo. Em todos os ensaios são utilizados frascos-controle (somente com água de diluição), nos quais se avalia a viabilidade do lote de organismos expostos. Após o período do teste verificam-se os efeitos da amostra sobre alguns parâmetros biológicos como mortalidade, crescimento, reprodução, comportamento, entre outros. Os efeitos observados são analisados estatisticamente e os resultados expressos em unidades numéricas (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

A toxicidade dos poluentes varia em função do tempo e de suas concentrações, podendo ser dividida em efeitos agudos ou crônicos. Os ensaios de toxicidade aguda são caracterizados por rápidas exposições a altas concentrações de poluentes. São os efeitos mais perigosos, podendo causar graves desordens fisiológicas até a morte por envenenamento. São os ensaios que avaliam os efeitos, em geral severos e rápidos, sofridos pelos organismos expostos ao agente químico, em curto período de tempo, geralmente de um a quatro dias. Foram os primeiros ensaios a serem desenvolvidos devido à simplicidade de execução, curta duração e baixo custo e constituem a base de dados ecotoxicológicos. Nestes ensaios, usualmente os critérios de avaliação são a mortalidade e a imobilidade dos organismos-teste, critérios facilmente identificados e com significado biológico e ecológico para o ambiente (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Os ensaios de toxicidade crônica permitem avaliar os efeitos adversos mais sutis aos organismos expostos, uma vez que são realizados em concentrações subletais que podem causar distúrbios fisiológicos e/ou comportamentais em longo prazo (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). Os efeitos crônicos estão relacionados com a exposição prolongada de concentrações baixas, o que resulta em efeitos por acumulação; são os principais focos de estudos em ecotoxicologia (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008).

## **7.8 Monitoramento ambiental empregando micro-organismos**

Como premissa básica, os organismos aquáticos utilizados em ensaios ecotoxicológicos devem pertencer a certos grupos taxonômicos representativos dos ecossistemas aquáticos. Algas e outros vegetais são a base da cadeia alimentar e são denominados organismos produtores ou autótrofos. Todos os outros organismos, com exceção de alguns que realizam quimiossíntese, se beneficiam dessa produção e são denominados heterótrofos, ou seja, os consumidores e os decompositores. Os consumidores são divididos em diferentes grupos, de acordo com a distância do nível produtor, em consumidores primários, secundários, terciários e assim por diante. Os decompositores garantem a degradação de substâncias orgânicas resultantes de organismos mortos ou de seus metabólitos em substâncias mais simples, de forma que estas possam ser facilmente reassimiladas pelos organismos produtores e pelos consumidores do tipo filtradores (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). O micro-organismo mais empregado nos testes ecotoxicológicos é a bactéria marinha *Vibrio fischeri*.

### 7.8.1 Teste com fotobactérias – inibição da luminescência de *Vibrio fischeri*

Características de *V. fischeri*

*Vibrio fischeri* é uma bactéria marinha luminescente, gram-negativa e anaeróbia facultativa. Em condições ambientais favoráveis, emite luz naturalmente, necessitando para isso oxigênio em concentrações acima de 0,5 mg/L (KNIE, 2004).

### 7.8.2 Bioluminescência

De acordo com White (2000), bioluminescência é a emissão de luz por organismos vivos. Dentre os diversos organismos que emitem luz, podemos encontrar representantes de algas (dinoflagelados), fungos, camarões, insetos, peixes e bactérias. Embora alguns vivam no solo ou em ambientes de água doce, a maioria é organismo marinho.

A atividade luminescente microbiana envolve sistemas de transporte de elétrons associados à produção de luz, e que são diretamente afetados por fatores ambientais prejudiciais ao metabolismo celular. Se algum distúrbio sobre a cadeia de transporte de elétrons manifesta-se como uma redução de luz, muito provavelmente a substância tóxica apresenta-se em uma forma biodisponível capaz de penetrar no interior da célula (STEINBERG et al., 1995).

A bioluminescência produzida pela bactéria marinha *V. fischeri* é a base para vários ensaios de toxicidade. Em todos os sistemas, a toxicidade é avaliada medindo até que ponto a substância causa inibição sobre a emissão de luz pelas bactérias (JENNINGS; RAYNER-BRANDES; BIRD, 2001). A emissão da luz nas bactérias é influenciada pelo fenômeno denominado de *quorum sensing*, que se traduz em um sinal de concentração celular.

Muitas bactérias são capazes de monitorar suas densidades populacionais utilizando-se para isso, de ferormônios como, por exemplo, a N-acilhomoserina lactona. Estes são responsáveis pelo sinal de emissão da bioluminescência (ZHANG et al., 2002). Bactérias luminescentes produzem luz quando oxidam simultaneamente riboflavina 5-fosfato (FMNH<sub>2</sub>) e um aldeído de cadeia longa (RCHO) como, por exemplo, tetradecanal (C14), na presença de oxigênio. A reação é catalisada por uma enzima do tipo flavina monooxigenase denominada luciferase (SANTOS; SANTOS, 1993).

A utilização de micro-organismos bioluminescentes para testes de toxicidade é relativamente simples e rápida, não exigindo a identificação química dos agentes tóxicos. Métodos de avaliação da toxicidade com bioluminescentes incluem o uso de luminescência natural de bactérias marinhas (*Photobacterium phosphoreum* e *Vibrio*

*fischeri*), como o sistema Microtox e o Lumistox e bactérias geneticamente modificadas para produzir bioluminescência, como a inserção de genes *lux* em *Escherichia coli* e *Photobacterium fluorescence*.

### 7.8.3 Aplicações e características do ensaio ecotoxicológico com *V. fischeri*

O uso das fotobactérias em ensaios ambientais começou, nos anos 60 do século XX, no âmbito do monitoramento da poluição atmosférica. A partir do final da década de 70 do século passado, ensaios com bactérias luminescentes passaram a ser usados com sucesso na determinação da toxicidade de amostras aquáticas, de sedimentos e de solos (KNIE, 2004).

O sistema de teste é baseado na medição da luminescência emitida pelas bactérias *V. fischeri* após exposição a uma amostra por um período de 15 ou 30 min. A intensidade da luz das bactérias na amostra é comparada a de um controle, onde não é adicionada a amostra. Na presença de substâncias tóxicas a bioluminescência diminui, sendo a quantidade de perda de luz proporcional à toxicidade da amostra. O decréscimo da luminosidade acontece em função da inibição dos processos metabólicos das bactérias (KNIE, 2004).

O ensaio é de fácil execução. Considerando-se todos os procedimentos necessários à sua preparação e o tempo de exposição dos organismos-teste à amostra, o teste completo é realizado em menos de 02 h. Além da praticidade e rapidez, o ensaio permite a avaliação tanto de amostras de água doce quanto salina. Em função desses fatores, o teste com fotobactérias se tornou também um instrumento muito útil em situações emergenciais como, por exemplo, em situações de acidentes ambientais, quando se necessita de uma resposta rápida (KNIE, 2004).

O teste de toxicidade aguda com *V. fischeri* é considerado uma alternativa valiosa na avaliação da contaminação ambiental. É um método eficiente na detecção da toxicidade de um amplo espectro de contaminantes químicos, especialmente quando se pretende avaliar misturas complexas contendo diferentes compostos orgânicos e inorgânicos (HERNANDO et al., 2006).

Os ensaios com *V. fischeri* encontraram grande aplicabilidade, especialmente com a padronização em 1991 pela DIN (norma 38412 parte 34) e em 1998 pela ISO (norma 11348, partes 1, 2 e 3), revisada em 2007 (ISO 11348, 2007). Em 2006, a ABNT publicou a NBR 15411 'Ecotoxicologia Aquática – Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de *V. fischeri* (ensaio de bactéria luminescente)]' que, baseada na ISO 11348, emprega o tempo de exposição de 30 min e também é dividida em três partes: parte 1 – método utilizando bactérias recém-cultivadas; parte 2 –

métodos utilizando bactérias desidratadas e parte 3 – método utilizando bactérias liofilizadas (KNIE, 2004).

O sistema analítico é baseado na medição da luminescência emitida pelas bactérias após exposição a uma amostra por um período de 15 ou 30 min medida através de luminômetro (KNIE, 2004).

Em virtude de sua origem marinha, para se testar amostras com baixa concentração de sal, essas bactérias precisam de ajuste de salinidade, o que é usualmente obtido pela adição de cloreto de sódio (UMBUZEIRO et al., 2010).

O teste é rápido, sensível e reprodutível, podendo ser aplicado na análise de água superficial e subterrânea, de efluentes industriais e domésticos, água intersticial de sedimentos, solubilizados de solos contaminados e resíduos sólidos (GIROTTI et al., 2008). Segundo Parvez, Venkataraman e Mukherji (2006), os resultados dos testes com *V. fischeri* apresentam boa correlação com outros testes de toxicidade aguda com organismos aquáticos.

#### **7.8.4 Procedimentos para realização do ensaio ecotoxicológico com *V. fischeri***

Deve ser utilizada a linhagem NRRL B-11177 de bactéria luminescente da espécie *V. fischeri*. As bactérias podem ser adquiridas comercialmente na forma liofilizada e desidratada (e a cultura estoque ser mantida congelada) ou cultivadas em laboratório (mantidas em meio ágar) e armazenadas em freezer a - 20°C, dispensando cuidados diários com a sua manutenção (KNIE, 2004).

De acordo com a NBR 15411, a suspensão-estoque deve conter a bactéria e meio protetor quando o ensaio empregar bactérias recém-cultivadas; bactéria e solução para bactérias desidratadas quando empregar bactérias desidratadas e bactérias e solução de reconstituição quando empregar bactérias liofilizadas. Quando se empregam bactérias desidratadas, as suspensões bacterianas são preparadas a partir de reagentes desidratados comercialmente disponíveis, que podem ser conservados em freezer com temperatura entre - 18°C e - 20°C. As bactérias, após sua reconstituição, começam a emitir luz imediatamente e estão prontas para utilização no ensaio (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2012).

Geralmente o teste com fotobactérias é executado em aparelhos específicos, como o Microtox® e Lumistox®. Os sistemas consistem em um luminômetro com unidade integrada de comando e medição, e um termobloco que no sistema Microtox® é embutido no luminômetro. Os procedimentos de execução do ensaio, tais como

sequência da colocação da amostra, período de incubação, leitura da luminescência e cálculo dos resultados são gerenciados pelo próprio equipamento (KNIE, 2004).

O teste é preparado e executado no termobloco (ou outra incubadora adequada) com temperatura constante de  $15 \pm 1^\circ\text{C}$ . Durante o ensaio, a temperatura entre os recipientes de teste não deve variar mais que  $0,2^\circ\text{C}$  (KNIE, 2004).

O teste consiste em reidratar a bactéria e fazer a leitura da intensidade de luz inicial (sem contato com a substância tóxica ou amostra) e, em outra etapa, fazer a leitura da intensidade da luz após o contato com a amostra ou substância de interesse em um tempo padronizado pelo teste em que as bactérias ficaram expostas à amostra-teste. A perda de luminescência indica que substâncias tóxicas interferiram negativamente no sistema enzimático das bactérias.

### **7.8.5 Preparo das amostras**

Inicialmente são medidos o pH, o oxigênio dissolvido, a condutividade e a salinidade da amostra. Se o pH da amostra estiver entre 6 e 8,5, em geral o ensaio pode ser executado sem correção do pH. Quando houver necessidade, o pH pode ser ajustado com HCl ou NaOH 1N, sendo que a solução de ácido ou base adicionada não deve exceder 5% do volume total da amostra (KNIE, 2004).

A amostra deve ter salinidade mínima de 20 g/L de cloreto de sódio (NaCl) ou correspondente concentração de outros sais com equivalente osmolaridade. Portanto, em amostras com salinidade inferior, é necessário adicionar NaCl até atingir essa concentração. Amostras com concentração de NaCl ou equivalentes entre 20 e 50 g/L podem ser testadas sem qualquer ajuste. Amostras com concentrações acima de 50 g/L de NaCl podem causar efeitos hiperosmóticos e devem ser diluídas, porém, essa pré-diluição da amostra precisa ser considerada na avaliação do resultado do teste (KNIE, 2004).

A fim de que as bactérias possam desenvolver satisfatoriamente sua capacidade de emitir luz, é necessária uma concentração de oxigênio dissolvido maior que 0,5 mg/L. Assim, amostras com concentração de oxigênio abaixo desse valor ou com alta demanda de oxigênio podem ter efeito inibitório sobre a luminescência, dando a impressão de serem tóxicas, independente da eventual presença de substâncias nocivas (KNIE, 2004).

Em amostras com cor, comuns na indústria têxtil, de papel e pigmentos, os corantes absorvem parte da luz emitida pelas bactérias, levando a falsos resultados. Por isso, durante a preparação da série de diluições é importante observar se existe cor visível nas diluições-teste. Se for o caso, ao final do ensaio, é preciso verificar se a cor



influencia na medição da luz emitida pelas bactérias por meio de um procedimento específico, a correção de cor (KNIE, 2004).

Antes de iniciar a preparação das soluções-teste, a amostra e a água de diluição devem ser colocadas em banho de gelo. Nos ensaios com bactérias luminescentes, as diluições da amostra sofrem mais uma diluição ao serem adicionadas à suspensão de bactérias. Via de regra, são misturados volumes iguais de suspensão bacteriana e de amostra (pura ou diluída), resultando numa diluição com fator igual a 2. Não é possível testar a amostra bruta, pois em função do volume da suspensão bacteriana ocorre automaticamente certa diluição. As diluições são preparadas diretamente nas cubetas de teste, sendo preparadas com auxílio de micropipetas (KNIE, 2004).

### 7.8.6 Expressão de resultados

O  $FT_{BL}$  representa o menor valor de FD (Fator de diluição) da série de diluições da amostra, no qual a porcentagem de inibição da luminescência, após o tempo de exposição (t) é inferior a 20% (KNIE, 2004).

O valor de CE (I) corresponde à concentração nominal da amostra, no início do ensaio, que causa determinada porcentagem de inibição da luminescência. Nos ensaios com fotobactérias, em geral, são determinados os valores da CE (I)20 (20% de inibição), e da CE (I)50 (50% de inibição) e, em alguns casos, da CE (I)80 (80 % de inibição). Para amostras ambientais, os valores são expressos em porcentagem (%), e para amostras de concentração conhecida, em mg/L (KNIE, 2004).

### 7.8.7 Teste de sensibilidade

O teste de sensibilidade é executado nas mesmas condições do teste definitivo, a partir de uma solução estoque da substância de referência de concentração conhecida. Segundo a NBR 15411, dicromato de potássio, 3,5 diclorofenol e sulfato de cobre heptahidratado são utilizados como substâncias de referência para esse teste (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2012).

De acordo com a norma ISO 11348 (partes 1 e 2), as bactérias preparadas frescas e preservadas em meio líquido devem apresentar entre 20 a 80% de inibição da luminescência, após 30 min de contato com as substâncias de referência nas seguintes concentrações: 6 mg/L de 3,5-diclorofenol; 2,2 mg/L de sulfato de zinco heptahidratado e 4 mg/L de dicromato de potássio. Para bactérias liofilizadas, conforme a ISO 11348 (parte 3), para as mesmas substâncias, consideram-se respectivamente os seguintes valores: 3,4 mg/L; 2,2 mg/L e 18,7 mg/L (KNIE, 2004).

## 7.9 Conclusões

Os micro-organismos podem servir como indicadores no monitoramento ambiental de duas formas, basicamente. Quando os próprios micro-organismos são os poluentes ambientais, indicando a liberação de contaminantes decorrentes da ocupação de uma determinada área, como ocorre por exemplo com esgotos liberados no ambiente sem tratamento prévio. Porém, micro-organismos estão integrados nos mais diversos ecossistemas de várias formas, exercendo papéis fundamentais nas cadeias tróficas. Poluentes podem prejudicar estes micro-organismos, trazendo consequências para estes ecossistemas. Com o conhecimento do papel destes micro-organismos nestes ecossistemas, eles se tornam uma ferramenta valiosa para a identificação de poluentes capazes de causar danos à saúde humana e ao ambiente.

## Referências

AOYAMA, K.; IWAHORI, k.; MIYATA, N. Application of *Euglena gracilis* cells to comet assay: evaluation of DNA damage and repair. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 538, no. 1-2, p. 155-162, 2003.

ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R. Indicadores biológicos de qualidade do solo. *Bioscience Journal*, Uberlândia, v. 23, n. 3, p. 66-75, 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15411**: Ecotoxicologia aquática - determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de *Vibrio fischeri* (ensaio de bactéria luminescente). Rio de Janeiro, 2012.

BABUJIA, L. C. et al. Microbial biomass and activity at various soil depths in a Brazilian oxisol after two decades of no-tillage and conventional tillage. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v. 42, n. 12, p. 2174-2181, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 239, 14 dez. 2011. Seção 1, p. 39/46.

CONAMA. Resolução nº 3, de 28 de junho de 1990. Dispõe sobre padrões de qualidade do ar, previstos no PRONAR. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 ago. 1990. Seção 1, p. 15937-15939.

COTELLE, S.; FÉRARD, J. F. Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 34, no. 4, p. 246-255, 1999.

DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. (Org.). **Genética toxicológica**. 1. ed. Porto Alegre, Alcance, 2003.

DIAS, R. J. P.; WIELOCH, A. H.; D'AGOSTO, M. The influence of environmental characteristics on the distribution of ciliates (Protozoa, Ciliophora) in na urban stream of southeast Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 68, n. 2, p. 287-295, 2008.

FERRO, Y. et al. Development of a biosensor for environmental monitoring based on microalgae immobilized in silica hydrogels. **Sensors**, Basel, v. 12, no. 2, p. 16879-16891, 2012.

GIROTTI, S. et al. Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdamv, v. 608, no. 1, p. 2-29, 2008.

GRAVILESCU, M. et al. Emerging pollutants in the environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. **New Biotechnology**, Amsterdam, v. 32, no. 1, p. 147-156, 2015.

HERNANDO, M. D. et al. Application of ring study: water toxicity determinations by bioluminescence assay with *Vibrio fischeri*. **Talanta**, Amsterdam, v. 69, no. 2, p. 370-376, 2006.

HUGGETT, R. J. et al. **Biomarkers**: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton: Lewis, 1992.

ISO 11348-1,2 and 3. **Water quality - determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test)**. Genebra, Suíça, 2007.

JENNINGS V. L. K.; RAYNER-BRANDES, M. H.; BIRD, D. J. Assessing chemical toxicity with the bioluminescent photobacterium (*Vibrio fischeri*): a comparison

of three commercial systems. **Water Research**, Oxford, v. 35, n. 14, p. 3448-3456, 2001.

KNIE, J. L. W. **Testes ecotoxicológicos**: métodos, técnicas e aplicações. Florianópolis: FATMA/GTZ, 2004.

MADIGAN, M. et al. **Brock Biology of microorganisms**. 13<sup>th</sup> ed. Boston: Benjamin Cummings, 2012.

MARINŠEK-LOGAR, R.; VODOVNIK, M. **The applications of microbes in environmental monitoring**. Badajoz: A. Méndez-Vilas, 2007.

MARTINS, S. M. A.; KÄFFER, M. I.; LEMOS, A. Liqueus como bioindicadores da qualidade do ar numa área de termoeletrica, Rio Grande do Sul, Brasil. **Hoehnea**, São Paulo, v. 35, n.3, p. 425-433, 2008.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

PARVEZ, S.; VENKATARAMAN, C.; MUKHERJI, S. A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. **Environment International**, Oxford, v. 32, no. 2, p. 265-268, 2006.

SANTOS, R. M. S.; SANTOS, M. F. Quimioluminescência e bioluminescência. **Química Nova**, São Paulo, v. 16, n. 3, p. 200-210, 1993.

SILVA, B. R. S. et al. Qualidade do ar da cidade de Campina Grande-PB, por meio do método spore-fall. **Biofarm**, Campina Grande, v. 10, n. 1, p. 1-7, 2014.

SILVEIRA, A. P. D. Ecologia de fungos micorrízicos arbusculares. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa, 1998. p. 61-87.

STEINBERGER, S. M. et al. A review of environmental applications of bioluminescence measurements. **Chemosphere**, Hackensack, v. 30, no. 11, p. 2155-2197, 1995.

THERON, J.; CLOETE, T. E. Emerging waterborne infections: contributing factors, agents and detection tools. **Critical Reviews in Microbiology**, London, v. 28, no. 1, p. 1-26, 2002.

THOMPSON, H. M.; LANGTON, S. D.; HART, A. D. M. Prediction of inter-species differences in the toxicity of organophosphorus pesticides to wildlife - a biochemical approach. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Amsterdam, v. 111, no. 1, p. 1-12, 1995.

UMBUZEIRO, G. A. et al. Influência da sacarose e do cloreto de sódio na avaliação da toxicidade de amostras ambientais para *V. fischeri*. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, Itajaí, v. 5, n. 1, p. 71-73, 2010.

WHITE, D. **The physiology and biochemistry of prokaryotes**. 2nd ed. New York: Oxford University, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for drinking-water quality**. 14th. Washington, D.C., 2011.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática**: princípios e aplicações. 2. ed. São Carlos: Rima, 2008.

ZAMONER, M. Biondicadores, relatores ambientais. In: \_\_\_\_\_. **Biologia ambiental**. Curitiba: Protexto, 2007. p. 432

ZHANG, R. G. et al. Structure of a bacterial quorum-sensing transcription factor complexed with pheromone and DNA. **Nature**, v. 417, no. 6892, p. 971-974, 2002.

# Prospecção biotecnológica para a produção de enzimas microbianas

---

Alessandra Tenório Costa, Adriana Garcia, Vânia Specian, João Alencar Pamphile

## 8.1 Introdução

Enzimas são biomoléculas necessárias para as várias funções químicas que mantêm a vida. Elas aceleram todos os processos metabólicos (biocatalisadores), realizam uma tarefa específica, sendo altamente eficiente, o que pode aumentar as taxas de reações. Grande parte das enzimas é proteínas, com exceção de algumas moléculas de RNA descobertas em 1980, que podem atuar como enzimas. Essas moléculas denominadas de ribozimas são responsáveis por catalisar uma série de reações químicas.

As enzimas possuem elevado grau de especificidade sobre seus substratos, acelerando reações específicas, não sendo alteradas ou consumidas durante o processo. A integridade e a formação proteica de uma enzima regem sua atividade catalítica, que é perdida em caso de desnaturação ou dissociação em subunidades, dessa forma suas estruturas proteicas primária, secundária, terciária e quaternária são essenciais ao seu funcionamento e ativação.

Para serem ativadas, as enzimas requerem um grupo químico ou componente adicional conhecido como cofator, além de seus resíduos de aminoácidos. Cofatores podem ser íons inorgânicos como  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  ou  $\text{Zn}^{2+}$ , ou mesmo uma coenzima, que se liga covalentemente à parte proteica da enzima formando um grupo prostético. Em alguns casos, a enzima necessita de ambos os fatores para sua ativação. Essa enzima completa, ativa, pela união à sua coenzima e/ou íons metálicos é denominada holoenzima.

O interesse por micro-organismos como fonte de produtos químicos comercialmente úteis, antibióticos e enzimas, tem sido reconhecido há tempos. Jokichi Takamine (1894 e 1914) foi o primeiro a verificar a possibilidade do uso de técnicas para obtenção de enzimas produzidas por fungos e aplicá-las à indústria. No caso da produção de enzimas bacterianas, o pioneirismo ocorreu em 1917 com Boidin e Effront.

(DUZA; MASTAN, 2013). Cabe ressaltar que as enzimas microbianas são mais estáveis do que as de plantas e animais, com uma produção conveniente e segura.

A importância dos micro-organismos na produção enzimática ocorre pela sua alta capacidade de produção, baixo custo e susceptibilidade à manipulação genética. As enzimas de origem microbiana são de grande interesse biotecnológico no processamento de alimentos, fabricação de detergentes, têxteis, produtos farmacêuticos, terapia médica e em biologia molecular. Um único micro-organismo pode produzir mais de 1.000 enzimas diferentes, por isso, um longo período de experimentos em laboratório pode ser necessário para isolar o melhor micror-organismo para a produção de um determinado tipo enzimático.

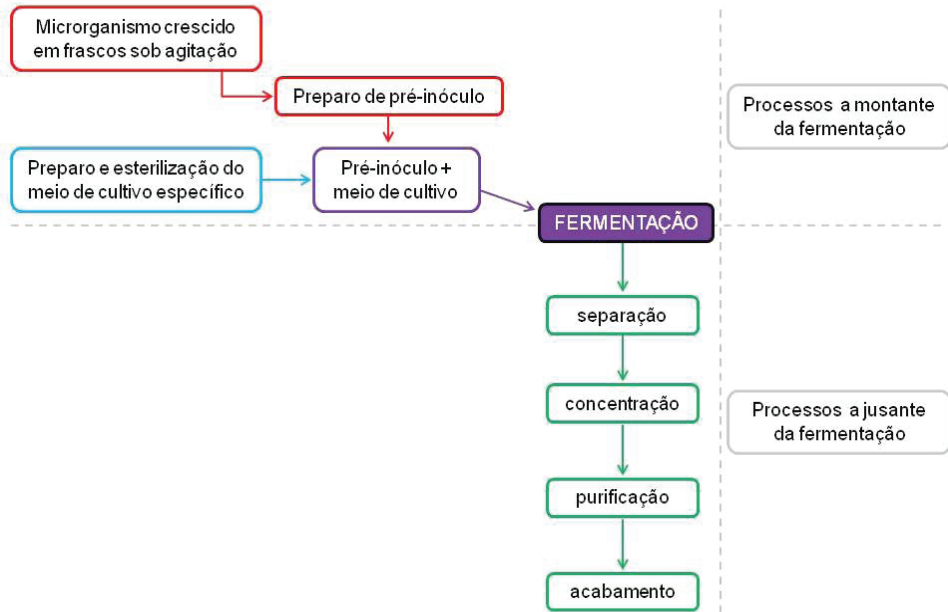
Na indústria, a geração de enzimas ocorre pelo processo de fermentação. Existem dois métodos de fermentação utilizados para a produção enzimática; a fermentação submersa e a fermentação em estado sólido. A fermentação submersa envolve a produção de enzimas por micro-organismos em um meio líquido e, a fermentação em estado sólido, o cultivo de micro-organismos e consequente produção de enzimas ocorrendo sobre um substrato sólido. Essas enzimas são recuperadas por métodos de centrifugação, para as produzidas extracelularmente e, lise das células, para as intracelulares.

Na fermentação submersa utilizada em escala industrial, para a produção de enzimas por micro-organismos, são empregados fermentadores com grande capacidade de volume. Esse tipo de fermentação também é realizada em laboratório, com o uso de frascos (erlenmeyers) e agitadores de bancadas (Figura 1).

Para ser considerado um micro-organismo ideal para um processo de produção enzimática, o mesmo deve apresentar as seguintes características, segundo Bon et al. (2008):

- ser seguro sob o ponto de vista biológico, ou seja, não ser patogênico;
- apresentar elevada capacidade de síntese e excreção da enzima;
- suportar condições ambientais adversas, relacionadas com a pressão osmótica e a temperatura;
- ser tolerante à presença de substâncias tóxicas, que podem ser geradas no processo de tratamento da matéria-prima ou pelo próprio metabolismo celular.

Diversos micro-organismos endofíticos, como fungos e bactérias, produzem enzimas hidrolíticas extracelulares. No caso dos fungos endofíticos, essa produção faz parte de seu mecanismo de superação da defesa do hospedeiro contra a invasão microbiana e/ou para obtenção de nutrientes para seu desenvolvimento. Quanto às bactérias endofíticas, a produção enzimática ajuda na penetração dos tecidos vegetais.



**Figura 1** - Fluxograma simplificado da produção de enzimas microbianas utilizando o processo de fermentação submersa.

Fonte: Orlandelli et al. (2012).

Segundo Azevedo et al. (2000), endófitos são micro-organismos que vivem no interior de todos os tecidos vegetais sem provocar qualquer prejuízo a hospedeira. Para que um micro-organismo se estabeleça como endofítico, com sucesso na planta, diversas barreiras físicas e químicas devem ser superadas (Figura 2). Segundo Kusari, Hertweck e Spiteller (2012), a hipótese de antagonismo balanceado estabelece que o endófito consiga evitar as respostas de defesa de sua hospedeira antes de ser incapacitado por metabólitos tóxicos da planta, estabelecendo assim uma colonização assintomática. Micro-organismos endofíticos e patogênicos possuem fatores de virulência que são combatidos pelos mecanismos de defesa da planta. Se a virulência do patógeno e a defesa da planta permanecem equilibradas, a associação permanecerá aparentemente assintomática e avirulenta. Se a planta sucumbe à virulência do patógeno, uma relação planta-patógeno sintomática é estabelecida. Contudo, de acordo com Kusari, Hertweck e Spiteller (2012), a interação endófito-planta pode não ser apenas o equilíbrio entre virulência e defesa, mas uma relação muito mais complexa e bem controlada (Figura 2).





de enzimas, amplamente utilizadas em uma série de indústrias. As principais fontes de proteases são animal, vegetal e microbiana (ALNAHDI, 2012).

As proteases possuem propriedades diferentes, tais como especificidade do substrato, sítio ativo, mecanismo catalítico, pH, temperatura ótima e perfis de estabilidade (JISHA et al., 2013). Baseado no seu comportamento ácido-base elas são classificadas em três grupos: proteases ácida, neutras e alcalinas. As proteases ácidas têm melhor desempenho na faixa de pH entre 2.0-5.0, sendo produzidas principalmente por fungos. As neutras têm melhor desempenho na faixa de pH 7.0 ou em torno de 7.0, sendo principalmente de origem vegetal, enquanto as alcalinas têm atividade ótima na faixa de 8.0 ou acima e são produzidas a partir de micro-organismos (ALNAHDI, 2012).

As proteínas são degradadas por micro-organismos, que utilizam os produtos dessa degradação como nutrientes para a sua subsistência. A degradação é iniciada por proteinases (endopeptidases) secretadas por micro-organismos, seguida pela hidrólise adicional por peptidases (exopeptidases) em locais extra ou intracelulares. Dependendo da espécie ou cepas, os micro-organismos produzem uma variedade de proteases (JISHA et al., 2013).

Existem dois tipos de proteases secretadas, as intracelulares e as extracelulares. As proteases intracelulares são importantes para manter vários processos celulares e metabólicos, tais como a esporulação e a diferenciação celular, maturação enzimática e hormônios, dentre outros. Já as proteases extracelulares realizam a hidrólise de proteínas em meios fermentados e permitem que a célula absorva e utilize os produtos hidrolíticos (JISHA et al., 2013).

A maioria das proteases comercialmente aplicáveis é alcalina e biossintetizada principalmente por bactérias, tais como, *Bacillus*, *Clostridium* e *Pseudomonas* e alguns fungos (NIGAM, 2013). As proteases fúngicas podem ser produzidas no processo de fermentação em estado sólido, podendo ser utilizadas para modificar proteínas alimentares.

Várias espécies de *Bacillus* estão envolvidas na produção de proteases, por exemplo, *B. cereus*, *B. sterothermophilus*, *B. mojavensis*, *B. megaterium* e *B. subtilis*. Este gênero é uma considerável fonte de proteases alcalinas industriais, contendo representantes no solo e na água, com certos isolados tolerando condições ambientais extremas (ALNAHDI, 2012).

As proteases alcalinas microbianas têm uma variedade de aplicações, principalmente em detergentes, beneficiamento de couro, recuperação de metal, com o propósito médico, processamento de alimentos, rações, produtos químicos indústrias, bem como, no tratamento de resíduos.

Melo, Campos-Takaki e Silva (2015) avaliaram o potencial de três amostras de *Bacillus licheniformis* (UCP 1010, 1020 e 1022), isoladas do porto da cidade do Recife, Pernambuco, quanto à produção de protease em meio sólido utilizando diferentes temperaturas (28, 37, 45 e 50°C) e a seleção de meios de produção de protease por meio de fermentação submersa. Os resultados revelaram que a amostra UCP 1020 obteve o maior halo característico de produção enzimática (3,5 cm) na temperatura de 37°C. Na análise de produção por meio da fermentação submersa, os autores verificaram que, o meio denominado de 3 (contendo extrato de carne; peptona; NaCl; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e CaCl<sub>2</sub>) foi o que apresentou maior atividade (30,45 U L<sup>-1</sup>).

A atividade proteolítica de 98 fungos endofíticos, isolados da planta medicinal *Piper hispidum* Sw. (Piperaceae), conhecida no Brasil como ‘jaborandi’ ou ‘falso-jaborandi’, foi avaliada por Orlandelli et al. (2015). Para isso, os fungos foram cultivados em meio indutor líquido com ou sem substratos adicionais e avaliados pela formação de halo de degradação. Os resultados mostraram que do total de fungos endofíticos avaliados 28 apresentaram atividade proteolítica quando crescidos em meio indutor, sendo que os endófitos *Phoma herbarum* JF766995 e *Schizophyllum commune* JF766994 se destacaram quanto à atividade proteolítica, apresentando os maiores diâmetros de halo enzimático sob, pelo menos, uma condição de cultura testada. O aumento das atividades de determinados isolados na presença dos substratos arroz ou farinha de soja sugeriu que estes endófitos têm potencial para a produção de enzimas que utilizam resíduos agrícolas.

## 8.2.2 Celulase

Celulases são enzimas que hidrolisam ligações β-1,4 em cadeias de celulose. A celulose é um dos mais importantes polissacarídeos e o principal componente da parede das células vegetais. Os micro-organismos sintetizam celulose com maior pureza e hidrofiliidade do que as produzidas pelas plantas, não contendo lignina ou hemiceluloses. Além de plantas e micro-organismos (bactérias e fungos), protozoários e animais também sintetizam celulose.

Na natureza, a hidrólise completa da celulose é mediada por uma combinação de três tipos principais de celulases: endoglucanases (clivam ligações internas da fibra celulósica), exoglucanases, incluindo celobiohidrolases (atuam na região externa da celulose, removendo unidades de celobiose a partir das extremidades da cadeia celulósica) e β-glicosidase (hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose, quebrando a celobiose em duas unidades de glicose) (SANTOS; GOUVEIA, 2009).

Entre as características importantes do complexo celulolítico está o seu efeito sinérgico, ou seja, os diferentes grupos de enzimas apresentam melhor rendimento quando atuam em conjunto. Celulases podem sofrer influência de outras moléculas, principalmente metais, como  $Hg^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Ag^{+}$  e  $Zn^{2+}$ , que apresentam capacidade de inibir ou induzir a produção enzimática (CASTRO; PEREIRA JR., 2010).

Os micro-organismos produtores de celulases podem ser aeróbicos, anaeróbicos, mesófilos ou termofílicos. As espécies bacterianas *Cellulomonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Actinobacterias* e as fúngicas *Aspergillus*, *Humicola*, *Trichoderma* e *Penicillium*, possuem grande importância para a pesquisa e indústria, por apresentarem vantagem seletiva sobre outras espécies. *H. insolens*, *Thermomono sporafusca*, *A. niger*, *T. reesei* e algumas outras espécies são exploradas para fins industriais. A celulase fúngica é menos complexa do que a bacteriana. A fúngica é produzida em grande quantidade extracelularmente. O gênero *Trichoderma* é responsável por uma produção de celulase com elevada atividade enzimática em comparação com outros gêneros (PIRZADAH et al., 2014).

As enzimas celulolíticas têm demonstrado seu potencial biotecnológico em várias indústrias, incluindo alimentos, ração animal, fabricação de cerveja e vinho, agricultura, refino de biomassa, papel e celulose, têxtil e lavanderia. Nos últimos anos, o interesse em celulases tem aumentado pela sua aplicação na produção de bioenergia e biocombustíveis.

Onofre et al. (2014) avaliaram a produção de celulase de quatro linhagens endofíticas de *Trichoderma reesei* isoladas de alecrim-do-campo, em meios semissólidos contendo bagaço de cana, suplementados ou não com sais. As enzimas foram caracterizadas pelo seu pH ótimo e temperatura de atividade e estabilidade após incubação na presença de íons e variações de pH e temperatura. Os resultados mostraram que as linhagens endofíticas FB1, FB2, FB3 e FB4 de *T. reesei* produziram celulases em meio com bagaço de cana, suplementados ou não com sais, em pH 5,5 a 30°C. O meio suplementado mostrou-se mais adequado para induzir a produção de celulase após 29 dias de fermentação, com FB4 obtendo o melhor rendimento, cerca de  $16,32 \pm 2,65$  UI / grama de substrato fermentado.

### 8.2.3 Xilanase

Xilanases são enzimas normalmente encontradas em micro-organismos, algas marinhas, protozoários, caracóis, crustáceos, insetos, sementes, plantas e outras fontes naturais. Sua função principal é hidrolisar moléculas de hemicelulose por meio da conversão de um dos seus componentes,  $\beta$ -1,4 xilana em um açúcar simples denominado de xilose.

A hidrólise completa das xilanas possui alto grau de complexidade e, por consequência, requer grande variedade de enzimas que agem em conjunto, são elas: endo- $\beta$ -1,4-xilanases,  $\beta$ -1,4-xilosidases, exoxilanases,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases e  $\alpha$ -D-glucuronidases, sendo cada uma responsável pela hidrólise de um tipo de xilana (POLIZELI et al., 2005).

Os micro-organismos podem produzir múltiplas xilanases, com propriedades físico-químicas e estruturais diversas, além de atividade e rendimentos específicos, o que pode contribuir para o aumento na eficiência da hidrólise e na complexidade enzimática. Diversos fungos filamentosos exibem elevada capacidade de degradação de xilana, uma vez que estes possuem múltiplas enzimas de famílias diferentes. *Aspergillus ochraceus* produz pelo menos três xilanases independentes, *T. reesei* produz seis e os fungos *Talaromyces versatilis* produzem quatro xilanases independentes com várias propriedades (LIAO et al., 2015).

Fungos dos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Pichia* são considerados grandes produtores de xilanases. Embora as xilanases de origem bacteriana apresentem considerável estabilidade e temperatura ótima mais elevada, em relação às dos fungos, a quantidade de enzima produzida por bactérias é comparativamente menor do que aquelas produzidas por fungos (PATEL; SAVANTH, 2015).

O interesse pelas xilanases vem aumento pelas suas aplicações biotecnológicas para produção de pentose, clarificação de suco de fruta, bioconversão de resíduos agrícolas lignocelulósicos em combustíveis e produtos químicos, indústrias de alimentos, celulose, papel, têxtil e ração animal.

Yasinok, Sahin e Haberal (2008) estudaram dois isolados endofíticos de *Bacillus pumilus* denominados M1 e M2, obtidos de partes do caule e folhas de milho, quanto aos níveis de produção de xilanase, utilizando espigas de milho como subproduto agrícola. Os resultados mostraram que os níveis de produção de xilanase variaram entre os isolados, com nível máximo de produção de  $188,0 \pm 20,0$  U/ml para *B. pumilus* (M1) e  $5,6 \pm 1,1$  U/mL para *B. pumilus* (M2), em meio líquido contendo 3% de espigas de milho como única fonte de carbono e indutor.

## 8.2.4 Amilase

A amilase é uma enzima que catalisa a quebra de amido em açúcares, estando amplamente distribuída na natureza, principalmente em grãos, cereais, tubérculos e raízes. Elas são derivadas de diversas fontes, tais como plantas, animais e de algumas bactérias. No entanto, as derivadas de micro-organismo apresentam maior aplicação biotecnológica e industrial (GURUNG et al., 2013). A grande vantagem da utilização

de micro-organismos para a produção de amilase é sua capacidade de produção em massa e de sua fácil manipulação genética na obtenção de enzimas com características desejáveis.

A primeira amilase, designada de diástase, foi descoberta e isolada em 1833. Todas essas enzimas são glicosídeo hidrolases e agem em ligações do tipo  $\alpha$ -1,4-glicosídicas. As amilases são divididas em três subclasses:  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , sendo essa classificação baseada no tipo de ligação. As  $\alpha$ -amilases são enzimas que ajudam na hidrólise de ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas internas do amido em produtos de baixo peso molecular, como a glicose, maltose e unidades de maltotriose. As  $\beta$ -amilases (1,4- $\alpha$ -D-glucana maltohidrolases, glicogenases e amilase sacarogênica) são sintetizadas por bactérias, fungos e plantas. Atuando a partir da extremidade não redutora, a  $\beta$ -amilase catalisa a hidrólise da segunda ligação  $\alpha$ -1,4 glicosídica, clivando duas glicoses (unidades de maltose) de uma só vez. Já as  $\gamma$ -amilases (glucano 14-  $\alpha$ -glucosidase, amiloglucosidase, exo-14-  $\alpha$ -glucosidase, glucoamilase; lisosomal  $\alpha$ -glucosidase e 1,4- $\alpha$ -D-glucano glucohidrolase) clivam ligações  $\alpha$  (1-6) glicosídicas, bem como as últimas ligações  $\alpha$  (1-4) glicosídicas na extremidade não redutora da amilose e amilopectina, produzindo glicose (GURUNG et al., 2013).

Enzimas amilolíticas termoestáveis têm sido estudadas para melhorar o processo de degradação de amido industrial. *Bacillus subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis* e *B. amyloliquefaciens* são bons produtores de  $\alpha$ -amilase termoestável, sendo que as amilases termoestáveis de *B. stearothermophilus* ou *B. licheniformis* são utilizadas em indústrias de processamento de amido (GURUNG et al., 2013). Uma  $\alpha$ -amilase denominada 'Termamyl' sintetizada por *B. licheniformis*, também é utilizada em alguns detergentes.

Amilases halofílicas produzidas por micro-organismos em sua maioria halobactérias que vivem em ambientes extremos são termotolerantes e permanecem estáveis em temperatura ambiente por um longo período. Essas enzimas são extraídas de algumas bactérias, tais como *Chromohalobacter* sp., *Halobacillus* sp., *Haloarcula hispanica*, dentre outras.

As amilases de origem fúngica são produzidas pela maioria dos fungos mesófilos. Essas enzimas estão limitadas a isolados terrestres, principalmente *Aspergillus* e *Penicillium* (GURUNG et al., 2013). Espécies de *Aspergillus* geralmente produzem uma variedade de enzimas extracelulares, sendo as amilases uma das que apresentam maior valor industrial. *A. oryzae* tem sido muito utilizado na produção de alimentos, como molho de soja e ácido orgânico (ácido cítrico e acético) e enzimas comerciais, incluindo  $\alpha$ -amilase. *A. niger* tem importante capacidade hidrolítica com a produção de  $\alpha$ -amilase. O fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus* é um excelente produtor de amilase.

As amilases possuem extensas aplicações comerciais no processamento de amido, sendo utilizadas principalmente na indústria alimentícia para a preparação de cervejas, geleias, obtenção de glicose livre para os mais diversos propósitos, e, também nas indústrias têxteis e na fabricação de detergentes. Para cada uma dessas funções a enzima requer propriedades únicas no que diz respeito à especificidade, estabilidade e dependência aos valores de pH e temperatura (ABDEL-FATTAH et al., 2013).

### 8.2.5 Lipases e esterases

Lipases são definidas como carboxilesterases que hidrolisam acilgliceróis de cadeia longa, constituída por mais de dez átomos de carbono, enquanto as esterases são enzimas que apresentam a capacidade de hidrolisar apenas acilgliceróis de cadeia com menos de dez carbonos (MESSIAS et al., 2011).

As lipases catalisam reações de substratos insolúveis em água, quebrando gorduras e óleos contendo triacilgliceróis e liberando ácidos graxos livres de cadeia longa, ou seja, ligações ésteres tríplexes. No caso das esterases, elas atuam sobre um único tipo de ligação éster, liberando ácidos graxos de baixo peso molecular. A maioria das lipases pode hidrolisar os substratos de esterases, contudo a reação inversa não ocorre.

As lipases são consideradas o principal grupo de enzimas com valor biotecnológico, principalmente pela sua versatilidade, propriedades aplicadas e fácil produção de massa. As enzimas de origem microbianas são extremamente diversificadas em suas propriedades enzimáticas e especificidade para o substrato, o que as tornam potenciais fontes de aplicação industrial. Fungos e bactérias podem secretar lipases para propiciar a absorção de nutrientes a partir do meio externo, ou, no caso de micro-organismos patogênicos, para promover a invasão de um novo hospedeiro (GURUNG et al., 2013).

Segundo Villeneuve et al. (2000), existem três motivos principais para a crescente pesquisa com lipases: o primeiro está relacionado a sua função catalítica e propriedade de ativação na presença de substratos insolúveis em água e emulsionados, isto é, na presença de uma interface lipídeo/água. Essa capacidade é pelas características estruturais únicas das lipases, que são ativadas na presença de ésteres emulsionados.

A segunda razão está ligada a sua relevância médica, especialmente em relação à arterosclerose e à hiperlipidemia, uma vez que, alguns produtos da lipólise, tais como ácidos graxos livres e diacilgliceróis têm papéis cruciais na regulação e no

metabolismo celular, principalmente como mediadores na ativação e transdução de sinal celular.

Por fim, a terceira razão foi a descoberta de que as lipases não atuam somente na hidrólise, mas em diversas reações com alta especificidade, estabilidade e condições reacionais brandas, incluindo as reações de esterificação, transesterificação, lactonização, acilação regioseletiva e aminólise, em presença de pouca quantidade de água, a fim de deslocar o equilíbrio termodinâmico no sentido da síntese. Dessa forma, sua especificidade e regioseletividade permitem catalisar reações com custos reduzidos sobem condições de pressão e temperaturas moderadas e maior rendimento.

As lipases são enzimas extremamente versáteis com amplo espectro de aplicação na indústria. Os principais gêneros bacterianos produtores são *Pseudomonase* e *Staphylococcus*, sendo o último não indicado para o uso em alimentos, pela possível produção de toxinas (KOBELITZ, 2010). Quanto aos fungos capazes de sintetizar lipases, esses são encontrados em vários habitats, incluindo solos contaminados com resíduos de óleos vegetais, subproduto de laticínios, sementes e comida deteriorada. Destacam-se como importantes produtores de lipases. A *Candida rugosa* conhecida pelo seu diversificado potencial biotecnológico, *Mucor* sp e *Rhizopus homothallicus* que sintetizam lipases extracelulares termoestáveis (GURUNG et al., 2013).

As lipases são aplicadas nas indústrias têxteis, de detergente, comida, diagnose, na medicina, em cosméticos, em biossensores e em processos de biodegradação. As esterases vêm sendo utilizadas na conversão biocatalítica de moléculas, tais como, polímeros de estirenos, alquilbenzenos, derivados de ácido vanílico, catecol e vanilina que é utilizada na indústria farmacêutica e cosmética, e na indústria de papel e celulose no processo de deslignificação, reduzindo a quantidade de produtos químicos necessários à fabricação de papel.

### 8.2.6 Pectinase

Pectinases formam um grupo de enzimas que degradam substâncias pécticas, hidrolisando ligações glicosídicas ao longo da cadeia carbônica. Possuem também propriedades despolimerizantes ou desesterificantes.

Com base nas modificações da cadeia principal, as substâncias pécticas podem ser classificadas como protopectina (substâncias pécticas insolúveis em água que originam substâncias pécticas solúveis); ácido péctico (ácidos poligalacturônicos); ácido pectínico (apresenta propriedade de formar gel na presença de açúcares);



e pectina (nome genérico de misturas pécticas) (PASHA; ANARADHA; SUBBARAO, 2013).

Existem três tipos principais de pectinases: a pectina esterase (desesterificante ou desmetoxilante) responsável pela remoção de grupos metil éster da pectina, liberando metanol e  $H^+$ , convertendo pectina em pectato; despolimerizantes que incluem hidrolases e liases que catalisam a clivagem das ligações glicosídicas de substâncias pécticas; e as protopectinases que solubilizam protopectina formando pectina solúvel altamente polimerizada.

As substâncias pécticas compõem a lamela média e a parede celular dos vegetais por meio de interligações com polissacarídeos estruturais, entre eles a celulose e a hemicelulose, exercendo função adesiva, além de serem responsáveis pelas diferentes texturas das frutas e vegetais no decorrer do seu crescimento, amadurecimento e armazenamento. A pectina também é descrita como fator importante na interação patógeno-planta.

As pectinases foram as primeiras enzimas utilizadas em escala comercial, ainda na década de 1930, na produção de sucos de frutas pela agricultura familiar. Entre suas aplicações industriais pode-se destacar o melhoramento do rendimento de sucos, lavagem de algodão, desmucilagem de planta, tratamento de águas residuais, extração de óleo vegetal utilizados em diversas indústrias como de polpa, têxtil e de alimentos.

Grande variedade de micro-organismos é capaz de produzir enzimas pectinolíticas, incluindo bactérias, fungos filamentosos, leveduras, protozoários, insetos e nematoides. Contudo, devido à fácil produção e à diversidade de pectinases, os fungos filamentosos são os mais empregados para a produção em escala industrial dessas enzimas. Além disso, o pH ideal das pectinases secretadas por fungos aproxima-se do valor de pH de muitos sucos de frutas, na faixa de 3,0 a 5,5. Os fungos filamentosos são as principais fontes dessas enzimas, na maioria dos casos, o fungo *A. niger* é utilizado para a produção industrial (SANTI; BERGER; SILVA, 2014).

Quase todas as enzimas pectinolíticas utilizados para aplicações industriais são produzidas pelos fungos, tais como *Aspergillus* sp., *Aspergillus japonicus*, *Rhizopus stolonifer*, *Alternaria mali*, *Fusarium oxysporum*, *Neurospora crassa*, *Penicillium italicum* ACIM F-152, dentre outros. Algumas espécies de bactérias também produzem essas enzimas, como *Agrobacterium*, *Bacteroides thetaiotamicron*, *Ralstonia solanacearum* e *Bacillus* sp.

### 8.2.7 Quitinases

Quitinases são enzimas encontradas em quase todas as formas de vida, incluindo bactérias, fungos, plantas, insetos, mamíferos e vírus. O substrato da enzima é principalmente quitina, um biopolímero complexo resistente à degradação. A hidrólise de quitina por enzimas quitinolíticas leva à produção de monômeros amplamente empregados na indústria.

A quitina é um polímero constituído de unidade de N-acetil-glicosamina, ligadas entre si por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4. A quitina é, depois da celulose, o polímero mais abundante no planeta. Ela é o constituinte principal do exoesqueleto de crustáceos e insetos e está presente na parede celular de fungos e bactérias (KOBBLITZ, 2010).

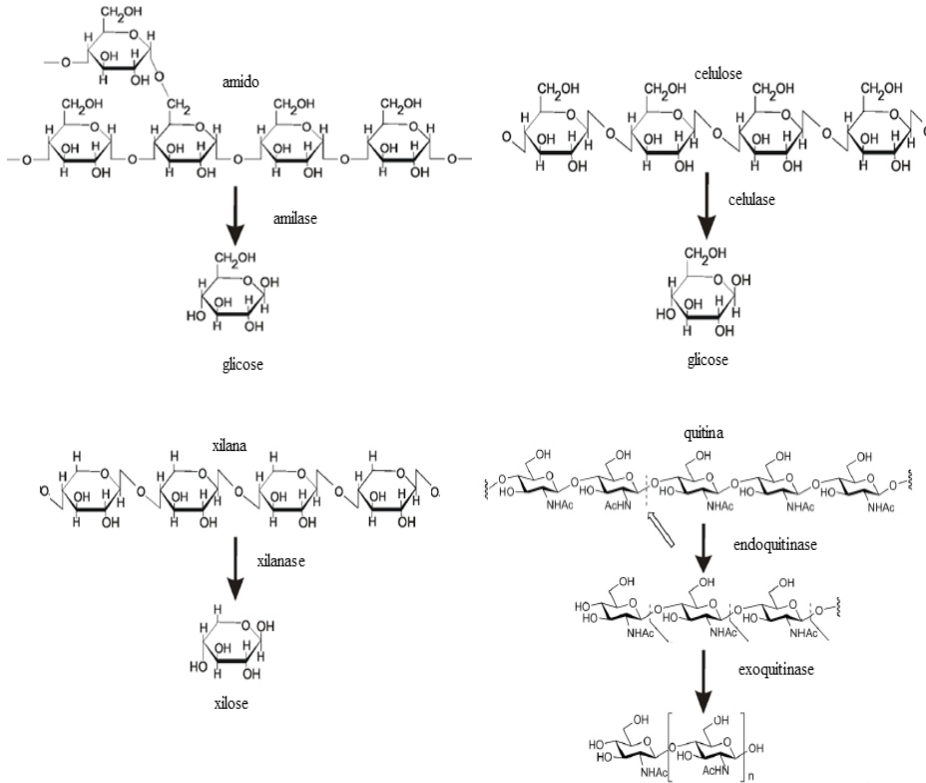
Na natureza, as quitinases bacterianas desempenham funções relacionadas com o parasitismo ou a nutrição do organismo, enquanto em fungos, protozoários e invertebrados, elas também estão envolvidas na morfogênese e em baculovírus na patogênese. Nos vegetais e vertebrados, a atividade quitinolítica está relacionada com os mecanismos de defesa contra patógenos (ISLAM; DATTA, 2015).

Em virtude da sua insolubilidade, tamanho, complexidade molecular e composição heterogênea, a quitina não é degradada no interior da célula, contudo os micro-organismos secretam enzimas com especificidades diferentes para transformar ou hidrolisar quitina. Os micro-organismos produzem quitinases em quantidades mais elevadas do que animais e plantas, em geral como enzimas extracelulares induzíveis que podem ser de dois tipos: endo e exoquitinases.

As quitinases microbianas são produzidas constitutivamente durante o crescimento dos micro-organismos, sendo detectadas em níveis baixos. O acréscimo de quitina ao meio de cultura induz a produção de quitinases. Além de quitina, várias fontes de carbono podem atuar como indutores, dependendo de quem são os produtores de quitinases, são eles: glucosamina, N-acetil-glucosamina, quitobiose, quitooligossacarídeos. Por exemplo, em *Serratia marcescens*, a produção de quitinase é induzida por quitina e reprimida por glicose. Em fungos, a produção de quitinase segue um padrão semelhante ao das bactérias, em *Beauveria brassiana*, *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus fumigatus*, *Lecanicillium lecanii*, *Metharhizium anisopliae* e *Fusarium* (ISLAM; DATTA, 2015).

Uma das principais aplicações das quitinases refere-se ao seu uso para o biocontrole de patógenos de plantas, e para o desenvolvimento de plantas transgênicas. Quitinases também podem ser empregadas na área da saúde humana, tal como fazer preparações oftálmicas e microbicidas.

Na Figura 3 pode- observam-se as vias de degradação pelas enzimas: amilase, celulase, xilanase e quitinase.



**Figura 3** - Estruturas dos polissacarídeos e suas vias de degradação.

Fonte: Hirose, Sunakuza e Omura (2010) e Held (2012).

### 8.3 Prospecção biotecnológica microbiana para a produção enzimática

A avaliação da atividade enzimática de micro-organismos endófitos para a produção de diferentes enzimas pode ser realizada por meio do ensaio de *cup plate*.

No estudo com bactérias (Figura 4), as linhagens a serem testadas devem ser crescidas em tubos contendo meio TSB (caldo tripton de soja) a 28°C durante 48h.

Após este período, as soluções de bactérias precisam ser ajustadas em solução salina 1% para atingir uma concentração de  $1,5 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> (escala de McFarland 0,5). Em seguida, uma alíquota dessas soluções são aplicadas, em quatro pontos equidistantes de 6 mm de diâmetro, perfurados na superfície de meios de cultura sólidos específico para produção de cada enzima nas placas de Petri. Para a produção enzimática, utilizam-se as respectivas fontes de carbono: amilase (extrato de levedura e amido solúvel), celulase (extrato de levedura e carboximetilcelulose), pectinase (extrato de levedura e pectina, pH 8,0), xilanase (extrato de levedura e xilano), lipase/esterase (peptona; NaCl; CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O e ágar; pH 7,4, acrescido de Tween 20 para lipase e Tween 80 para esterase), e protease (triptona; extrato de levedura; glicose; NaCl; ágar; pH 7,0 e leite desnatado) (ARAÚJO et al., 2010). O período de incubação para a detecção da atividade enzimática pode variar de 24 a 168 h a 28°C.

No caso da avaliação da produção enzimática por fungos, esses devem ser previamente cultivados em meio BDA (Batata Dextrose Ágar) por sete dias. Posteriormente, três discos de micélio são cultivados em meio líquido (solução de Manachini), adicionado de substrato indutor e pH ajustado para cada enzima: amilase (amido de milho, pH 6,0); celulase (carboximetilcelulose, pH 5,0); pectinase (pectina cítrica, pH 2,5); protease (gelatina, pH 6,9). A incubação deve ser realizada a 28°C durante 96 ou 120 h. Após esse período as amostras são filtradas com gaze desinfetada, para a separação da massa micelial. Alíquotas do filtrado são aplicados em pontos perfurados na superfície de meios de cultura sólidos (conforme descrito acima) adequados para a detecção de cada enzima em placa de Petri. Para amilase utiliza-se ágar-amido (ágar, amido, tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 5,0); celulase, ágar-CMC (ágar, carboximetilcelulose, tampão acetato de Na, pH 5,0); pectinase, ágar-pectina (ágar, pectina, tampão acetato de Na, pH 5,0); protease, ágar-gelatina-leite (ágar, solução de gelatina, solução de leite desnatado, tampão citrato fosfato, pH 5,0). A detecção da atividade enzimática deve ocorrer após incubação por 24h a 28°C.

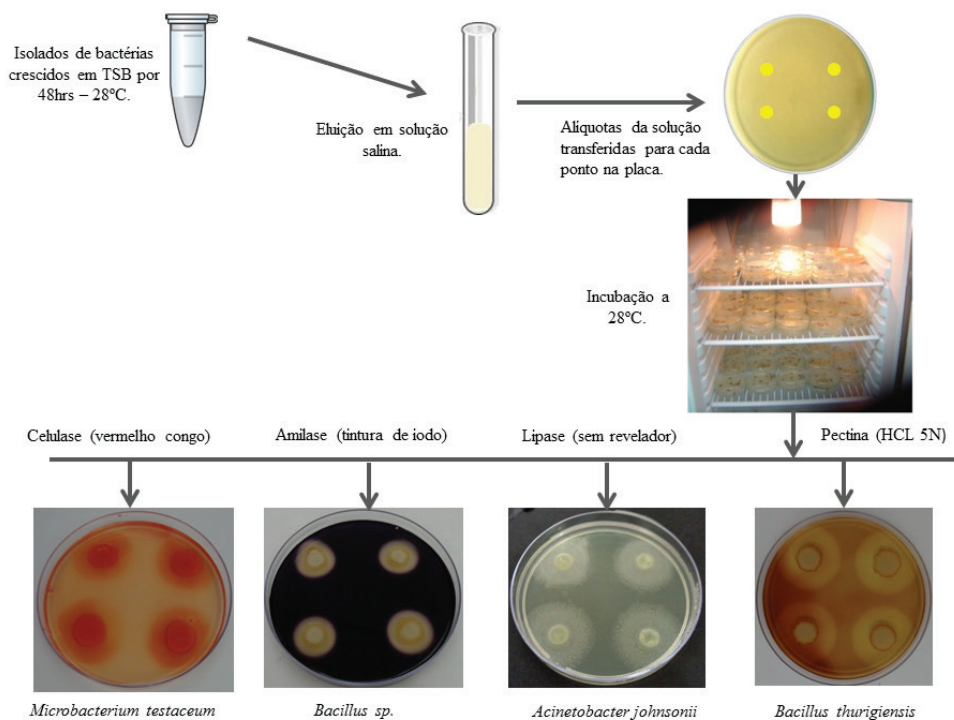
A visualização das atividades enzimáticas é realizada utilizando reveladores específicos para cada meio: celulase (vermelho congo); amilase (tintura de iodo); pectina (HCL 5N); e protease (ácido acético 5%). Para os demais, a utilização de reveladores não é necessária, pois a produção enzimática é caracterizada pela formação de halo de degradação (OLIVEIRA et al., 2006) (Figura 4).

Como controles positivos para o ensaio de *cup plate* são comumente utilizadas as seguintes enzimas comerciais: protease - *Aspergillus oryzae*,  $\alpha$ -amilase - porcina pancreática e pectinase - *Aspergillus niger*.

## 8.4 Perspectivas futuras

### 8.4.1 Aplicação da engenharia genética na otimização da produção enzimática

Diferentes sistemas de enzimas, secretadas por fungos, podem ser otimizados por engenharia de proteínas, suplementação de componentes enzimáticos exógenos ou mesmo por engenharia genética, com a construção de vetores de expressão mais eficientes.



**Figura 4** - Esquema da prospecção de isolados bacterianos produtores de enzimas de interesse industrial.

Fonte: Os autores.

Hu et al. (2015) desenvolveram um sistema de produção e avaliação de proteína no fungo *Penicillium oxalicum*, produtor de celulase. Primeiro, pela deleção do principal gene da amilase, *amy15A*, uma linhagem que produz poucas proteínas extracelulares

foi construída (linhagem  $\Delta 15A$ ). Então, três enzimas lignocelulolíticas (BGL4, Xyn10B e Cel12A), com níveis originalmente baixos de expressão, foram expressas com sucesso com o uso de promotores constitutivos na linhagem  $\Delta 15A$ . A superexpressão de BGL4 e Cel12A resultou no aumento de especificidade na atividade em papel de filtro (FPA), enquanto a superexpressão de Xyn10B ampliou o FPA volumetricamente, mas não quanto à especificidade de FPA.

Bischoff et al. (2015) isolaram três genes codificadores de cutinases (ACUT1, ACUT2 e ACUT3) do DNA genômico de *Arxula adenivorans* LS3. Os três genes foram superexpressados em *A. adenivorans* usando um promotor constitutivo forte (TEF1). Todas as três enzimas recombinantes de *A. adenivorans* (Acut1-6hp, Acut2-6hp e Acut3-6hp) foram ativas em pH 4,5 a 6,5 e entre 20 a 30°C. Elas mostraram instabilidade em condições ótimas de reação, mas puderam ser estabilizadas usando solventes orgânicos, como o polietileno glicol 200 (PEG 200), isopropanol, etanol ou acetona. O PEG 200 (50% v/v) foi o melhor agente estabilizador para todas as cutinases e a acetona aumentou a meia vida e a atividade das enzimas (até 300% para a Acut3-6hp).

#### 8.4.2 Aproveitamento de resíduos agropecuários na produção de enzimas

Considerando a aplicação biotecnológica ambiental, com a minimização dos impactos ambientais advindos da produção de resíduos, outra perspectiva corresponde ao aproveitamento de resíduos agrícolas como substratos para a seleção, isolamento e produção de enzimas fúngicas.

Liao et al. (2012) determinaram a produção de diferentes isoformas de xilanase por *Penicillium oxalicum* GZ-2 inoculado em diferentes resíduos agrícolas: palha de trigo, palha de arroz, palha de milho e farelo de trigo. Os zimogramas produzidos pela análise das enzimas brutas indicaram que a palha de trigo foi o melhor indutor, resultando nas maiores atividades de xilanase (115,2 U/mL) e  $\beta$ -xilosidase (89 um/mL) durante a fermentação submersa. Zhang e Sang (2015) otimizaram a produção e extração de xilanase e  $\beta$ -mananase a partir de *P. chrysogenum* QML-2 e sua aplicação primária na cacarificação do sabugo de milho. Com a utilização de mistura de palha de milho e farelo de trigo em pó como substratos e água duplamente destilada como solvente para extração enzimática obtiveram o máximo de atividade para a xilanase (19613, 25 U/g) e para a  $\beta$ -mananase (8479,82 U/g). Concomitantemente, também foram obtidas atividades de celulasas, incluindo atividade de endoglucanase (195,13U/g), atividade em papel de filtro (41,87 U/g) e atividade de  $\beta$ -glucosidase (132,63 U/g).

Housseiny (2014) empregou dois substratos diferentes, girassol (*Helianthus annuus* L.) e raízes de tubérculos e alface (*Lactuca sativa*). Usando uma mistura de ambos os resíduos, obteve-se maior produção de endoinulinase (enzima que possui atividade

similar a  $\alpha$ -amilase, na produção de frutose e que tem a capacidade de produzir frutose a partir da inulina presente nas raízes e tubérculos). Dez espécies fúngicas cultivadas nesses substratos, como fontes de carbono de baixo custo, foram rastreados para a melhor produção de atividades de endoinulinase. Destes, *Aspergillus niger* AUMC 9375 foi o mais produtivo, quando crescido em uma mistura usando proporção 6: 1 w / w de girassol: alface, produzindo os mais altos níveis de inulinase a 50% de umidade, 30°C, pH 5,0, com sete dias de incubação, e com extrato de levedura como a melhor fonte de nitrogênio. Assim, a mistura de tubérculos de girassol e raízes de alface possui potencial para como um substrato eficaz e econômico para a produção de inulinase, a ser aplicada na indústria de alimentos (produção em larga escala de xaropes de frutose de elevada pureza).

De acordo com Bose et al. (2014), resíduos de penas, um subproduto do processamento de aves, contém grande quantidade de queratina, difícil de degradar, que representa grande ameaça para o ambiente e a humanidade. Assim, o desenvolvimento de uma abordagem biotecnológica para o uso desse resíduo como substrato para a produção de enzimas, com a sua subsequente conversão em adubo nitrogenoso foi o principal objetivo do trabalho desses pesquisadores. Treze bactérias proteolíticas foram isoladas do solo usado para despejo de penas, entre as quais o *Bacillus amyloliquefaciens* 6B (JQ904625) apresentou a capacidade de degradar completamente as penas nativas no mais curto período de tempo (24 h) e, portanto selecionados para posterior investigação. Mediante a otimização dos parâmetros do processo, o máximo de rendimento da enzima (610,13 U / mL) foi obtida depois de 12 h de fermentação a 37°C usando um meio contendo 0,5% (w / v) de farinha de penas e 0,5% (w / v) de xilose a pH 8,0. A protease queratinolítica 6B apresentou atividade ótima em 50°C e pH 8,0. A enzima exibiu significativa estabilidade na presença de solventes, surfactantes e agentes de branqueamento-oxidante, sugerindo seu uso potencial nas indústrias.

## 8.5 Conclusões

Neste capítulo foi apresentado o potencial biotecnológico dos micro-organismos endofíticos como produtores de enzimas de interesse industrial, como as proteases, celulases, xilanases, amilases, lipases, esterases, pectinases e quitinases, com aplicação nas indústrias têxtil, de alimentos, farmacêutica, entre outras. Considerada a biodiversidade brasileira, os endófitos são fontes extremamente promissoras para novas e mais eficientes enzimas microbianas.

## Referências

- ABDEL-FATTAH, Y. R. et al. Production, purification, and characterization of thermostable  $\alpha$ -amylase produced by *Bacillus licheniformis* isolate AI20. **Journal of Chemistry**, London, v. 2013, no. 2013, p. 1-11, 2013.
- ALNAHDI, H. S. et al. Isolation and screening of extracellular proteases produced by new Isolated *Bacillus* sp. **Journal of Applied Pharmaceutical Science, Gwalior**, v. 2, no. 9, p. 71-74, 2012.
- ARAÚJO, W. L. et al. **Guia prático**: isolamento e caracterização de micro-organismos endofíticos. Piracicaba: Ed. CALQ, 2010.
- AZEVEDO, J. L. et al. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 3, no. 1, p. 40-65, 2000.
- BISCHOFF, F. et al. Three new cutinases from the yeast *Arxula adenivorans* that are suitable for biotechnological applications. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D.C., v. 81, no. 16, p. 5497-5510, 2015.
- BON, E. P. S. et al. **Enzimas em biotecnologia**: produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.
- BOSE, A. et al. Keratinolytic protease production by *Bacillus amyloliquefaciens* 6B using feather meal as substrate and application of feather hydrolysate as organic nitrogen input for agricultural soil. **Waste Biomass Valor**, Netherlands, v. 5, no. 4, p. 595-605, 2014.
- CASTRO, A. M.; PEREIRA JR., N. Produção, propriedades e aplicações de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.
- DUZA, M. B.; MASTAN, S. A. Microbial enzymes and their applications: a review. **Indo American Journal of Pharmaceutical Research**, India, v. 3, no. 8, p. 6208-6219, 2013.
- GURUNG, N. et al. A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. **BioMed Research International**, London, 2013, p. 1-18, 2013.



- HELD, P. Enzymatic digestion of polysaccharides (part II). 2012. Disponível: <<https://www.biotech.com/resources/application-notes/enzymatic-digestion-of-polysaccharides-part-ii/>>. Acesso em: 26 ago. 2017.
- HIROSE, T.; SUNAKUZA, T.; OMURA, S. Recent development of two chitinase inhibitors, Argin and Argadin, produced by soil microorganisms. **Proceedings of the Japan Academy. Series B**, Tokyo, v. 86, no. 2, p. 85-101, 2010.
- HOUSSEINY, M. M. Production of an endoinulinase from *Aspergillus niger* AUMC 9375, by solid state fermentation of agricultural wastes, with purification and characterization of the free and immobilized enzyme. **Journal of Microbiology**, Netherlands, v. 52, no. 5, p. 389-398, 2014.
- HU, Y. et al. Efficient production and evaluation of lignocellulolytic enzymes using a constitutive protein expression system in *Penicillium oxalicum*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, Hampshire**, v. 42, no. 6, p. 877-887, 2015.
- ISLAM, R.; DATTA, B. Diversity of chitinases and their industrial potential. **International Journal of Applied Research**, India, v. 1, no. 4, p. 55-60, 2015.
- JISHA, V. N. et al. Versatility of microbial proteases. **Advances in Enzyme Research**, China, v. 1, no. 3, p. 39-51, 2013.
- KOBLITZ, M. G. B. **Bioquímica de alimentos: teoria e aplicações práticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
- KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. **Chemistry & Biology**, Cambridge, v. 19, no. 7, p. 792-798, 2012.
- LIAO, H. et al. Functional diversity and properties of multiple xylanases from *Penicillium oxalicum* GZ-2. **Scientific Reports**, London, n. 5, no. 1, p. 1-14, 2015.
- LIAO, H. et al. Production and characterization of acidophilic xylanolytic enzymes from *Penicillium oxalicum* GZ-2. **Bioresource Technology**, Essex, v. 123, p. 117-124, 2012.
- MELO, V. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; SILVA, C. A. A. Protease production using different media from *Bacillus licheniformis* samples isolated of Port of Recife City-Pernambuco. **E-xacta**, Belo Horizonte, v. 8, no. 1, p. 57-65, 2015.

MESSIAS, J. M. et al. Microbial lipases: production, properties and biotechnological applications. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 213-234, 2011.

NIGAM, P. S. Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications. **Biomolecules**, Switzerland, v. 3, no. 3, p. 597-611, 2013.

OLIVEIRA, A. N. et al. Atividade enzimática de isolados de rizóbia nativos da Amazônia central crescendo em diferentes níveis de acidez. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 204-210, 2006.

ONOFRE, S. B. et al. Cellulase production by endophytic strains of *Trichoderma reesei* from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). **Advances in Microbiology**, China, v. 4, no. 5, p. 275-283, 2014.

ORLANDELLI, R. C. et al. Antifungal and proteolytic activities of endophytic fungi isolated from *Piper hispidum* Sw. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 46, n. 2, p. 359-366, 2015.

ORLANDELLI, R. C. et al. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, Campo Mourão, v. 7, n. 3, p. 97-109, 2012.

PASHA, K. M.; ANURADHA, P.; SUBBARAO, D. Applications of pectinases in industrial sector. **International Journal Pure and Applied**, International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology, India, v. 16, no. 1, p. 89-95, 2013.

PATEL, S.; SAVANTH, V. D. Review on fungal xylanases and their applications. **International Journal of Advanced Research**, India, v. 3, no. 3, p. 311-315, 2015.

PIRZADAH, T. et al. Characterization of Actinomycetes and *Trichoderma* spp. for cellulase production utilizing crude substrates by response surface methodology. **SpringerPlus**, London, v. 3, no. 622, p. 3-12, 2014.

POLIZELI, M. L. T. M. et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 67, no. 5, p. 577-591, 2005.

SANTI, L.; BERGER, M.; SILVA, W. O. B. Pectinases e Pectina: aplicação comercial e potencial biotecnológico. **Caderno Pedagógico**, Lajeado, v. 11, n. 1, p. 130-139, 2014.

SANTOS, J. R. A.; GOUVEIA, E. R. Produção de bioetanol de bagaço de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 11, n. 1, p. 27-33, 2009.

VILLENEUVE, P. et al. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis. B. Enzymatic**, Amsterdam, v. 9, no. 4-6, p. 113-148, 2000.

YASINOK, A. E.; SAHIN, F. L.; HABERAL, M. Isolation of Endopyhtic and Xylanolytic *Bacillus pumilus* Strains from *Zea mays*. **Tarım Bilimleri Dergisi**, Turkey, v. 14, no. 4, p. 374-380, 2008.

ZHANG, H.; SANG, Q. Production and extraction optimization of xylanase and  $\beta$ -mannanase by *Penicillium chrysogenum* QML-2 and primary application in saccharification of corn cob. **Biochemical Engineering Journal, Amsterdam**, v. 97, p. 101-110, 2015.

# Processos de biorremediação para tratamento de água e efluentes

---

Rosângela Bergamasco, Márcia Regina Fagundes-Klen, Letícia Nishi

## 9.1 Introdução

A água para consumo humano pode se apresentar contaminada por ampla gama de poluentes de origem antrópica ou natural. Produtos farmacêuticos e de higiene pessoal, hormônios, derivados do colesterol e alguns sub-produtos industriais têm sido considerados contaminantes emergentes. Em águas naturais, estes contaminantes surgem, principalmente, a partir do descarte de efluentes industriais e/ou domésticos e, mesmo em concentrações baixas ( $\text{ng L}^{-1}$  a  $\text{pg L}^{-1}$ ), podem provocar efeitos nocivos em organismos vivos. Pouquíssimos estudos têm abordado a ocorrência de contaminantes emergentes em águas brasileiras. Além desses, outros contaminantes presentes nas águas são metais, derivados do petróleo, micro-organismos patogênicos entre outros. Esses poluentes, se presentes em altas concentrações na água, podem causar efeitos nocivos à saúde dos consumidores. Esses contaminantes, além de persistentes no ambiente, não são removidos de forma eficiente pelo processo de tratamento convencional utilizado nas estações de tratamento de água (ETA's). Uma tecnologia que vem se destacando com resultados promissores para remoção desses contaminantes da água e efluentes é a biorremediação.

A biorremediação da água é uma tecnologia emergente no campo da ciência e engenharia ambientais. É uma técnica que utiliza organismos vivos visando a mineralização dos poluentes, o que resulta na remoção ou atenuação do composto do poluente para um produto menos prejudicial na área contaminada (DELLAGNEZZE et al., 2014). A biorremediação pode ser realizada pelo uso de organismos como bactérias (ALI; HAMEED; AHMED, 2009; VALLI NACHIYAR et al., 2014), fungos (ANASTASI et al., 2012; MISHRA; MALIK, 2014) ou mesmo plantas (LIM; CHU; PHANG, 2010; YU et al., 2014; OJOAWO; UDAYAKUMAR; NAIK, 2015); para auxiliar na degradação e remoção de substâncias nocivas de áreas contaminadas. As pesquisas e publicações de processos de biorremediação têm aumentado nos últimos anos, e têm se mostrado uma importante área de pesquisa, devido suas características como baixo consumo de energia, alta

eficiência e segurança ambiental. Ao mesmo tempo, é uma área desafiadora que exige comprometimento dos pesquisadores.

Uma característica importante de biorremediação é que ele é realizado em ambientes abertos, não estéreis compreendendo de uma variedade de micro-organismos (HUANG; ZHANG; ZHU, 2013). Deste grupo diversificado de micro-organismos, o papel central para a degradação de contaminantes está sendo realizada por bactérias (HUANG; ZHANG; ZHU, 2013). Um sistema de tratamento biológico compreendendo estes micro-organismos tem várias aplicações, tais como a reabilitação de locais contaminados, por exemplo, água, solos, lamas e fluxos de resíduos (BOOPATHY, 2000; WU et al., 2012). Uma das dificuldades de desenvolvimento de estratégias de biorremediação reside na obtenção de resultados em campo que são tão bons como aqueles em laboratório (FRUTOS et al., 2012).

Boopathy (2000) categorizou os métodos de biorremediação em 'ex situ' e 'in situ', em sua pesquisa se refere principalmente aos métodos 'in situ' como, por exemplo, compostagem, biorreatores, biofiltros, bioaumento, bioestimulação.

Os principais campos de atuação da biorremediação incluem: (a) biorremediação de solo e água poluídos; (b) biorremediação utilizando biossensores; (c) estudo dos mecanismos moleculares pelos quais estas substâncias nocivas interagem com a maquinaria celular; e (d) o estabelecimento de correlações epidemiológicas entre a exposição e doenças (MITA et al., 2010).

No presente capítulo, será abordada a situação de contaminantes presentes na água e efluentes que podem afetar a saúde humana, bem como técnicas de biorremediação de água e efluentes, utilizando organismos, como plantas, algas, bactérias entre outros processos de biorremediação.

## 9.2 Água e Efluentes

É de fundamental importância a compreensão do papel da água na saúde humana e os possíveis impactos adversos dos efluentes na qualidade da mesma. Assim, deve-se analisar cada um desses itens em separado.

### 9.2.1 Água

A água possui papel fundamental no meio ambiente e na vida humana. Alterações na quantidade, distribuição e qualidade dos recursos hídricos ameaçam a sobrevivência

humana e das demais espécies do planeta, estando o desenvolvimento econômico e social dos países fundamentados na disponibilidade de água de boa qualidade e na capacidade de sua conservação e proteção (BRASIL, 2006a).

A saúde humana está vinculada a um suprimento de água potável segura, adequada, acessível e confiável. Entretanto, sabe-se que boa parte da água doce disponível no planeta encontra-se em algum estágio de contaminação. A água potável é limpa e transparente e não contém micro-organismos e substâncias que possam transmitir ou causar doenças aos seres humanos. Em outras palavras, a água potável é aquela que pode ser consumida sem risco à saúde e sem causar rejeição ao consumo (BRASIL, 2006b).

A natureza e a composição do solo, através do qual a água escoar, determinam as impurezas que ela apresenta, fato agravado pelo aumento da densidade demográfica e intensificação das atividades econômicas na indústria e agricultura, da má utilização dos recursos naturais pelo homem e pela poluição fazendo com que não se considere 100% segura nenhuma fonte de água superficial, devido ao arraste de substâncias químicas e micro-organismos contidos nesse solo (BRASIL, 2006a).

Ao longo do tempo, com o aumento da população mundial, o fornecimento de água limpa e segura e a manutenção de sistemas de saneamento se tornaram mais complexos. O deslocamento da população de áreas rurais para as áreas urbanas pressionou a estrutura das cidades, gerando problemas como moradia inadequada, grande densidade demográfica, deficiências nos serviços de tratamento de água, coleta e tratamento de esgoto. Um sistema de saneamento básico pode reduzir em 20% a 80% a incidência de doenças infecciosas, inibindo a sua geração e interrompendo a sua transmissão (SELBORNE, 2001).

O conceito de qualidade da água relaciona-se a seu uso e características por ela apresentada, e pode ser determinada pelas substâncias presentes. A cada uso corresponde uma qualidade e quantidade, necessária e suficiente. Seu padrão de potabilidade é composto por um conjunto de parâmetros que lhe confere qualidade própria para o consumo humano (BRASIL, 2006b).

No Brasil, a atual legislação que se encontra em vigor é a portaria nº 2.914 de 12 de dezembro de 2011, homologada pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2012). Esta dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. A água para consumo humano deve atender aos parâmetros microbiológicos, físicos, químicos e radioativos estabelecidos pela portaria 2914/2011 (BRASIL, 2011a).

Globalmente, cerca de 783 milhões de pessoas não têm acesso à água potável e, mais de 2 bilhões não têm saneamento básico (WHO, 2012). Há aproximadamente,

2 milhões de casos relacionados às doenças diarreicas no mundo todo a cada ano, tornando-se uma das principais causas de mortes evitáveis em todo o mundo e a segunda principal causa, é a mortalidade e morbidade em crianças com idade inferior a cinco anos (LIU et al., 2012). Uma das principais causas de mais de 2 milhões de mortes/ano por doenças diarreicas é o consumo de água contaminada (WHO, 2012).

Atualmente, aproximadamente um terço de todos os compostos químicos produzidos tem como destino final (não intencional) o meio ambiente, incluindo a água. Cerca de 800 compostos químicos, incluindo mais de 600 compostos orgânicos, muitos dos quais biologicamente ativos, têm sido detectados em amostras de água. Destes, mais de 100 agentes químicos são considerados mundialmente como prioritários para efeito de controle ambiental. Muitos desses compostos ainda não são conhecidos os seus efeitos em longo prazo sobre o meio ambiente e na saúde humana (RIBEIRO; VIEIRA, 2010).

Assim, é indispensável o tratamento de água destinada ao consumo humano (DI BERNARDO; DANTAS, 2005). Para isso, é necessário que a água atenda aos padrões de potabilidade, que se estabelecem os valores máximos tolerados nas águas de abastecimento para diversos compostos químicos que é preconizado pela portaria nº. 2914 do Ministério da Saúde.

### 9.2.2 Efluentes

Os efluentes provenientes de atividades industriais ou de origem doméstica são uma das principais fontes poluidoras do meio ambiente, se não forem tratadas de forma adequada antes de serem reintroduzidos no ambiente. Assim, precisam passar por processos de tratamento para fins de reuso ou para reintrodução mais segura no meio ambiente. Devido à ampla gama de atividades industriais, os efluentes podem apresentar as mais variadas características, assim é necessário que passem por uma série de análises que indicará a melhor forma de tratamento para cada efluente gerado, de acordo com sua composição, carga poluidora e contaminantes que podem estar presentes.

As legislações que estabelecem as condições para o lançamento de efluentes ficam a critério do Conselho Nacional do Meio Ambiente (Conama), por meio das resoluções 357 (BRASIL, 2005), que foram alteradas e complementadas pelas resoluções 410 (BRASIL, 2009) e 430 (BRASIL, 2011b).

De acordo com a resolução 430 (BRASIL, 2011b), efluente é o termo usado para caracterizar os despejos líquidos provenientes de diversas atividades ou processos. O tratamento de efluentes pode ser realizado por processos físicos, químicos e/ou

biológicos (SPERLING, 1996). Os processos físicos removem os sólidos em suspensão sedimentáveis e flutuantes por meio de separações físicas, tais como gradeamento, peneiramento, caixas separadoras de óleos e gorduras, sedimentação e flotação; também removem a matéria orgânica e inorgânica em suspensão coloidal e reduzem ou eliminam a presença de micro-organismos por meio de processos de filtração em areia ou em membranas (microfiltração e ultrafiltração). Os processos físicos também são utilizados com a finalidade de desinfecção, tais como a radiação ultravioleta.

Os processos químicos utilizam produtos químicos em seu processo, tais como os agentes de coagulação, a floculação, a neutralização de pH, a oxidação, a redução e a desinfecção em diferentes etapas dos sistemas de tratamento. Conseguem remover os poluentes por meio de reações químicas, além de condicionar a mistura de efluentes que será tratada nos processos subsequentes. Alguns exemplos de processos químicos são a eletrocoagulação, a cloração para desinfecção, ozonização, troca iônica, entre outros (SPERLING, 1996).

O tratamento biológico de esgotos e efluentes industriais tem o objetivo de remover a matéria orgânica dissolvida e em suspensão ao transformá-la em sólidos sedimentáveis (flocos biológicos) e gases. Basicamente, o tratamento biológico reproduz os fenômenos que ocorrem na natureza, mas em menor tempo. O tratamento biológico pode ser realizado por processos aeróbios (lodo ativado) ou anaeróbios (SPERLING, 1996). Os micro-organismos que participam na formação dos flocos no processo de lodos ativados são as bactérias, os fungos, os protozoários e os micrometazoários.

### **9.2.3 Contaminação de água e efluentes**

A contaminação da água superficial, água subterrânea, água de consumo humano é um tema preocupante em todo o mundo. A deterioração da qualidade da água e a necessidade de processos de tratamento mais avançados é tema de ampla discussão.

Os efluentes industriais e domésticos contaminados, lançados de forma inadequada nos corpos hídricos, são uma das principais fontes poluidoras de rios e mares. O despejo de contaminantes em rios e mares constitui graves acidentes ambientais, de repercussão mundial, como, por exemplo, o ocorrido em 1989, o derramamento de 41 milhões de litros de petróleo na costa do Alasca, que afeta a vida animal local até hoje. E mais recentemente o tsunami que atingiu Fukushima, no Japão, que danificou reatores de uma usina nuclear do local, o que causou a contaminação da água por substâncias radioativas.

Existe, atualmente, grande variedade de substâncias poluidoras em água e efluentes, entre elas podemos citar substâncias radioativas, micro-organismos



patogênicos, metais pesados, pesticidas, derivados de petróleo, substâncias desreguladoras endócrinas (fármacos). A maior parte delas pode causar danos à saúde humana, e uma das principais vias de contato com essas substâncias é por meio do consumo de água contaminada. A água que apresenta algum desses contaminantes em concentrações acima das permitidas pela legislação torna-se imprópria para consumo humano. E efluentes que contenham uma alta de carga de substâncias poluidoras não pode ser lançada no ambiente.

Determinadas substâncias poluidoras são denominadas compostos orgânicos recalcitrantes ou persistentes, pois são compostos de difícil degradação, hidrofóbicos e bioacumulativos, podendo ser transportados por longas distâncias no meio ambiente (ALI et al., 2014) como, por exemplo, metais pesados, fármacos e pesticidas.

Contaminantes químicos preocupantes e que vêm sendo detectados em águas superficiais e subterrâneas e em efluentes industriais são os pesticidas. Existem várias evidências que apontam relação entre exposição a pesticidas, e elevada taxa de doenças crônicas como, por exemplo, câncer, diabetes, desordens neurodegenerativas, como Parkinson, Alzheimer e esclerose amiotrófica lateral; além de desordens genéticas e reprodutivas (MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2013; TABREZ et al., 2014).

A presença de metais pesados na água, como o chumbo, cádmio, mercúrio, zinco e outros é preocupante, pois esses apresentam características cumulativas e persistentes em organismos vivos. Estes metais podem causar doenças cardiovasculares, câncer, perturbações psicológicas, distúrbio de aprendizagem em crianças entre outros (TABREZ et al., 2014). A presença de concentrações de metais acima do normal em águas subterrâneas é influenciada por indústrias e, principalmente, pela disposição inadequada dos resíduos urbanos em aterros e lixões (lâmpadas, pilhas, baterias e eletrônicos).

Outros contaminantes de água subterrânea são os hidrocarbonetos benzeno, tolueno, etilbenzeno e os três xilenos orto, meta e para, denominados compostos BTEX, são os constituintes da gasolina, estes são indicativos de vazamentos em tanques de combustíveis, descaso por oficinas mecânicas e lavajatos com gerenciamentos inadequados de seus efluentes. Hidrocarbonetos possuem maior solubilidade em água e, portanto, estes contaminantes são considerados substâncias perigosas por serem depressantes do sistema nervoso central e por causarem leucemia em exposições crônicas (FARHADIAN et al., 2008).

A seguir será comentado o uso da biorremediação para tratamento de água e efluentes contaminados por contaminantes persistentes, metais pesados, pesticidas e fármacos.

### **9.3 Uso da biorremediação em de água e efluentes contaminados por metais pesados**

A liberação de metais pesados no ambiente por atividades industriais e artesanais é uma das principais causas de poluição e desestabilização do ecossistema. Para uma solução sustentável para este problema, há a necessidade de substituir as formas convencionais por novas abordagens que requeiram recursos biológicos, que são atóxicos.

Vários trabalhos têm sido realizados com o uso de plantas ou micro-organismos para a absorção de metais pesados a partir de soluções (GROUDEVA; GROUDEV; DOYCHEVA, 2001; ALVARADO et al., 2008; FOSSO-KANKEU; MULABA-BAFUBIANDI, 2014). A absorção do metal pelas plantas e micro-organismos ocorre por meio de vários mecanismos. A compreensão desses mecanismos é fundamental para a melhoria dos processos de biorremediação (FOSSO-KANKEU; MULABA-BAFUBIANDI, 2014).

Embora o mecanismo de biossorção de metais por plantas e micro-organismos não sejam totalmente idênticos, ambos estão relacionados com a presença de metaloproteínas que desempenham um papel importante na captação de metais por estes biossorbentes. Os micro-organismos e as plantas têm o potencial para adsorção de metais, acumulação ou resistência que dependem da síntese de proteínas de ligação a metais, tais como metalotioneínas ou fitoquelatinas (FOSSO-KANKEU; MULABA-BAFUBIANDI, 2014).

Proteínas que ligam proteínas ou metaloproteínas são um grande grupo de proteínas que desempenham um papel importante em muitos aspectos da vida de uma célula e geralmente contribuem para a regulação dos metais dentro da célula por meio do transporte de importação e/ou exportação, bem como o armazenamento desses íons metálicos (MA; JACOBSEN; GIEDROC, 2009).

Em micro-organismos e plantas, proteínas de ligação de metal se encontram na parte de fora da membrana, interagindo com íons metálicos externos assegurando o seu transporte para o citossol (interior da célula), onde proteínas especializadas quelantes de metais transferem o metal para o receptor proteico apropriado. A ligação do metal nas proteínas ocorre em sítios específicos e foi relatado que metais pesados se ligam preferencialmente em proteínas ricas em Asp e Glu, enquanto os metais leves tendem a ligar-se a proteínas ricas em Cys e His (YAMASHITA et al., 1990).

Embora naturalmente abundante em algumas proteínas, estes locais de ligação específicos também foram projetadas em outras proteínas. Alguns pesquisadores

têm desenvolvido metaloproteínas heterólogas com uma afinidade mais elevada, maior capacidade de ligação e / ou especificidade e seletividade a metais, que foram expressos em bactérias e plantas para melhorar a sua capacidade para adsorver metais (FOSSO-KANKEU; MULABA-BAFUBIANDI, 2014).

Adsorventes microbianos potentes utilizados para a absorção de metais de soluções incluem fungos, leveduras, microalgas, bactérias tanto Gram-positivos quanto negativos. As capacidades de adsorção foram descritas para os seus mais elevados índices de taxa superfície-volume e um conteúdo elevado de potenciais sítios de adsorção tais como ácidos teicoico na sua parede celular. O *Bacillus* e *Pseudomonas* são as bactérias frequentemente utilizadas e demonstraram elevadas capacidades de adsorção de metais, tais como níquel, cobre, chumbo, zinco, mercúrio, entre outros (LEE; TEBO, 1994; CHANDRA SEKHAR et al., 2004; ÖZTÜRK, 2007; HARMS, SCHLOSSER; WICK, 2011; OVES; KHAN; ZAIDI, 2013; WANG et al., 2014).

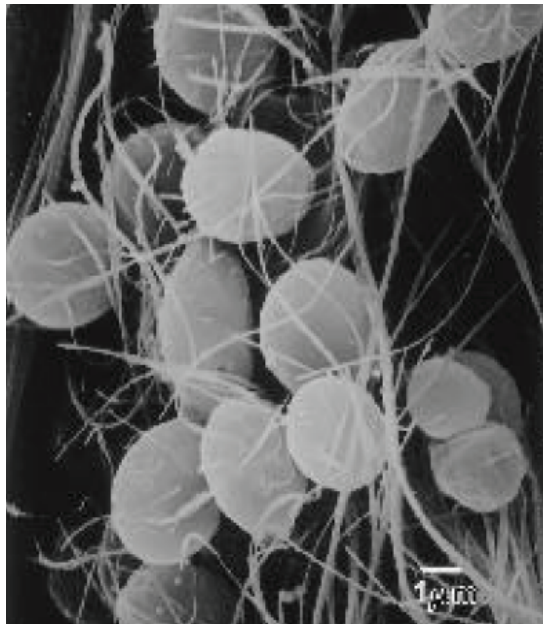
As paredes celulares dos fungos são ricas em polissacáridos e glicoproteínas, contendo vários grupos de ligação de metais, tais como amina, imidazol, fosfato, sulfato, sulfidrilo e hidroxila. Várias espécies fúngicas têm sido utilizadas para processos de bioadsorção de metal, tendo como bioadsorventes (YAN; VIRARAGHAVAN, 2003; CHENG et al., 2015).

A levedura mais importante como bioadsorvente é o *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 1), que é de fácil crescimento, usando técnicas de fermentação simplificadas e de baixo custo. Ele também pode ser obtido na forma de subprodutos das indústrias alimentares e de bebidas. *S. cerevisiae* tem sido extensivamente estudada como um bioadsorvente de metais e as formas de biomassa investigadas incluem biomassa geneticamente modificados, mortos e/ou biomassa viva, biomassa imobilizada ou livre. Amiriya, Ray e Margaritis (2015) aplicaram *S. cerevisiae* para remoção de íons chumbo em biorreator de fluxo contínuo e observaram a capacidade de remoção 72,5 mg/g do adsorvente. Os autores sugerem, a partir dos resultados obtidos, que o uso de células de leveduras vivas em um sistema contínuo de adsorção é um método eficaz para remoção de metais pesados de efluentes industriais, reduzindo etapas de pré-tratamento e preparação de biomassa.

Mishra e Malik (2014) estudaram a capacidade de consórcio de fungos para remoção dos íons metálicos  $\text{Cu}^{+2}$  e  $\text{Cr}^{+6}$  e os corantes ácido azul 161 e laranja 34. Observaram que ao contrário de estirpes individuais, o desempenho do consórcio era inalterado, independentemente da complexidade das misturas de corante e metal. O consórcio apresentou melhor desempenho de remoção dos poluentes quando comparados à presença de fungo individual no meio reacional.

Algas marinhas ou algas com paredes celulares são aquelas comumente estudadas como bioadsorventes e incluem algas verdes, vermelhas e marrons. Todos eles contêm celulose e xilenos nas suas paredes celulares, mas apenas as algas marrons têm ácido algínico, que está presente sob a forma de gel e é responsável pela ligação de metais. O ácido algínico oferece íons carboxilato aniônicos de sulfato com um pH neutro. O gênero *Sargassum* (Figura 2) de alga marrom foi identificada como um excelente bioadsorvente e tem sido testado em vários experimentos para remoção de metais (BERTAGNOLLI et al., 2014; HE; CHEN, 2014; CARRO et al., 2015).

Em estudo recente, Carro et al. (2015) utilizaram a espécie de alga marrom *Sargassum muticum*, tratada com cálcio como biomassa para remoção de diferentes cátions metálicos da água, cádmio e chumbo, e verificaram que para o cádmio e chumbo a adsorção ocorre por troca iônica, com uma taxa de 1:1 para troca iônica entre estes íons metálicos e o cálcio liberado na solução.



**Figura 1** - Fotomicrografia de *Saccharomyces cerevisiae*

Fonte: Cassiola et al. (2001).



**Figura 2** - Alga marrom do gênero Sargassum

Fonte: Nagarajan; Arumugam Kuppusamy (2013).

#### **9.4 Uso da biorremediação em água e efluentes contaminados por pesticidas**

O setor agrícola é considerado uma das principais atividades econômicas do Brasil. O Estado do Paraná, com uma agricultura diversificada, responde por cerca de 22,6% da produção nacional de grãos, alcançando em 2010 o primeiro lugar na produção de trigo, milho, feijão e cevada e o segundo lugar como produtor nacional de soja, centeio e aveia (PARANÁ, 2013). Para alcançar tal produtividade, se fez necessária a utilização de grande variedade e quantidade de praguicidas e fertilizantes. O uso crescente dessas substâncias químicas tem sido motivo de preocupação nas últimas décadas, devido ao desenvolvimento de doenças relacionadas à exposição a esses agentes.

Residuais de pesticidas em água potável podem aumentar os riscos de ocorrência de câncer, bem como causar danos aos sistemas nervoso, cardíaco, endócrino e reprodutivo, estes provenientes da agricultura.

Os processos de biorremediação têm sido propostos como uma alternativa ambientalmente correta para a remediação de pesticidas de corpos hídricos.

Entre os métodos de biorremediação que podem ser aplicados estão a biofiltração, a bioestimulação e o bioaumento (HELBLING, 2015). A biofiltração consiste em remover o pesticida da água que passa pelo filtro, mantendo-o confinado em um compartimento de biorremediação (ZEARLEY; SUMMERS, 2012). A bioestimulação é uma técnica de biorremediação que envolve uma estimulação da atividade dos micro-organismos envolvidos, a partir de uma manipulação do ambiente onde se encontram, pode ser pela adição ou retirada de determinados substratos ou nutrientes desse ambiente, o que pode elevar a capacidade de degradação dos micro-organismos. O bioaumento consiste na introdução de micro-organismos com maior capacidade de degradação em um ambiente contaminado que causem a biodegradação de alvo químicos (HELBLING, 2015).

Estudos demonstram a utilização de diferentes micro-organismos para biodegradação de pesticidas, como bactérias (JONES et al., 1998), plantas (GEBREKIDAN et al., 2013), microalgas (MAGNUSSON et al., 2013), bem como associações de micro-organismos com bactérias e fungos (NGUYEN et al., 2013). Nesse último caso, os pesquisadores utilizaram um biorreator e associaram lodo ativado com um mix de bactérias resistentes a pesticidas e uma espécie de fungo - *Trametes versicolor* - que possui enzimas extracelulares, como lignina peroxidase e lacases, que são eficientes em degradar ampla variedade de composto orgânico persistentes, que podem não ser degradados por bactérias. Entre os contaminantes, foi analisada a degradação da atrazina.



**Figura 3-** *Trametes versicolor*

Fonte: Wang et al. (2015).

A atrazina (6-cloro-N-etil-N<sup>4</sup>-1-metil-etil-1,3,5-triazina-2,4-diamina) é um herbicida de triazina amplamente usado para controlar ervas daninhas. Seu uso intensivo contribuiu para a detecção de níveis elevados no meio ambiente e é frequentemente detectada em águas superficiais e subterrâneas no Brasil, Canadá, Europa e Estados Unidos (CERDEIRA et al., 2004). Os limites máximos de ATZ na água para consumo humano são  $2\mu\text{L}^{-1}$  no Brasil,  $3\mu\text{L}^{-1}$  nos Estados Unidos e  $0,1\mu\text{L}^{-1}$  na Europa (EC, 2008; BRASIL, 2011a; EPA, 2012).

Nguyen et al. (2013) verificaram redução de 93% da concentração de atrazina nas condições testadas no biorreator. Podemos considerar esse estudo um processo de bioaumento, pois um micro-organismo não nativo foi inserido no ambiente para melhorar a atividade de biodegradação da comunidade bacteriana.

## 9.5 Uso da biorremediação em de água e efluentes contaminados por fármacos

Outros contaminantes de água e efluentes são os fármacos. A ocorrência de fármacos, tanto de uso humano como de uso veterinário, nos sedimentos, esgoto doméstico e águas superficiais e subterrâneas constitui um sério problema em todo o mundo. Quase todas as classes de agentes terapêuticos, que incluem anti-inflamatórios, analgésicos, hormônios esteroides e compostos neuroativos, além de seus subprodutos de degradação, chegam ao meio ambiente por meio da descarga de efluente não tratado ou diretamente por meio de excreções humanas.

Pesquisas apontam resultados promissores na biorremediação de águas e efluentes contaminados por fármacos. Esses estudos utilizam fungos (MARCO-URREA et al., 2009; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ; MARCO-URREA; CAMINAL, 2010), bactérias (ZHOU et al., 2006), plantas aquáticas (ALVARADO et al., 2008) entre outros.

As drogas anti-inflamatórias, que incluem ibuprofeno, diclofenaco e dipirona, são encontrados em maiores concentrações em corpos d'água, devido sua grande utilização. O diclofenaco de sódio é uma droga com propriedades anti-inflamatórias, analgésica e antipirética, o consumo global dessa droga é estimado em 940 toneladas por ano (ZHANG; GEIßEN; GAL, 2008). Devido ao uso intensivo desse medicamento, estudo indica que sua presença em águas superficiais, água subterrânea e água de consumo humano pode variar de  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  a  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (MARCO-URREA et al., 2009).

Marco-Urrea et al. (2009) estudaram o fungo *Trametes versicolor* para degradação de diclofenaco e verificaram que mais de 94% do fármaco era degradado na primeira hora em pellets da droga eram adicionadas no meio contendo o fungo, tanto em altas concentrações (10 mg.L<sup>-1</sup>) como em baixas concentrações (45µg.L<sup>-1</sup>).

Yang et al. (2013) também aplicaram o mesmo fungo, *T. versicolor*, para remoção do diclofenaco em um biorreator não estéril, em condições mais próximas da realidade. Nesse reator foi passado em fluxo contínuo uma solução com diclofenaco. No estado de equilíbrio, e observaram a remoção de 53% da concentração inicial de diclofenaco (345 µg/L.d). Em estudo utilizando microalga, *Chlorella sorokiniana*, em processo em batelada, observou-se a remoção de 93% for ácido salicílico.

Assim, pode-se verificar ampla variedade de organismos que possuem propriedades adsorventes ou de biodegração, que são capazes de remover poluentes da água e efluentes, que não são removidos de forma eficiente pelos processos de tratamento convencionais.

## 9.6 Conclusões

A água e os efluentes encontram-se contaminados por uma ampla gama de poluentes orgânicos, químicos, altamente persistentes no ambiente e que podem prejudicar a saúde das pessoas. Os métodos convencionais de tratamento de água e efluentes não removem totalmente esses poluentes persistentes.

Os métodos de biorremediação têm apresentado resultados promissores na remoção de poluentes persistentes na água e efluentes, utilizando ampla variedade de organismos (bactérias, fungos, plantas, microalgas), que possuem capacidade de adsorção e/ou biodegradação de uma variedade de contaminantes como metais pesados, pesticidas, fármacos, entre outros.

Um dos principais desafios para os estudos com processos de biorremediação é sua limitação a estudos laboratoriais. Portanto, são necessários mais estudos em que se considere um ecossistema estável, bem como a estrutura e composição adequadas para que se possa ampliar e diversificar a aplicação no meio ambiente dos variados processos de bioremediação, ampliando, dessa forma, o acesso a esses processos pela população.



## Referências

- ALI, N.; HAMEED, A.; AHMED, S. Physicochemical characterization and Bioremediation perspective of textile effluent, dyes and metals by indigenous Bacteria. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 164, no. 1, p. 322-328, 2009.
- ALI, U. et al. Organochlorine pesticides (OCPs) in South Asian region: a review. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v. 476-477, p. 705-717, 2014.
- ALVARADO, S. et al. Arsenic removal from waters by bioremediation with the aquatic plants Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and Lesser Duckweed (*Lemna minor*). **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, no. 17, p. 8436-8440, 2008.
- AMIRNIA, S.; RAY, M. B.; MARGARITIS, A. Heavy metals removal from aqueous solutions using *Saccharomyces cerevisiae* in a novel continuous bioreactor–biosorption system. **Chemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 264, p. 863-872, 2015.
- ANASTASI, A. et al. Integrated fungal biomass and activated sludge treatment for textile wastewaters bioremediation. **Bioresource Technology**, Essex, v. 123, p. 106-111, 2012.
- BERTAGNOLLI, C. et al. Biosorption of chromium by alginate extraction products from *Sargassum filipendula*: investigation of adsorption mechanisms using x-ray photoelectron spectroscopy analysis. **Bioresource Technology**, Essex, v. 164, p. 264-269, 2014.
- BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**, Essex, v. 74, p. 63-67, 2000.
- BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 de março de 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boas práticas no abastecimento de água**: procedimentos para a minimização de riscos à saúde. Brasília, DF, 2006a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Inspeção sanitária em abastecimento de água**. Brasília, DF, 2006b.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 410, de 4 de maio de 2009. Prorroga o prazo para complementação das condições e padrões de lançamento de efluentes, previsto no art. 44 da Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, e no Art. 3o da Resolução nº 397, de 3 de abril de 2008. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 05 de maio de 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 dez. 2011a.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 maio 2011b.

CARRO, L. et al. Interaction of heavy metals with Ca-pretreated *Sargassum muticum* algal biomass: characterization as a cation exchange process. **Chemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 264, p. 181-187, 2015.

CASSIOLA, F. et al. Interaction between *Saccharomyces cerevisiae* and *chrysotile*. **European Cells and Materials**, Bethesda, v. 19, no. 2, p. 30-35, 2001.

CERDEIRA, A. et al. Atrazine in water and biodegradation in a recharge area of Guarany Aquifer in Brazil. **Bulletin of Environmental Contamination Toxicology**, Victoria, v. 73, no. 1, p. 117-124, 2004.

CHANDRA SEKHAR, K. et al. Removal of lead from aqueous solutions using an immobilized biomaterial derived from a plant biomass. **Journal Hazardous Materials**, Essex, v. 108, no. 1-2, p. 111-117, 2004.

CHENG, Y. et al. Biosorption of Pb(II) Ions from aqueous solutions by waste biomass from biotrickling filters: kinetics, isotherms, and thermodynamics. **Journal of Environmental Engineering**, Reston, v. 142, no. 9, 2015.

DELLAGNEZZE, B. M. et al. Bioremediation potential of microorganisms derived from petroleum reservoirs. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 89, no. 1-2, p. 191-200, 2014.

DI BERNARDO, L.; DANTAS, A. B. **Métodos e técnicas de tratamento de água**. 2. ed. São Carlos: Rima, 2005.

EC-European Commission. Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy. In: HAILBRONNER, K.; THYM, D. (Eds.). EU immigration and asylum law: a commentary. Bruxelas: Verlag, C.H. Beck, 2016.

EPA-United States Environmental Protection Agency. Pesticides. 2012. Disponível em: <[www.epa.gov/pesticides/factsheets/atrazine\\_background.htm](http://www.epa.gov/pesticides/factsheets/atrazine_background.htm)>. Acesso em: 12 abr. 2014.

FARHADIAN, M. et al. Monoaromatics removal from polluted water through bioreactors: a review. **Water Research**, New York, v. 42, no. 6-7, p. 1325-1341, 2008.

FOSSO-KANKEU, E.; MULABA-BAFUBIANDI, A. F. Implication of plants and microbial metalloproteins in the bioremediation of polluted waters: a review. **Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C**, Oxford, v. 67-69, p. 242-252, 2014.

FRUTOS, F. J. et al. Remediation trials for hydrocarbon-contaminated sludge from a soil washing process: Evaluation of bioremediation technologies. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 199-200, p. 262-271, 2012.

GEBREKIDAN, A. et al. Pesticides removal by filtration over cactus pear leaves: a cheap and natural method for small-scale water purification in semi-arid regions. **CLEAN – Soil, Air, Water**, Hoboken, v. 41, no. 3, p. 235-243, 2013.

GROUDEVA, V. I.; GROUDEV, S. N.; DOYCHEVA, A. S. Bioremediation of waters contaminated with crude oil and toxic heavy metals. **International Journal of Mineral Processing**, Amsterdam, v. 62, no. 1-4, p. 293-299, 2001.

HARMS, H.; SCHLOSSER, D.; WICK, L.Y. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 9, no. 3, p. 177-192, 2011.

HE, J.; CHEN, J. P. A comprehensive review on biosorption of heavy metals by algal biomass: materials, performances, chemistry, and modeling simulation tools.

**Bioresource Technology**, Essex, v. 160, p. 67-78, 2014.

HELBLING, D. E. Bioremediation of pesticide-contaminated water resources: the challenge of low concentrations. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 33, p. 142-148, 2015.

HUANG, Y.; ZHANG, J.; ZHU, L. Evaluation of the application potential of bentonites in phenanthrene bioremediation by characterizing the biofilm community. **Bioresource Technology**, Essex, v. 134, p. 17-23, 2013.

JONES, L. R. et al. Bacterial inoculation of granular activated carbon filters for the removal of atrazine from surface water. **Water Research**, New York, v. 32, no. 8, p. 2542-2549, 1998.

LEE, Y.; TEBO, B. M. Cobalt(II) oxidation by the Marine Manganese(II)-Oxidizing *Bacillus* sp. Strain SG-1. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D.C., v. 60, no. 8, p. 2949-2957, 1994.

LIM, S.-L.; CHU, W. L.; PHANG, S. M. Use of *Chlorella vulgaris* for bioremediation of textile wastewater. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, p. 7314-7322, 2010.

LIU, L. et al. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. **The Lancet**, London, v. 379, no. 9832, p. 2151-2161, 2012.

MA, Z.; JACOBSEN, F. E.; GIEDROC, D. P. Coordination chemistry of bacterial metal transport and sensing. **Chemical Reviews**, Washington, D. C., v. 109, no. 10, p. 4644-4681, 2009.

MAGNUSSON, M. et al. Pesticide contamination and phytotoxicity of sediment interstitial water to tropical benthic microalgae. **Water Research**, New York, v. 47, no. 14, p. 5211-5221, 2013.

MARCO-URREA, E. et al. Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. **Chemosphere**, Oxford, v. 74, no. 6, p. 765-772, 2009.

MISHRA, A.; MALIK, A. Novel fungal consortium for bioremediation of metals and dyes from mixed waste stream. **Bioresource Technology**, Essex, v. 171, p. 217-226, 2014.

MITA, L. et al. Employment of immobilised lipase from *Candida rugosa* for the bioremediation of waters polluted by dimethylphthalate, as a model of endocrine disruptors. **Journal of Molecular Catalysis. B. Enzymatic**, Amsterdam, v. 62, no. 2, p. 133-141, 2010.

MOSTAFALOU, S.; ABDOLLAHI, M. Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 268, no. 2, p. 157-177, 2013.

NAGARAJAN, S.; ARUMUGAM KUPPUSAMY, K. Extracellular synthesis of zinc oxide nanoparticle using seaweeds of gulf of Mannar, India. **Journal of Nanobiotechnology**, Stevenage, v. 11, no. 1, p. 39, 2013.

NGUYEN, L. N. et al. Removal of trace organic contaminants by an MBR comprising a mixed culture of bacteria and white-rot fungi. **Bioresource Technology**, Essex, v. 148, p. 234-241, 2013.

OJOAWO, S. O.; UDAYAKUMAR, G.; NAIK, P. Phytoremediation of phosphorus and nitrogen with *Canna x generalis* reeds in domestic wastewater through nmamit constructed wetland. **Aquatic Procedia**, Essex, v. 4, p. 349-356, 2015.

OVES, M.; KHAN, M. S.; ZAIDI, A. Biosorption of heavy metals by *Bacillus thuringiensis* strain OSM29 originating from industrial effluent contaminated north Indian soil. **Saudi Journal of Biological Sciences**, Essex, v. 20, no. 2, p. 121-129, 2013.

ÖZTÜRK, A. Removal of nickel from aqueous solution by the bacterium *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 147, no. 1-2, p. 518-523, 2007.

PARANÁ. Secretaria de Agricultura e Abastecimento. **Produção agropecuária**. 2013. Disponível em <<http://www.agricultura.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=137>>. Acesso em: 11 abr. 2013.

RIBEIRO, D. H. B.; VIEIRA, E. Avaliação do potencial de impacto dos agrotóxicos no meio ambiente. 2010. Disponível em <[http://www.infobibos.com/Artigos/2010\\_2/Agrotoxicos/Index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2010_2/Agrotoxicos/Index.htm)> Acesso em: 28 ago. 2017.

RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E.; MARCO-URREA, E.; CAMINAL, G. Naproxen degradation test to monitor *Trametes versicolor* activity in solid-state bioremediation processes. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 179, no. 1-31, p. 1152-1155, 2010.

SELBORNE, L. **A ética do uso da água doce**: um levantamento. Brasília, DF: Unesco, 2001.

SPERLING, M. V. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 1996.

TABREZ, S. et al. Gene-environment interactions in heavy metal and pesticide carcinogenesis. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 760, p. 1-9, 2014.

VALLI NACHİYAR, C. et al. Bioremediation of textile effluent containing Mordant Black 17 by bacterial consortium CN-1. **Journal of Water Process Engineering**, Essex, v. 4, p. 196-200, 2014.

WANG, J. et al. Competitive adsorption of heavy metal by extracellular polymeric substances (EPS) extracted from sulfate reducing bacteria. **Bioresource Technology**, Essex, v. 163, p. 374-376, 2014.

WANG, S-R et al. Four new spiroaxane sesquiterpenes and one new rosenonolactone derivative from cultures of Basidiomycete *Trametes versicolor*. **Fitoterapia**, Essex, v. 105, p. 127-131, 2015.

WHO-World Health Organization. **Water, sanitation, and hygiene links to health: facts and figures**. 2012. Disponível em: < [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/publications/facts2004/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/facts2004/en/)>. Acesso em: 12 abr. 2014.

WU, Y. et al. Phenol adsorption on nitrogen-enriched activated carbon from wood fiberboard waste. **Wood and Fiber Science**, Madison, v. 44, no. 2, p. 220-226, 2012.

YAMASHITA, M. M. et al. Where metal ions bind in proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, D.C., v. 87, no. 15, p. 5648-5652, 1990.

YAN, G.; VIRARAGHAVAN, T. Heavy-metal removal from aqueous solution by fungus *Mucor rouxii*. **Water Research**, New York, v. 37, no. 18, p. 4486-4496, 2003.

YANG, S. et al. Removal of bisphenol A and diclofenac by a novel fungal membrane bioreactor operated under non-sterile conditions. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 85, p. 483-490, 2013.

YU, Z. et al. Bioremediation and fodder potentials of two *Sargassum* spp. in coastal waters of Shenzhen, South China. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 85, no. 2, p. 797-802, 2014.

ZEARLEY, T. L.; SUMMERS, R. S. Removal of trace organic micropollutants by drinking water biological filters. **Environmental Science & Technology**, Washington, D.C., v. 46, no. 17, p. 9412-9419, 2012.

ZHANG, Y.; GEIßEN, S-U.; GAL, C. Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. **Chemosphere**, Oxford, v. 73, no. 8, p. 1151-1161, 2008.

ZHOU, P. et al. Treatment of high-strength pharmaceutical wastewater and removal of antibiotics in anaerobic and aerobic biological treatment processes. **Journal of Environmental Engineering**, New York, v. 132, no. 1, p. 129-136, 2006.

# Biotecnologia microbiana marinha

---

Marcus Adonai Castro da Silva, André Oliveira de Souza Lima

## 10.1 Introdução

Os oceanos cobrem em torno de 70% da superfície terrestre. Em toda sua extensão, os oceanos incluem grande variedade de habitats, desde águas e sedimentos estuarinos, que apresentam mistura de águas marinhas e continentais, até os ambientes ditos profundos, nos quais prevalecem a ausência de luz, baixas temperaturas e pouca disponibilidade de matéria orgânica. Os micro-organismos são encontrados em todos estes ambientes marinhos, desempenhando importantes funções para o ecossistema incluindo a produção primária, a decomposição de matéria orgânica, a ciclagem de elementos como o nitrogênio e o enxofre e suas diversas interações com outras formas de vida, microbianas ou não.

Como reflexo dos vários ambientes considerados marinhos e destas várias funções ecológicas, os micro-organismos que vivem nos oceanos são grandemente diversificados, tanto do ponto de vista filogenético, quanto em relação com seus aspectos fisiológicos e bioquímicos. Entretanto, esta diversidade microbiana é em grande parte desconhecida, especialmente em função da dificuldade de acesso aos ambientes marinhos mais afastados dos continentes. Além disso, considerando que grande parte dos micro-organismos marinhos ainda resiste ao cultivo em laboratório (JOINT; MÜHLING; QUERELLOU, 2010), reconhece-se que a maioria das espécies microbianas marinhas ainda aguarda uma descrição taxonômica apropriada.

Apesar disto, com base em décadas de estudo, estabeleceu-se o enorme potencial biotecnológico dos micro-organismos de origem marinha. Este potencial inclui seu uso na produção de enzimas com características distintas das originadas de organismos terrestres (LEE et al., 2010), a obtenção de novos bioativos (PETTIT, 2011), que ampliam o uso já estabelecido de moléculas de origem microbiana, e a atuação em processos que requerem condições específicas, similares às que ocorrem em ambientes marinhos, como a biorremediação de ambientes salinos (DASH et al., 2013). Neste capítulo serão apresentados alguns dos potenciais



biotecnológicos dos micro-organismos de origem marinha, iniciando-se pelas ferramentas de bioprospecção microbiana.

## 10.2 Bioprospecção de micro-organismos marinhos

A bioprospecção de micro-organismos marinhos pode ser conduzida com duas abordagens distintas, dependentes e independentes de cultivo. As metodologias dependentes de cultivo envolvem o estabelecimento de culturas laboratoriais dos organismos de interesse. Já nas metodologias independentes de cultivo são feitas análises de genes de interesse biotecnológico em material genético extraído das amostras nas quais os micro-organismos se encontram. Estas metodologias moleculares permitem a prospecção de organismos que ainda não foram cultivados em laboratório, que compreendem a maioria da microbiota marinha.

## 10.3 Metodologias dependentes de cultivo

O cultivo de micro-organismos marinhos pode ser feito pela aplicação de metodologias tradicionais de microbiologia, incluindo o isolamento direto em meios sólidos e o enriquecimento seletivo, seguido da inoculação de placas de Petri contendo meios de cultura (Figura 1). O ágar marinho tem sido o meio de cultura mais utilizado para o isolamento de bactérias marinhas, apesar de normalmente permitir apenas o crescimento das espécies mais facilmente cultiváveis. Outros meios de cultura podem ser formulados para a obtenção de organismos para fins biotecnológicos específicos. Para a obtenção de micro-organismos produtores de enzimas, por exemplo, são usados meios suplementados com seus substratos. No isolamento de organismos biodegradadores de hidrocarbonetos e outras moléculas similares, utiliza-se um meio de cultura mineral contendo estas moléculas como únicas fontes de carbono e energia. Estas estratégias específicas são muitas vezes utilizadas nas etapas de enriquecimento seletivo, a fim de aumentar o sucesso de obtenção das culturas de interesse.

Após o isolamento, seja por métodos seletivos ou não, os micro-organismos são avaliados em relação ao seu potencial biotecnológico ou para a seleção das linhagens mais ativas entre as que apresentam a característica visada. Estas avaliações podem ser conduzidas em ensaios fisiológicos em meios de cultura,

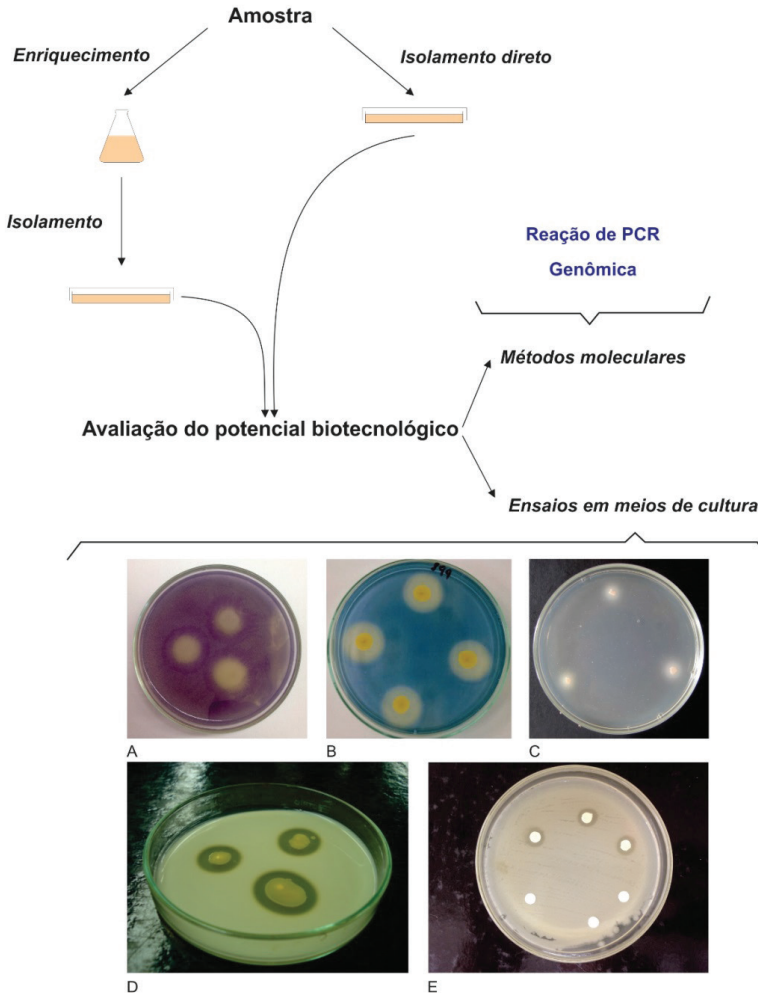
nas quais a produção da molécula de interesse, ou sua atividade, é determinada. Pode-se também avaliar os organismos cultivados por métodos moleculares, como a detecção de genes específicos pela reação de PCR ou pela análise do genoma, a fim de se estabelecer o seu potencial biotecnológico.

Nos últimos anos, a obtenção de culturas de organismos até então cultivados, mais representativos dos principais grupos filogenéticos marinhos, tem sido um dos principais desafios da microbiologia. Os motivos de estes organismos resistirem às tentativas de cultivo foram enumerados por Joint; Mühlhing; Querellou (2010) e incluem a interrupção de interações naturais entre os micro-organismos, como a produção de substâncias estimulantes específicas, das quais certos organismos dependem, pelos procedimentos tradicionais de isolamento, a incapacidade de utilização dos substratos fornecidos nos meios utilizados no cultivo e a toxicidade das altas concentrações de nutrientes normalmente utilizadas em laboratório.

Poucos organismos dos principais grupos filogenéticos marinhos foram até agora obtidos em cultura, pelo emprego de uma variedade de metodologias. Estas compreendem o uso de meios de cultura diluídos ou até a própria água marinha como meio de cultura, a substituição do ágar por outros agentes solidificantes como a agarose e estratégias que se baseiam na produção de moléculas como sideróforos e autoindutores de quorum sensing (ver a seguir), em co-culturas com outros organismos ou consórcios microbianos (JOINT; MÜHLING; QUERELLOU, 2010).

### **10.3.1 Metodologias independentes de cultivo**

Como alternativa para o estudo dos micro-organismos não cultiváveis, mais recentemente, têm-se empregado métodos moleculares independentes de cultivo, como a metagenômica ou metatranscriptômica, ou estudo do DNA e RNA ambiental, respectivamente (SABREE et al., 2009). Trata-se de ferramentas adicionais e poderosas para o estudo de qualquer micro-organismos, uma vez que viabiliza o acesso à coleção de genomas da comunidade microbiana como um todo.

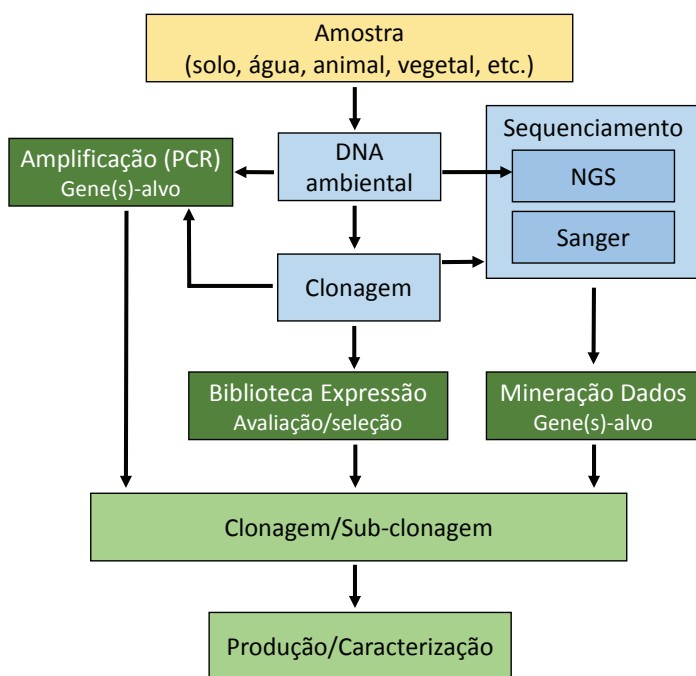


**Figura 1** - Estratégias dependentes de cultivo para o isolamento e seleção de micro-organismos marinhos de interesse biotecnológico. Ensaio de (A) inibição do *quorum sensing* em *Chromobacterium violaceum*; (B) produção de sideróforos em ágar cromo azurol S; (C) atividade lipolítica em ágar marinho contendo Tween 20 a 0,5%; (D) ensaio de atividade proteolítica em ágar marinho contendo leite desnatado (E) ensaio de atividade antimicrobiana com *Vibrio cincinnatiensis*.

Fonte: Os autores.

Desta forma, seu emprego tem contribuído em estudos ambientais e ecológicos, por meio do acesso à diversidade e à estrutura das comunidades microbianas e suas possíveis interações. Exemplos incluem desde o conhecimento da microbiota associada ao sistema digestivo de humanos e sua relação com patogenicias; a comunidade bacteriana associada à resposta sistêmica em vegetais; processos de sucessão microbiana em uma

ilha; ou ainda as comunidades microbianas marinhas ao longo da coluna e nas massas de água. Portanto, tem ampliado em muito o poder e a profundidade das análises em ecologia microbiana. Além disso, um aspecto de grande relevância associado à implementação das ferramentas de estudo do DNA e RNA ambiental, é sua eficácia na prospecção de novas moléculas de relevância biotecnológica. Neste contexto, têm-se descrito uma série de novas enzimas (proteases, lipases, glucanases etc.) e clusters gênicos associados à síntese de bioativos (antibiótico) e biopolímeros (MILSHTEYN; SCHNEIDER; BRADY, 2014). De maneira geral, no contexto da bioprospecção os estudos envolvem o isolamento do ácido nucleico a partir da amostra de interesse e sua análise, a qual pode ser realizada de três modos distintos: a) biblioteca metagenômica funcional, b) amplificação de genes-alvo ou c) sequenciamento, mineração e seleção de gene-alvo. Na Figura 2 são apresentadas as etapas empregadas para a implementação dos diferentes tipos de abordagens. Destaca-se que uma vez clonado o DNA, o mesmo poderá seguir para qualquer uma das três estratégias. Ainda independentemente do processo adotado, nas etapas finais o(s) gene(s) são clonados e seus produtos ou produtos de sua ação são caracterizados.



**Figura 2** - Estratégias e respectivas etapas empregadas em programas de bioprospecção independentes de cultivo.

Fonte: Os autores.

Atualmente, os projetos de metagenômica são facilitados pelas técnicas de sequenciamento de nova geração de DNA (*Next Generation Sequencing* – NGS). Estas fornecem ferramentas experimentais com custo mais acessível e livre do processo de clonagem, a qual era necessária no método anterior - Sanger (terminação de cadeia). Neste contexto, a prospecção baseada em sequências tem avançado e, um conjunto de ferramentas de bioinformática e biologia molecular para a identificação, captura e expressão de genes e clusters biossintéticos tornaram-se factíveis (SABREE et al. 2009; MILSHTEYN; SCHNEIDER; BRADY, 2014). Apesar de evoluir mais lentamente, as bibliotecas de expressão que foram os primeiros métodos de metagenômica desenvolvidos, ainda permitem o acesso a novas enzimas e bioativos. Acredita-se que este conjunto de métodos deve ampliar em duas a três ordens de magnitude a diversidade de vias biossintéticas a serem exploradas. Nos subitens, a seguir, serão apresentadas informações relacionadas a estas três estratégias de estudos, seus benefícios e dificuldades.

## 10.4 Biblioteca Metagenômica Funcional

Uma das principais estratégias para a clonagem de genes funcionais a partir de DNA ambiental é a construção e avaliação de bibliotecas metagenômicas funcionais (SABREE et al. 2009; MILSHTEYN; SCHNEIDER; BRADY, 2014). Em linhas gerais, este processo pode ser subdividido em quatro etapas: a) obtenção e preparo do DNA ambiental; b) clonagem do ácido nucleico em um vetor e sua introdução em um organismo hospedeiro; c) seleção do organismo recombinante ativo para a molécula-alvo e d) caracterização da molécula alvo. Por meio desta estratégia, tanto enzimas essenciais ao desenvolvimento microbiano, como metabólitos secundários puderam ser reconhecidos.

### 10.4.1 Amostras e obtenção dos ácidos nucleicos ambientais

São diversos os tipos de amostras que podem ser processadas para se acessar o DNA ambiental. Projetos iniciais de metagenômica focaram em amostras de solo e água, os quais apresentavam grande riqueza de espécies (5.000-40.000 espécies/g solo), bem como genes funcionais de relevância comercial. Posteriormente, amostras como sedimentos, biofilmes, efluentes industriais, associados a animais, receberam destaque devido a sua composição química única e, viabilizam a descoberta de enzimas, antibióticos, moléculas de comunicação etc. Independentemente do tipo de amostra, para a construção da biblioteca de expressão o primeiro passo

consiste no isolamento do DNA. Este deve ser obtido na quantidade e qualidade suficientes para assegurar a representatividade de toda comunidade microbiana, bem como permitir sua clonagem no vetor. Entretanto, a estrutura química e física da amostra influencia diretamente na quantidade / qualidade do DNA ambiental obtida. Por exemplo, no caso do ambiente marinho oceânico é necessário filtrar grandes volumes de água para se obter massa de DNA suficiente. Em compensação, caso a amostra esteja contaminada por químicos e enzimas estes permanecerão na água, dificilmente afetam a qualidade do produto final. Já no outro extremo, amostras de solo possuem compostos inorgânicos carregados, o que interfere na qualidade do DNA, dificultando sua posterior manipulação. Apesar disso, a possibilidade de dissociação física das células a partir de matrizes semissólidas, viabiliza a obtenção de DNA com elevado peso molecular. Atualmente, existem diversos kits comerciais que permitem a obtenção de DNA ambiental a partir de amostras de água, solo e demais matrizes semissólidas. Desta forma, em geral, o DNA obtido apresenta as características adequadas à construção da biblioteca, bem como sequenciamento. Caso a massa de DNA disponível seja insuficiente para a clonagem ou qualquer outra abordagem, uma opção é sua amplificação por meio de kits específicos de *Whole Genome Amplification*. Entretanto, apesar de ampliar a massa de DNA disponível, esta etapa pode eventualmente amplificar alguma região preferencial, como exemplo vírus de DNA fita simples, o que gerará um desvio na representatividade original da amostra.

#### **10.4.2 Construção da biblioteca metagenômica**

Uma vez com o DNA ambiental disponível, a próxima etapa consiste na construção da biblioteca (SABREE et al, 2009; MILSHTYEN; SCHNEIDER; BRADY, 2014). Trata-se de uma coleção de fragmentos do DNA ambiental, a qual deve representar o genoma da comunidade microbiana presente na amostra. Tais segmentos de DNA são clonados em vetores e, posteriormente inseridos em organismos hospedeiros. A estratégia de clonagem adotada depende diretamente do gene/atividade de interesse que, por sua vez, ditará o tamanho dos fragmentos de DNA e número de clones a serem avaliados. Por exemplo, quando se objetiva a seleção de genes únicos (hidrolases, determinantes de resistência antimicrobiana etc.), podem ser constituídas coleções com pequenos fragmentos (<10 kb) inseridos em vetores de clonagem usuais para *Escherichia coli* (pUC, pBluescript SK, pTOPO-XL, etc.). Já quando o alvo são os múltiplos genes (moléculas sinalizadoras, pigmentos, fatores de crescimento eucarióticos, operon etc.) são clonados fragmentos maiores (>20 Kb) em fosmídios (ex. pCC1FOS), cosmídios (ex. pWE15), ou cromossomos bacterianos artificiais (BAC). Assim, o número

de clones na biblioteca ou sua cobertura, dependerá do tamanho do inserto e da complexidade da comunidade microbiana. Por exemplo, serão necessárias coleções maiores, quando utilizados insertos menores a partir de amostras com elevada complexidade. Na prática, estruturas microbianas complexas são cobertas por fragmentos grandes, os quais aumentam a representatividade e a probabilidade de acesso à molécula-alvo.

Em sua grande maioria, as bibliotecas metagenômicas são construídas em *E. coli*, organismo modelo para expressão heteróloga. Este além de carregar mutações (*recA* – reduz recombinação, *endA* – reduz degradação de DNA) que facilitam a manutenção do DNA exógeno, também conta com uma série de ferramentas/equipamentos para seu uso. Para a inserção do DNA recombinante na bactéria o método preferencial é a eletroporação. Dificuldades podem ser encontradas na expressão de genes oriundo de organismo com elevada distância filogenética em relação a *E. coli*. Variações no *codon-usage*, sistema de reconhecimento e transporte pela membrana ou, até mesmo a presença de introns de genes eucarióticos não reconhecidos pelo sistema metabólico da *E. coli*, dificultam ou inviabilizam a produção/transporte das moléculas-alvo. Alternativamente, outros organismos hospedeiros podem ser empregados, tais como *E. coli*, *Pseudomonas putida* and *Bacillus subtilis*. Eventualmente, bibliotecas construídas em *E. coli* podem ser transferidas para outras espécies por meio da conjugação.

### 10.4.3 Avaliação da biblioteca metagenômica funcional e seleção de clones ativos

A última etapa em um programa de prospecção por biblioteca funcional consiste na identificação dos clones que expressam atividades de interesse. Por meio desta estratégia, diferentemente daquelas baseadas no sequenciamento, não é necessário que o gene de interesse possua homologia com moléculas já descritas. Neste contexto, os clones da biblioteca são reconhecidos por sua atividade, viabilizando além da descrição da molécula também a incorporação de novas informações nos bancos de dados de genes e proteínas. Para o processo de avaliação em si, foram adaptados os métodos tradicionais (hidrólise de substrato/formação de halos) empregados na avaliação enzimática (amilases, celulasas, lipases e quitinases) dos micro-organismos cultiváveis. Para a busca dos metabólitos secundários, tem-se focado na avaliação de fenótipos facilmente identificáveis, como produção de pigmentos e antibiose. Por exemplo, a avaliação quanto à inibição de *Bacillus subtilis* permitiu revelar os primeiros antibióticos (N-acil aminoácidos de cadeia longa, antibiótico isocianeto e etc.) obtidos por meio de estudos metagenômicos. Já por meio de ensaios colorimétricos com cromo azulol

S (CAS) foi reconhecida a produção de sideróforos (vibrioferrinae, bisucaberina) a partir de DNA marinho (FUJITA et al., 2011).

#### 10.4.4 Amplificação de genes-alvo

A amplificação de genes específicos por meio da PCR, também tem-se revelado como uma eficiente forma de reconhecer os clones de interesse em uma biblioteca (SABREE et al., 2009; MILSHTYEN; SCHNEIDER; BRADY, 2014). Por exemplo, para se evidenciar clones de determinado grupo taxonômico, podem ser utilizados *primers* para genes codificantes do RNA ribossomal. No contexto do ambiente marinho, esta estratégia foi empregada no reconhecimento de clones pertencentes aos indivíduos da família Streptomycetaceae (PRIETO-DAVÓ et al., 2013). Além da abordagem taxonômica, a ancoragem dos *primers* pode ser implementada para domínios conservados de genes funcionais de relevância (ex. peptídeos não ribossomais, policetídeossintases, isoprenoides, açúcares, ácido xiquímico, alcaloides, peptídeos ribossomais), a fim de se buscar clusters gênicos de relevância. Por exemplo, verificou-se que o método baseado no PCR para regiões conservadas de genes como peptídeos não ribossomais e policetídeossintases, foi cerca de dez a 100 vezes mais sensível na detecção de sequências únicas do que o sequenciamento total da amostra (WOODHOUSE et al., 2013). Além destes, exemplos de sucesso incluem o reconhecimento de clones codificantes de bioativos, como citotoxinas diméricas de triptofano, antitumorais, inibidores de protease, policetídeos aromáticos etc. Uma vez identificados os clones de interesse estes são sequenciados e, por meio de ferramentas de bioinformática faz-se a localização e análise da estrutura e composição dos genes relevantes. A amplificação de alvos específicos é uma estratégia eficiente, rápida e de baixo custo para avaliar a capacidade biossintética de metagenomas, sem requerer o completo sequenciamento do DNA ou a análise química dos metabólitos presente na amostra ambiental. Destaca-se que a detecção de genes de relevância também pode ser realizada diretamente no DNA metagenômico, o que permite reconhecer as amostras mais promissoras para a constituição de uma biblioteca funcional ou sequenciamento total.

#### 10.4.5 Sequenciamento, mineração e seleção de gene-alvo

Com o grande avanço nas plataformas de sequenciamento de segunda geração ou NGS (SOLiD / IonTorrent PGM - Life Sciences, GenomeAnalyzer / HiSeq 2000/MiSeq - Illumina, GS FLX Titanium/GS Junior - Roche, etc.), hoje é possível sequenciar



totalmente o DNA ambiental de uma amostra ou biblioteca metagenômica. Desta forma, um volume enorme de dados de sequências nucleotídicas de comunidades microbianas não cultiváveis está sendo revelado a partir de diferentes amostras ambientais (solo, água, associada a animais, plantas etc.). Grande parte deste conjunto de informações tem sido depositada em bancos públicos, o que tem contribuído para a ampliação do conhecimento acerca dos organismos não cultiváveis e seu potencial.

Em contraste com a seleção a partir da biblioteca funcional, onde se avaliou o fenótipo de interesse, nesta abordagem as sequências são utilizadas para a predição de genes funcionais. Muitas das ferramentas de bioinformática empregadas na mineração de dados genômicos, também foram implementadas para a montagem e análise das sequências metagenômicas. Como produto, uma vez montadas, as longas sequências nucleotídicas ambientais são triadas quanto à presença de genes codificantes de moléculas de relevância. Entretanto, o elevado nível de similaridade entre as sequências de diferentes organismos presentes na comunidade assim como a repetibilidade de domínios conservados em genes biossintéticos acabam por dificultar o processo de montagem dos metagenomas. Desta forma, o processo pode ser mais eficaz para metagenomas menos complexos ou assegurado para comunidades mais complexas quando se trabalha com grandes volumes de dados. Como exemplo, pesquisadores sequenciaram 240 Gb a partir do rúmen bovino e, identificaram mais de 27 mil genes envolvidos na degradação de biomassa. Portanto, mesmo sendo uma estrutura microbiana extremamente complexa, o enorme volume de dados viabilizou o estudo detalhado do microbioma ruminal (HESS et al., 2011).

#### **10.4.6 Enzimas de micro-organismos marinhos**

Micro-organismos de origem marinha têm sido descritos como capazes de produzir inúmeras enzimas de relevância biotecnológica (DALMASO; FERREIRA; VERMELHO, 2015; BONUGLI-SANTOS et al., 2015). Estas podem se diferenciar das produzidas por micro-organismos terrestres, uma vez que são adaptadas ao ecossistema em que são geradas. O ambiente marinho se caracteriza por apresentar ampla variação de condições, incluindo extremas, tais como alta pressão hidrostática, salinidade (3,4-3,5%), temperaturas baixas (0,2-5°C) e altas (80-95°C), escuridão total e baixa disponibilidade de nutrientes. Desta forma, tem sido um importante reservatório para a prospecção de enzimas microbianas, tais como hidrolases – lipases, proteases, glucanases, quitinases, amilases, entre outras.

O setor de enzimas movimentou cerca de U\$ 4,8 bilhões em 2013, sendo estimado atingir U\$ 7,1 bilhões em 2018 (BCC RESEARCH, 2014). Além do aspecto financeiro, destaca-se que enzimas são empregadas em tecnologias ambientalmente amigáveis e produzidas de maneira renovável. Diferentemente dos animais e plantas que são afetados pela variação nas condições de produção, os micro-organismos podem ser cultivados em biorreatores em condições controladas (pH, temperatura, aeração etc.), o que garante a reprodutibilidade do processo. Apesar disso, a produção de enzimas por alguns micro-organismos pode enfrentar limitações devido à baixa taxa de crescimento/produção ou a patogenias para o homem e/ou animais. Como alternativa, o gene codificante da enzima de interesse pode ser clonado em um vetor de expressão e produzido de maneira heteróloga em um organismo hospedeiro (ex. *E. coli*, *Bacillus*, *Pichia*, *Saccharomyces* etc.). Após a otimização de parâmetros (concentração de indutor, temperatura, tempo de cultivo etc.), a enzima recombinante obtida passa por processo de purificação e caracterização, seguindo procedimentos similares aos utilizados para as enzimas não recombinantes. A estratégia de expressão heteróloga tem sido usada tanto em nível laboratorial quanto industrial. Para se acessar o(s) gene(s) de interesse a serem clonados, estes podem ser proveniente de organismos cultiváveis como não cultiváveis como, por exemplo, a partir de programa de genômica e metagenômica, respectivamente. As enzimas podem ser empregadas em diversos processos industriais, tais como na área alimentícia, têxtil, farmacêutica, biocombustível, ambiental, química, detergentes etc. (LEE et al., 2010; DALMASO; FERREIRA; VERMELHO, 2015; BONUGLI-SANTOS et al., 2015). Nestes processos, as principais enzimas utilizadas são as hidrolases, tais como as amilases, proteases, celulases e lípases, as quais são destacadas nos próximos itens.

#### 10.4.7 Lipases

Enzimas lipolíticas catalisam a quebra ou a formação de ligações ésteres. Estas podem ser classificadas em duas famílias principais - as carboxilesterases (EC 3.1.1.1) e as lipases (EC 3.1.1.3). Elas compartilham características estruturais e funcionais como a presença do dobramento  $\alpha/\beta$  hidrolase na estrutura terciária principal, bem como a presença da tríade catalítica (serina, aspartato/glutamato e histidina). Lipases são em geral ativas sobre substratos insolúveis em água, como triglicerídeos composto por longas cadeias de ácidos graxos ( $C \geq 8$ ). Esterases preferencialmente hidrolisam ésteres simples e triglicerídeos formados por ácidos graxos com cadeias inferiores a oito carbonos. Essencialmente, as carboxilesterases não requerem cofatores e, normalmente, são estáveis em solventes orgânicos (ZHU et al., 2013). Considerando a sequência de aminoácidos, as esterases e lipases

são organizadas em oito famílias. As enzimas da família 1 são denominadas de lipases verdadeiras, ao passo que as demais são esterases. Vale destacar que novas possíveis lipases/esterases descritas em estudos genômicos, eventualmente não são incluídas em nenhuma destas famílias, por serem muito distintas. As lipases/esterases apresentam elevada regio e estereoespecificidade. Tais características as tornam de relevância no contexto da indústria médica quanto à síntese e hidrólise de compostos estéreo-específicos, incluindo o processamento metabólico de drogas e agentes antimicrobianos. As aplicações biotecnológicas das lipases incluem ainda seu uso na produção de alimentos, laticínios, cosméticos, agroquímicos, biossurfactantes, detergentes e na indústria de papel. Além disso, possuem grande potencial para a produção de biodiesel a partir da reação de transesterificação enzimática (DALMASO; FERREIRA; VERMELHO, 2015).

Vários micro-organismos lipolíticos de profundidade já foram descritos, incluindo *Photobacterium frigidiphilum*, *Pseudomonas* e várias espécies do gênero *Bacillus*. Entre estes tem-se dado destaque a busca de enzimas extremas, tais como termoestáveis e psicrófilas (DALMASO; FERREIRA; VERMELHO, 2015). Como, por exemplo, lipases/esterases termoestáveis foram detectadas e clonadas em espécies do gênero *Thermococcus*, o qual é encontrado em fontes hidrotermais marinhas e de água doce. Também a arqueia *Archaeoglobus fulgidus* DSM 4304 e *Pyrobaculum calidifontis* tiveram suas esterases clonadas em *E. coli*, as quais apresentaram atividade ótima a 80 e 90°C, respectivamente (HOTTA et al., 2002). Lipases psicrófilas são amplamente utilizadas na indústria química, detergentes, alimentos e biorremediação. Um exemplo, é a lipase (M37) de *Photobacterium lipolyticum*, isolado do mar Amarelo na Coreia, que mantém atividade entre 5 e 25°C (RYU et al., 2006). Esta e a lipases B de *Candida Antarctica* são investigadas quanto ao uso na produção de biodiesel. *Psychrobacter* sp. e *Vibrio* sp. também são exemplos de organismos produtores de lipases e esterases adaptadas ao frio, com enzimas ativas entre 4-15°C. Além das bactérias, também fungos de origem marinha foram descritos como lipolíticos (BONUGLI-SANTOS et al., 2015). Como, por exemplo, *Geotrichum marinume* *Aspergillus awamori* que produzem lipases ativas a 40°C, este último testado no tratamento de efluente oleoso.

Também genes de lipases/esterases foram prospectados por métodos independentes de cultivo. Por exemplo, a esterase EstF, a qual teve seu gene clonado e expresso em *E. coli*, apresentou atividade enzimática em ampla faixa (0 a 60°C) de temperaturas (FU et al., 2011). Assim como, nove novas lipases foram clonadas a partir de uma biblioteca metagenômica funcional de sedimento marinho. Também com características diferenciadas, uma esterase alcalina (EM2L8) e uma lipase psicrófila foram obtidas a partir da biblioteca metagenômica de sedimento marinho (PARK et al., 2007). Portanto, fica claro que o ambiente marinho é apropriado para a prospecção

de lipases de relevância industrial, sendo viáveis tanto a estratégia de seleção de organismos cultiváveis como métodos independentes de cultivo.

#### 10.4.8 Proteases

Dentre as enzimas hidrolíticas, as proteases ocupam posição de destaque, uma vez que são responsáveis por cerca de 40% do mercado de enzimas em todo o mundo. Além disto, é estimado um crescimento de 5%/anual atingindo um volume de U\$ 2,7 bilhões até 2019. Entre as proteases de relevância industrial, as microbianas apresentam ampla aplicação. Como exemplos são incluídas na formulação de detergentes, na fabricação de queijos, na preparação de hidrolisados de soja, para amaciar carne, na produção de cerveja, entre outros processos. Também, podem ser empregadas na indústria têxtil para a degomagem de seda, na agricultura para o controle de pragas ou como insumo de cosméticos. No contexto da bioconversão, tem sido empregada hidrólise de resíduos de pescados, para a geração de produtos de alto valor agregado.

As proteases (EC 3.4.) são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas em proteínas ou peptídeos. Para sua classificação são utilizados três critérios: a) mecanismo químico de catálise; b) tipo de reação catalisada e c) estrutura molecular e homologia. Quanto ao sítio/grupo catalítico, podem ser subdivididas como serina, cisteína, treonina, aspártica, glutâmica, asparagina, metalo, mista e desconhecida. Quanto ao tipo de reação, podem ser organizadas em endopeptidases (EC 3.4.21-99) que hidrolisam internamente a cadeia polipeptídica e, nas exopeptidases (EC 3.4.11-19) que atuam nas extremidades do polímero. Por fim, o terceiro critério relaciona-se à organização das peptidases em famílias, as quais são baseadas na sequência primária e na estrutura terciária (DALMASO; FERREIRA; VERMELHO, 2015).

A fim de obter proteases ativas e tolerantes às condições industriais de uso, diversos ambientes extremos são considerados para sua prospecção, tais como salino, desértico, solo Antártico e amostras de profundidade oceânica. Dentre as bactérias marinhas proteolíticas de profundidade os gêneros *Pseudoalteromonas*, *Alteromonas* e *Shewanella* se destacam. Entre os fungos, *Aspergillus ustus* (isolado a 5.000 m, oceano Índico) apresentou protease ativa em ampla faixa de pH (pH 6-10). Assim como, a levedura *Aureobasidium pullulans* produziu peptidase com atividade ótima em pH ácido e a 45°C (BONUGLI-SANTOS et al., 2015). Paralelamente, projetos de metagenômica prospectiva também estão focando nas proteases. Por exemplo, uma nova subtilisina (serina protease) descrita a partir da biblioteca metagenômica de sedimentos Antártico. Esta possuía 51% de identidade com a

descrita em *Salinibacter ruber*, portanto, sugerindo tratar-se de uma nova enzima (ZHANG; ZHAO; ZENG, 2011).

### 10.4.9 Amilases

As amilases são enzimas que hidrolisam moléculas do amido gerando monômeros de glicose. O amido é uma abundante reserva de energia presente em plantas superiores. Ele é composto por dois tipos de polímero, a amilose e a amilopectina. O primeiro é formado por resíduos de glicose ligados ( $\alpha$ 1,4) linearmente formando estrutura helicoidal. A amilopectina é menos solúvel que a amilose e representa cerca de 75-80% do grão. Esta é constituída por moléculas de glicose ligadas ( $\alpha$ -1,4) e ramificações com ligação  $\alpha$ -1,6. Diversas enzimas são incluídas no grupo das amilases, as quais podem ser subdivididas em três de acordo com sua especificidade pelo substrato e modo de atuação. As endoamilases ( $\alpha$ -amilase - EC 3.2.1.1) hidrolisam as ligações  $\alpha$ -1,4 internas na cadeia principal liberando dextrinas. As exoamilases ( $\beta$ -amilase - EC 3.2.1.2, glucoamilase - EC 3.2.1.3,  $\alpha$ -glucosidase - EC 3.2.1.20) atuam sobre as extremidades da cadeia  $\alpha$ -1,4, liberando o dissacarídeo maltose ou  $\beta$ -ciclodextrinas e glicose. Por fim, as enzimas desramificantes (pululanase - 3.2.1.41, isoamilase - EC 3.2.1.68, dextrinase - EC 3.2.1.142) atuam principalmente sobre as cadeias laterais liberando maltose ou malto-oligossacarídeos (DALMASO; FERREIRA; VERMELHO, 2015).

As amilases apresentam grande relevância industrial, uma vez que são empregadas em diversos processos, desde o setor alimentício, passando pelo têxtil, papel, até a produção de biocombustível. Entre as hidrolases, as amilases representam cerca de 25% do mercado mundial de enzimas industriais. Na área alimentícia é incluída no pão a fim de melhorar a textura, gosto, coloração e validade do produto. Podem ser empregadas no clareamento de cervejas e sucos, assim como, no incremento da digestibilidade de rações para animais. A produção de papel e tecidos faz uso de amilases durante a degomagem destes produtos, ou ainda são empregados em detergentes como removedores de amido. Além destes, hoje, um dos grandes consumidores de amilases é a indústria produtora de etanol a partir de milho, a qual a emprega durante o processo de sacarificação do amido. A fim de obter moléculas mais adaptadas as variadas aplicações industriais são realizados programas de prospecção. Por exemplo, a indústria de detergentes, busca por amilases com atividade ótima em pH alcalino e temperaturas mais baixas, além de estabilidade oxidativa. Também são valorizadas amilases capazes de sacarificar o amido em temperaturas amenas, o que reduziria o custo e o impacto ambiental do processo. Neste contexto, foram descritas enzimas psicrófilas marinhas, como a  $\alpha$ -amilase de *Pseudoalteromonas haloplanktis* que apresenta 80% a 10°C (SRIMATHI

et al., 2007). Também a  $\alpha$ -amilase de *Zunongwangia profunda* apresentou-se adaptada às condições de baixa temperatura e elevada salinidade. No outro extremo, também já foram descritas amilases termofílicas. Como exemplo, a bactéria *Staphylothermus marinus* isolada a partir de uma fossa hidrotermal do Pacífico, produz uma amilopululanase ativa sobre pululana e ciclodextrina a 105°C (LI; LI; PARK, 2013). Além desta, uma  $\alpha$ -amilase com temperatura ótima de atividade a 110°C é produzida por linhagem de *Bacillus* isolado de salina marinha. Exemplos de enzimas tolerantes à salinidade e temperatura incluem a  $\alpha$ -amilase de *Halomonas* sp. AAD21 (UZYOL et al., 2012) e *Holoarcula* sp. S-1. Portanto, conclui-se que o ambiente marinho é uma excelente opção para a prospecção de amilases ativas em condições extremas.

Micro-organismos eucariotos também já foram descritos como amilolíticos (BONUGLI-SANTOS et al., 2015). Como exemplo, a levedura marinha *Aureobasidium pullulans* N13d, isolada das profundezas do oceano Pacífico, produz glucoamilase com atividade ótima a 60°C e pH 4,5. Além desta, o fungo filamentososo *Mucor* sp., isolado de uma esponja marinha produziu amilase ativa a 60°C/pH 5. No que se refere aos estudos independentes de cultivo, a partir de uma biblioteca metagenômica funcional de sedimento do oceano profundo (1.180 m) da península Shimokita (Japão), foram descritas 212 diferentes  $\alpha$ -amilases. Dentre os produtos comercializados, hoje existem duas amilases prospectadas a partir de metagenomas de oceano profundo. Uma delas é a Ultra-Thin®, uma  $\alpha$ -amilase com atividade ótima a 105°C e pH 4,5, aplicada para a produção de xaropes de glicose e de bioetanol. A outra é a Fuelzyme® (Empresa Verenum), uma  $\alpha$ -amilase hipertermofílica ativa a 85-91°C e pH 5,0-5,4 isolada a partir de amostra associada a fonte hidrotermal.

#### 10.4.10 Celulases

As celulases são enzimas que constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise. Pertencem a este grupo as enzimas endoglucanases (EC 3.2.1.4), exoglucanases (EC 3.2.1.91) e beta  $\beta$ -glucosidases (EC 3.2.1.21). Estas são biocatalisadoras altamente específicas que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais a glicose é o que desperta maior interesse industrial. Sua versatilidade é observada na diversidade de aplicações. Como exemplos, na indústria alimentícia são utilizadas na panificação, conferindo-lhes melhor textura, qualidade e vida útil aos pães. Assim como, atuam no processo de extração e clarificação de sucos juntamente com as pectinases. Na indústria de papel e celulose, atuam com hemicelulase e endoxilanasase no processo de branqueamento do papel. Na indústria têxtil, as celulases atuam hidrolisando pequenas fibras da superfície do tecido (*biostonewashing*), fazendo com que ocorra

a perda do índigo. Também são usadas no biopolimento que consiste no corte das microfibrilas presentes na superfície do tecido, tornando-o mais liso e agradável. Ainda apresentam grande potencial na sacarificação de resíduos celulósicos para produção de etanol de segunda geração. Este processo é de grande relevância, uma vez que constitui uma alternativa renovável de combustível.

Devido às condições extremas de pH, temperatura, inibidores e especificidade com que os processos industriais são conduzidos, é fundamental que as enzimas utilizadas sejam resistentes a essas condições. Assim, existe demanda por novas fontes de enzimas capazes de melhorar os processos industriais. Neste contexto, a prospecção no ambiente marinho pode permitir acesso a moléculas diferenciadas mais tolerantes às condições industriais.

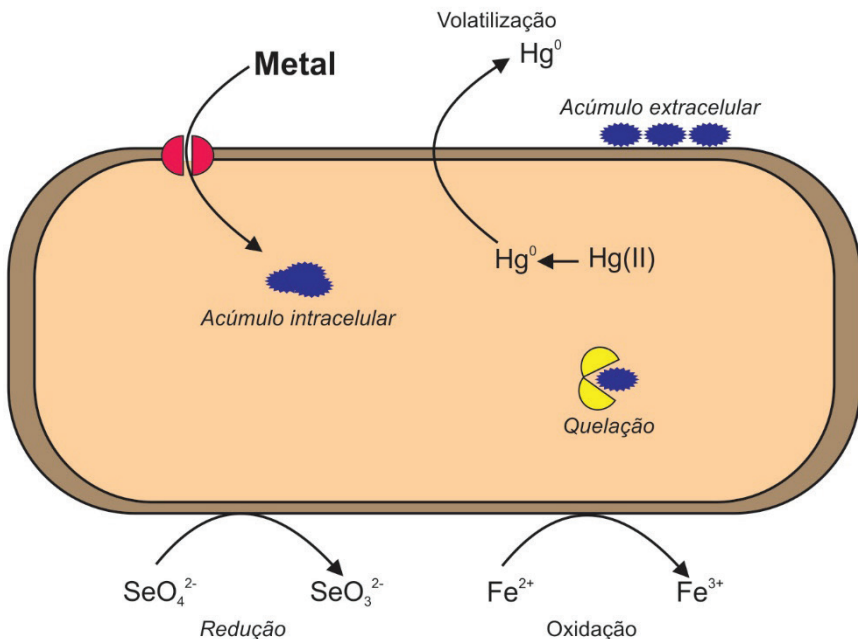
No ambiente marinho as fontes de celulose podem ser oriundas da parede celular de macroalgas, microalgas, tunicados e do ambiente terrestre. A produção de celulases já foi relatada em várias bactérias de profundidade incluindo os gêneros *Pseudoalteromonas* e *Bacillus*. Por exemplo, *Bacillus stratosphericus* isolado de sedimentos (5.000 m) do Atlântico Sul apresentou atividade de endoglucanase, xilanase e lipase, sendo os genes clonados/expressos ativamente em *E. coli* (LIMA et al., 2013). Também a partir da bactéria *Thermotoga maritima*, a qual foi isolada de uma fossa termal, foram clonadas beta-glucosidases e xilanases (atua sobre hemicelulose) (GOYAL; SELVAKUMAR; HAYASHI, 2001). A partir da bactéria de profundidade *Kocuria* sp. também foi clonada uma endoxilanase com atividade ótima a 55°C. Assim como para as demais enzimas apresentadas, programas de prospecção metagenômica também foram conduzidos com celulases. Como exemplo do sucesso, já foi descrito por mais de um grupo de pesquisa, a clonagem de beta-glucosidase a partir de biblioteca metagenômica funcional. Assim como, uma xilanase já foi alvo desta mesma estratégia de prospecção. No que se refere aos fungos (BONUGLI-SANTOS et al., 2015), podemos mencionar endoglucanases ativas à baixa temperatura produzidas por fungos associados a esponja marinha *Haliclona simulans*. Ou ainda *Penicillium canescens* de origem marinha próximo ao Japão, produtor de  $\beta$ -glucosidase ativa em pH 4,5.

#### 10.4.11 Biorremediação

A biorremediação é um conjunto de técnicas nas quais organismos são utilizados para a remoção de contaminantes do ambiente. Apesar de esta definição incluir qualquer contaminante, na biorremediação os contaminantes de maior risco ou toxicidade são normalmente alvejados. Os organismos envolvidos incluem microorganismos e plantas.

Para a remoção dos contaminantes orgânicos, os micro-organismos utilizam o composto como fonte de carbono e energia, como no caso de hidrocarbonetos de petróleo, ou como aceptores de elétrons, como em muitos organoclorados. Às vezes o contaminante não é diretamente metabolizado pelo micro-organismos. Nestes casos, enzimas com certa inespecificidade, produzidas para o metabolismo de um determinado substrato, atuam na molécula contaminante de maneira fortuita, em um processo denominado de cometabolismo. Busca-se na biorremediação a conversão das moléculas tóxicas em substâncias inócuas como  $H_2O$  e  $CO_2$ , apesar de nem sempre isto ser possível.

Em se tratando de contaminantes inorgânicos como os metais, o processo de biorremediação baseia-se em algum mecanismo de resistência natural do micro-organismos (Figura 3). Estes mecanismos incluem reações de oxidação, de redução, a quelação do elemento, o acúmulo intracelular e extracelular e a volatilização. Em todos os casos, as moléculas tóxicas não são destruídas e sim convertidas em outras menos tóxicas ou menos disponíveis biologicamente. Entre os organismos marinhos, estudados em relação com a resistência e remoção de metais podem ser destacados os gêneros *Vibrio*, *Rhodobium* e *Rhodobacter* (DASH et al., 2013).



**Figura 3** - Mecanismos microbianos de resistência aos metais, que podem ser úteis em processos de biorremediação.

Fonte: Os autores.



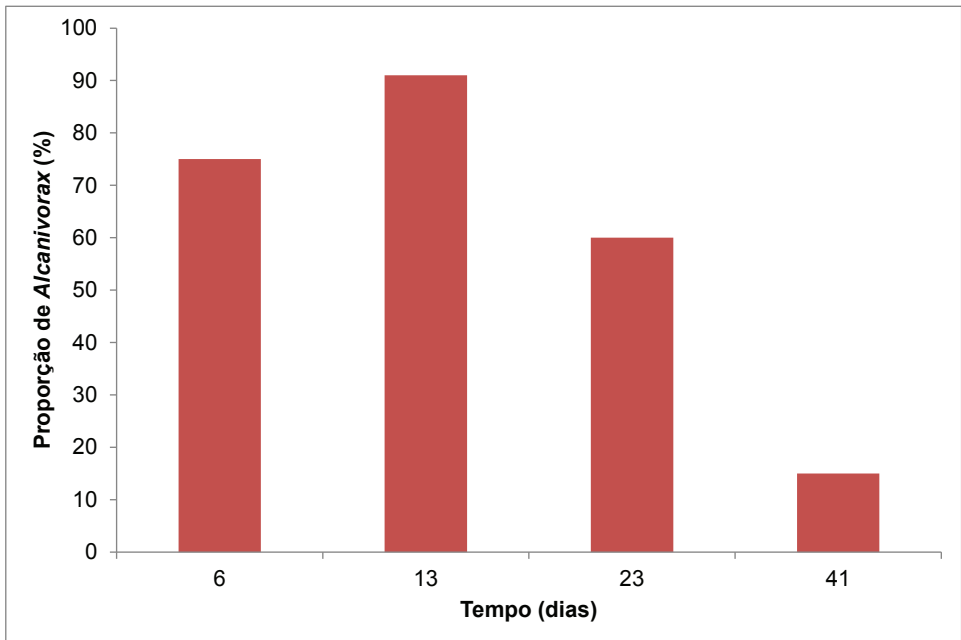
A maior parte da pesquisa em biorremediação de ambientes marinhos é focada em derrames de petróleo. Duas técnicas têm sido aplicadas nestas situações, a bioaugmentação e a bioestimulação. A bioaugmentação é definida como a introdução de micro-organismos degradadores em um ambiente contaminado, com a finalidade de promover a destruição dos poluentes presentes. Na bioestimulação, por outro lado, é feita a adição de nutrientes e outras moléculas, com o objetivo de estimular a biodegradação pela microbiota nativa (ALVAREZ; ILLMAN, 2006). De maneira geral, a bioaugmentação é recomendada para locais que não apresentam os organismos necessários ao processo de biorremediação, enquanto que a bioestimulação é usada para suprimir demandas nutricionais da população de micro-organismos degradadores já presentes nos locais. Ambas as técnicas podem ser combinadas com outras estratégias de remediação como, por exemplo, o uso de barreiras de contenção.

Entre estas duas técnicas, a bioestimulação parece ser a de melhor aplicação no ambiente marinho. Primeiramente, organismos selecionados em laboratório e reintroduzidos em um local contaminado normalmente não apresentam alta sobrevivência, sendo eliminados pelos organismos nativos mais competitivos. Além disso, os micro-organismos degradadores parecem ser comuns no ambiente marinho, tornando desnecessária a introdução de organismos selecionados em laboratório. Finalmente, nutrientes como o nitrogênio parecem ser os fatores limitantes de muitas populações naturais de organismos degradadores, e basta sua introdução para estimular esta microbiota e acelerar o processo de remoção dos contaminantes. Isto foi demonstrado nos esforços de recuperação de praias contaminadas com petróleo após o derrame do Exxon Valdez no Alaska, em 1989 (FUENTES et al., 2014).

O comportamento de uma comunidade microbiana durante um processo de recuperação ambiental é um aspecto frequentemente levantado em relação com o uso de técnicas de biorremediação. Diversos gêneros de bactérias marinhas são relatados como biodegradadores de hidrocarbonetos de petróleo. Entre estes se destacam os organismos ditos hidrocarbonoclasticos obrigatórios, isto é, que crescem apenas a partir de poucos tipos de hidrocarbonetos. Estes organismos, que incluem *Alcanivorax borkumensis*, *Oleiphilus messinensis*, *Oleispira antarctica* e *Thalassolituus oleivorans* (YAKIMOV; TIMMIS; GOLYSHIN, 2007), são normalmente pouco abundantes em ambientes marinhos não contaminados mas, como esperado, seu número é maior em locais contendo hidrocarbonetos. Durante as aplicações de nutrientes em processos de bioestimulação, a população de organismos degradadores aumenta de maneira significativa, retornando posteriormente às suas concentrações normais (Figura 4) (FUENTES et al., 2014).

## 10.5 Bioativos e outras moléculas microbianas

Os micro-organismos marinhos têm sido investigados como novas fontes de diversos tipos de biomoléculas. Estas incluem antibióticos, sideróforos, anti-incrustantes e polímeros diversos como os poli-hidroxicanoatos. Grande parte das moléculas bioativas descritas deriva de micro-organismos endossimbiontes ou associados a invertebrados, incluindo esponjas, moluscos e briozoários.



**Figura 4** - Variação temporal na proporção do gênero *Alcanivorax* em água marinha suplementada com petróleo.

Fonte: Harayama et al. (1999).

### 10.5.1 Antibióticos

Os antibióticos são moléculas produzidas por micro-organismos, que inibem outros micro-organismos. O primeiro antibiótico descrito há quase cem anos, a penicilina, foi originalmente obtido de fungos do gênero *Penicillium*, de origem terrestre, assim como vários antibióticos isolados posteriormente, incluindo aqueles originados de bactérias do gênero *Streptomyces*. Como produto da descoberta dos antibióticos, o homem pode controlar e tratar de maneira mais eficaz as suas próprias

doenças infecciosas e de animais. Entretanto, o uso incorreto e indiscriminado dos antibióticos provocou a seleção e disseminação de organismos resistentes. Por causa disso, tem sido constante a busca de novos compostos com atividade antimicrobiana, em ambientes até então não explorados ou pouco conhecidos.

Tem-se estudado cada vez mais a atividade antimicrobiana em micro-organismos de origem marinha. Estima-se que as linhagens microbianas marinhas apresentam frequências de produção de antibióticos comparáveis às dos fungos e bactérias terrestres (SPONGA et al., 1999). Em organismos marinhos, assim como nos de outros ambientes, os antibióticos podem ser importantes mediadores da competição por nutrientes e outros recursos, tanto na coluna d'água, quanto nos sedimentos.

### 10.5.2 Inibidores de *quorum sensing*

O *quorum sensing* é um mecanismo de controle da expressão gênica pela densidade celular. Neste mecanismo os micro-organismos produzem, durante o crescimento celular, moléculas denominadas de autoindutores. Com o aumento da população microbiana, à medida que os autoindutores se difundem para fora da célula, a concentração destas moléculas aumenta. Quando a concentração ultrapassa um limiar, a expressão de genes, envolvidos em processos importantes em situações de alta densidade celular, é ativada. Estes processos incluem a bioluminescência, a produção de fatores de virulência e a formação de biofilmes. Os tipos de autoindutores variam dependendo do tipo de bactéria. Em bactérias Gram-negativas são sintetizadas moléculas do tipo lactonas acil-homoserinas, enquanto que em Gram-positivas são produzidos peptídeos de baixo peso molecular. De maneira geral, o *quorum sensing* pode ser visto como um mecanismo de comunicação entre células.

A produção de moléculas que inibem o *quorum sensing* é um atributo de diversos gêneros de bactérias marinhas como, por exemplo, *Oceanobacillus* e *Halomonas* (ROMERO et al., 2011), tendo sido relatada também em alguns gêneros de fungos como *Sarocladium*, *Fusarium*, *Epiceccum* e *Khiska* (MARTÍN-RODRÍGUEZ et al., 2014). Os mecanismos de ação destas moléculas antagonistas incluem a ligação a receptores de autoindutores e a produção de enzimas que degradam as lactonas acil-homoserinas. Estas enzimas são de ao menos três tipos (CZAJKOWSKI; JAFRA, 2009): (1) lactonases, que hidrolisam o anel lactona nas lactonas acil-homoserinas; (2) acilases ou amidases, que liberam uma homoserina lactona livre de seu ácido graxo; (3) oxidoredutases, que reduzem as lactonas acil-homoserinas em seus derivados 3-hidroxi. A maioria destas enzimas apresenta atividade intracelular. As moléculas que se ligam aos receptores

imitam a estrutura dos autoindutores, mas não apresentam a mesma atividade biológica.

A inibição do *quorum sensing* foi apontada como importante na manutenção da homeostase do ecossistema intestinal de organismos aquáticos produzidos para fins comerciais, por inibir a virulência de patógenos como *Edwardsiella tarda* e dos gêneros *Aeromonas* e *Vibrio* (ZHANG et al., 2015). Além disso, pela sua atuação no controle de biofilmes (SALINI et al., 2015), os inibidores de *quorum sensing* foram indicados para o controle de problemas associados a estes tipos de comunidades, incluindo as bioincrustações marinhas. O processo de bioincrustação se inicia com a adsorção de matéria orgânica a uma superfície, e tem continuidade com o estabelecimento de um biofilme bacteriano, que envolve a comunicação entre células através do *quorum sensing*. Uma vez estabelecido, o biofilme permite o assentamento de organismos maiores como algas e cracas (HOLMSTRÖM et al, 2005). Portanto, por interromper o *quorum sensing*, os inibidores deste processo impedem a formação de biofilmes, impedindo o estabelecimento de organismos incrustantes.

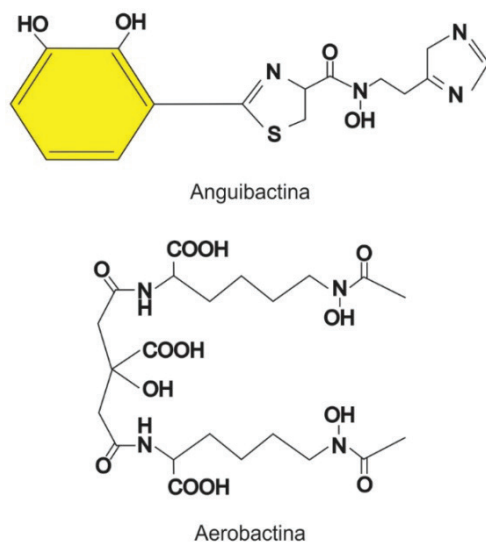
### 10.5.3 Sideróforos

O ferro é um dos elementos mais abundantes no nosso planeta, sendo necessário para o crescimento da maioria dos seres vivos. Apesar disto, na presença de oxigênio, o ferro encontra-se na forma de íon férrico, pouco solúvel e normalmente de difícil absorção pelos micro-organismos. Portanto, para adquirir este nutriente, os micro-organismos sintetizam quelantes de alta afinidade pelo ferro, denominados de sideróforos. Especula-se que a maioria das bactérias aeróbias ou facultativas produza ao menos um tipo de sideróforo (VRASPIR; BUTLER, 2009).

Os sideróforos podem ser distinguidos em função dos grupos funcionais que quelam o ferro (Figura 5). Catecóis, hidroxamatos e ácidos carboxílicos estão frequentemente presentes na estrutura de sideróforos. Vários gêneros de fungos e bactérias marinhas foram estudados em relação à produção de sideróforos, incluindo os gêneros de *Penicillium*, *Cunninghamella*, *Vibrio*, *Marinobacter*, *Halomonas* e *Synechococcus*. Sideróforos contendo hidroxamatos e ácidos carboxílicos parecem ser os mais comuns entre as bactérias e fungos de origem marinha (HOLINSWORTH; MARTIN, 2009; VRASPIR; BUTLER, 2009).

Várias aplicações biotecnológicas foram sugeridas ou associadas aos sideróforos. A remoção do excesso de ferro no sangue, associado ao tratamento da talassemia, pode ser realizada através do uso de um sideróforo de *Streptomyces pilosus*. Em *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, a produção de sideróforos tem sido relacionada com a capacidade de degradar hidrocarbonetos, por atender a demanda desta bactéria

por ferro. Os sideróforos também podem estar envolvidos com a inibição de patógenos de peixes, geralmente do gênero *Vibrio*, sendo esta uma aplicação na maricultura. Finalmente, por serem capazes de quelar metais tóxicos, tornando-os, nestes casos, não biodisponíveis, os sideróforos também podem ser utilizados em processos microbianos de biorremediação (LI; CHI, 2004).



**Figura 5** - Exemplos de sideróforos produzidos por bactérias marinhas do gênero *Vibrio* (VRASPIR; BUTLER, 2009). A anguibactina é um sideróforo contendo o grupo catecol (em amarelo), produzido por *Vibrio anguillarum*, enquanto que a aerobactina é produzida por *Vibrio* sp. DS40M5, entre outras bactérias, e contém ambos hidroxamatos (na parte direita da molécula) e ácidos carboxílicos (neste caso o citrato, na parte esquerda da molécula).

Fonte: Vraspir e Butler (2009).

#### 10.5.4 Bioplásticos

Os materiais plásticos fabricados a partir dos derivados do petróleo apresentam diversas características (moldagem, durabilidade etc) que favoreceram seu amplo emprego. Entretanto, tornou-se um problema ambiental pelo acúmulo e por ser de origem não renovável. Entre as estratégias para sua substituição ou redução, encontra-se o emprego de biopolímeros biodegradáveis. Dentre os biopolímeros disponíveis, destacam-se os poli-hidroxialcanoatos (PHA), em função das características de biodegradabilidade, biocompatibilidade, possibilidade de produção a partir de recursos renováveis e das propriedades físicas similares aos polímeros petroquímicos.

Desta forma, podem ser empregados na área médica para confecção de materiais osteossintéticos e de suturas cirúrgicas. Também são incluídos em produtos farmacêuticos para liberação lenta de drogas e hormônios. Assim como, adicionado na composição de fraldas, sacolas, produtos de higiene e embalagens.

Os PHAs são sintetizados por micro-organismos procariontes como reserva de carbono e energia. São acumulados na forma de grânulos localizados no interior das células, podendo representar até 80% da massa seca total da célula. Apesar de a produção ser renovável, o processo é ainda quatro vezes mais caro do que o convencional – petroquímico. A fim de reduzir os custos são implementadas diferentes estratégias, tais como: busca por novas espécies produtoras, desenvolvimento de linhagens recombinantes, emprego de meio de cultivo de baixo custo, melhorias no processo fermentativo e de recuperação do produto. Nesse contexto, apesar da existência de bactérias reconhecidamente produtoras de PHA, como *Cupriavidus necator*, *Alcaligenes latus* e *Azobacter vinelandii*, o uso de outros organismos capazes de utilizar substratos de baixo custo e/ou residuais assumem grande importância.

O ambiente marinho também tem sido utilizado para a prospecção de micro-organismos produtores de PHA. Por exemplo, verificou-se grande potencial do organismo *Halomonas hydrothermalis*, capaz de acumular 75,8% de P(3HB) de sua massa utilizando o glicerol residual como substrato (SHRIVASTAV et al., 2010). Além do alto conteúdo de biopolímero alcançado pelas bactérias marinhas, há oportunidades para a redução dos custos de produção do PHA. Uma vez que estas toleram alta salinidade, assim, cultivos não estéreis em água salgada, reduziram organismos não halófilos competidores. Neste contexto, trabalhos com *Halomonas* foram conduzidos com êxito para a produção de PHA. Outro ponto interessante é a utilização da água do mar no meio de cultura, suplementado com resíduos da agroindústria e de alimentos, viabilizaram a produção por *Bacillus megaterium* SRKP-3. Por exemplo, *H. hydrothermalis* foi descrita como capaz de produzir 53,6% (g/g) de P(3HB), quando cultivado em meio contendo água do mar acrescido de glicerol (5%) residual da produção de biodiesel (TAKAHASHI, 2012). Portanto, evidencia-se que o ambiente marinho é um ótimo reservatório também para a busca de bactérias produtoras de biopolímeros.

## 10.6 Conclusões

Assim, neste capítulo foram apresentados alguns dos potenciais biotecnológicos descritos em micro-organismos marinhos, incluindo metodologias tradicionais e mais modernas para sua prospecção. É evidente que os ambientes marinhos oferecem uma variedade de possibilidades em relação à biotecnologia microbiana e que muito ainda

permanece a ser descrito e explorado, especialmente em locais de mais difícil acesso, como os ecossistemas oceânicos e profundos.

## Referências

- ALVAREZ, P. J. J.; ILLMAN, W. Bioremediation technologies. In: ALVAREZ, P. J. J.; ILLMAN, W. **Bioremediation and Natural Attenuation: process fundamentals and mathematical models**. New Jersey: John Wiley, 2006. p. 351-455.
- BCC RESEARCH. Global markets for enzymes in industrial applications, report BIO030H. **BCC Research Biotechnology**. Massachusetts, 2014.
- BONUGLI-SANTOS, R. C. et al. Marine-derived fungi: diversity of enzymes and biotechnological applications. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 6, p. 269, 2015.
- CZAJKOWSKI, R.; JAFRA, S. Quenching of acyl-homoserine lactone-dependent quorum sensing by enzymatic disruption of signal molecules. **Acta Biochimica Polonica**, Warszawa, v. 56, no. 1, p. 1-16, 2009.
- DALMASO, G. Z.; FERREIRA, D.; VERMELHO, A. B. Marine extremophiles: a source of hydrolases for biotechnological applications. **Marine Drugs**, Basel, v. 13, no. 4, p. 1925-1965, 2015.
- DASH, H. R. et al. Marine bacteria: potential candidates for enhanced bioremediation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 97, no. 2, p. 561-571, 2013.
- FU, C. et al. Molecular cloning and characterization of a new cold-active esterase from a deep-sea metagenomic library. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 90, no. 3, p. 961-970, 2011.
- FUENTES, S. et al. Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 98, no. 11, p. 4781-4794, 2014.
- FUJITA, M. J. et al. Cloning and heterologous expression of the vibrioferrin biosynthetic gene cluster from a marine metagenomic library. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 75, no. 12, p. 2283-2287, 2011.

GOYAL, K.; SELVAKUMAR, P.; HAYASHI, K. Characterization of a thermostable beta-glucosidase (Bg1B) from *Thermotoga maritima* showing transglycosylation activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 15, no. 1-3, p. 45-53, 2001.

HARAYAMA, S. et al. Petroleum biodegradation in marine environments. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, Basel, v. 1, no. 1, p. 63-70, 1999.

HESS, M. et al. Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen. **Science**, Washington, D.C., v. 331, no. 6016, p. 463-467, 2011.

HOLINSWORTH, B.; MARTIN, J. D. Siderophore production by marine-derived fungi. **Biometals**, Dordrecht, v. 22, no. 4, p. 625-632, 2009.

HOLMSTRÖM, C. et al. Bacterial interactions with marine fouling organisms. In: EVANS, L.V. (Ed.). **Biofilms: recent advances in their study and control**. Amsterdam: Harwood Academic, 2005. p. 104-119.

HOTTA, Y. et al. Extremely stable and versatile carboxylesterase from a hyperthermophilic archaeon. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D.C., v. 68, no. 8, p. 3925-3931, 2002.

JOINT, I.; MÜHLING, M.; QUERELLOU, J. Culturing marine bacteria - an essential prerequisite for biodiscovery. **Microbial Biotechnology**, New Jersey, v. 3, no. 5, p. 564-575, 2010.

LEE, H. S. et al. Approaches for novel enzyme discovery from marine environments. **Current Opinion in Biotechnology**, Oxford, v. 21, no. 3, p. 353-357, 2010.

LI, J.; CHI, Z. Siderophores from marine microorganisms and their applications. **Journal of Ocean University of China (Oceanic and Coastal Sea Research)**, Beijing, v. 3, no. 1, p. 40-47, 2004.

LI, X.; LI, D.; PARK, K.-H. An extremely thermostable amylopullulanase from *Staphylothermus marinus* displays both pullulan- and cyclodextrin-degrading activities. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Washington, D.C., v. 97, no. 12, p. 5359-5369, 2013.



LIMA, A. O. S. et al. Draft genome sequence of *Bacillus stratosphericus* LAMA 585, isolated from the atlantic deep sea. **Genome Announcements**, Washington, D.C., v. 1, no. 3, p. e00204-13, 2013.

MARTÍN-RODRÍGUEZ, A. J. et al. Inhibition of bacterial quorum sensing by extracts from aquatic fungi: first report from marine endophytes. **Marine Drugs**, Basel, v. 12, no. 11, p. 5503-5526, 2014.

MILSHTEYN, A.; SCHNEIDER, J. S.; BRADY, S. F. Mining the metabolome: identifying novel natural products from microbial communities. **Chemistry & Biology**, Cambridge, v. 21, no. 9, p. 1211-123, 2014.

PARK, H.-J. et al. Functional expression and refolding of new alkaline esterase, EM2L8 from deep-sea sediment metagenome. **Protein Expression and Purification**, Orlando, v. 52, no. 2, p. 340-347, 2007.

PETTIT, R. K. Culturability and secondary metabolite diversity of extreme microbes: expanding contribution of deep sea and deep-sea vent microbes to natural product discovery. **Marine Biotechnology**, Berlin, v. 13, no. 1, p. 1-11, 2011.

PRIETO-DAVÓ, A. et al. Targeted search for actinomycetes from nearshore and deep-sea marine sediments. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 84, no. 3, p. 510-518, 2013.

ROMERO, M. et al. Quorum quenching in cultivable bacteria from dense marine coastal microbial communities. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 75, no. 2, p. 205-217, 2011.

RYU, H. S. et al. New cold-adapted lipase from *Photobacterium lipolyticum* sp. nov. that is closely related to filamentous fungal lipases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 70, no. 3, p. 321-326, 2006.

SABREE, Z. L. et al. Metagenomics. In: SCHAECHTER, M. **Encyclopedia of microbiology**. 3rd ed. Oxford: Academic Press, 2009. p. 622-632.

SALINI, R. et al. Inhibition of quorum sensing mediated biofilm development and virulence in uropathogens by *Hyptis suaveolens*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 107, no. 4, p. 1095-1106, 2015.

SHRIVASTAV, A. et al. Isolation of promising bacterial strains from soil and marine environment for polyhydroxyalkanoates (PHAs) production utilizing *Jatropha* biodiesel byproduct. **International Journal of Biological Macromolecules**, New York, v. 47, no. 2, p. 283-287, 2010.

SPONGA, F. et al. Biodiversity and potentials of marine-derived microorganisms. **Journal of Biotechnology**, New York, v. 70, n. 1-3, p. 65-69, 1999.

SRIMATHI, S. et al. Intrinsic halotolerance of the psychrophilic alpha-amylase from *Pseudoalteromonas haloplanktis*. **Extremophiles**, Berlin, v. 11, no. 3, p. 505-515, 2007.

TAKAHASHI, R. Y. U. **Bioprospecção de bactérias marinhas para a produção de polihidroxicanoatos**. 2012. 77 f. Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2012.

UZYOL, K. S. et al. Thermostable  $\alpha$ -amylase from moderately halophilic *Halomonas* sp. AAD21. **Turkish Journal of Biology**, Ankara, v. 36, p. 327-338, 2012.

VRASPIR, J. M.; BUTLER, A. Chemistry of marine ligands and siderophores. **Annual Review of Marine Science**, Palo Alto, v. 1, no. 1, p. 43-63, 2009.

WOODHOUSE, J. N. et al. Deep sequencing of non-ribosomal peptide synthetases and polyketide synthases from the microbiomes of Australian marine sponges. **The ISME Journal**, London, v. 7, no. 9, p. 1842-1851, 2013.

YAKIMOV, M.; TIMMIS, K. N.; GOLYSHIN, P. N. Obligate oil-degrading marine bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, Oxford, v. 18, no. 3, p. 257-266, 2007.

ZHANG, Y. et al. Genome analysis of *Flaviramulus ichthyoenteri* Th78T in the family Flavobacteriaceae: insights into its quorum quenching property and potential roles in fish intestine. **BMC Genomics**, London, v. 16, no. 1, p. 38-48, 2015.

ZHANG, Y.; ZHAO, J.; ZENG, R. Expression and characterization of a novel mesophilic protease from metagenomic library derived from Antarctic coastal sediment. **Extremophiles**, Berlin, v. 15, no. 1, p. 23-29, 2011.

ZHU, Y. et al. Characterization of a new and thermostable esterase from a metagenomic library. **Microbiological Research**, Jena, v. 168, no. 9, p. 589-597, 2013.



# Vírus benéficos em biotecnologia: aplicações dos vírus em biotecnologia

---

João Lúcio Azevedo

## 11.1 Introdução

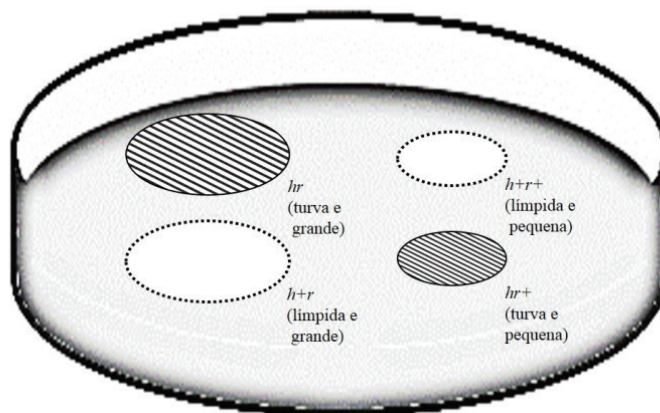
A palavra vírus tem sua origem em veneno ou mesmo toxina. Foi primeiramente usada por Beijerinck no final do século XIX, para designar um agente responsável por certa doença vegetal em plantas de tabaco cuja causa não estava relacionada com qualquer micro-organismo detectado na época. Nota-se logo de início que os vírus eram, e, até hoje, são vistos como danosos prejudiciais causando problemas para a saúde humana, animal e vegetal. Os vírus podem ser definidos como elementos genéticos contendo ácidos nucleicos (ácido desoxirribonucleico - DNA) ou ácido ribonucleico (RNA) e sempre sua multiplicação ocorre no interior de células, embora possam possuir um estado extracelular. Multiplicando-se dentro de células, em grande número dos casos, eles podem danificar e destruir estas células que os hospedam, sejam elas de animais, vegetais ou de micro-organismos. No entanto, nem sempre é isto que ocorre; algumas células são beneficiadas pela presença dos vírus. Em outros casos embora destruindo células de plantas, animais ou micro-organismos, eles favorecem do ponto de vista biotecnológico o controle de pragas e moléstias vegetais, isto sem falar no uso de vacinas animais e humanas contra graves doenças. São estes alguns pontos a serem apresentados no presente capítulo, resgatando a imagem positiva dos vírus, tão condenados pela maioria dos habitantes de nosso planeta. Eles são também importantes para estudos de genética microbiana e na tecnologia do DNA recombinante ou engenharia genética, como pode ser visto no presente capítulo e por publicações em artigos científicos, revisões e livros texto que se ocupam dos vírus, alguns dos quais serão citados no decorrer deste capítulo.

## 11.2 Vírus: histórico

Os micro-organismos, como as bactérias e outros seres microscópicos só foram melhor conhecidos, entendidos e estudados depois da invenção de um microscópio, idealizado por Leeuwenhoek na segunda metade do século XVII que foi usado para observar e descrever bactérias e outros micro-organismos até então desconhecidos. Na realidade o microscópio ótico ou composto havia sido idealizado pela primeira vez no final do século XVI pelos holandeses Hans Janssen e seu filho Zacharias. Entretanto, eles não o utilizaram para examinar seres microscópicos. Como os vírus são bem menores que as bactérias e outros seres observados por Leeuwenhoek, eles permaneceram desconhecidos na época. No entanto, já havia relatos na literatura de que certos fenômenos descritos na literatura poderiam ser devido ao que bem mais tarde foram explicados pela presença de vírus. É o caso apresentado por Evelyn no seu livro *Sylva*, (1664 apud ALVES, 1998) verificou que material triturado de insetos, atacados e mortos por algum fator desconhecido, se fosse espalhado em florestas, causava a morte de insetos sadios, este é na realidade um processo de controle biológico de pragas que atualmente pode ser explicado como devido a vírus que infectavam insetos mortos e que transmitidos aos sadios, causavam também sua morte.

Na última década do século XIX, Dmitri Yvanovsky apresentou, pela primeira vez, um trabalho na Academia de Ciências de São Petersburgo (Rússia) associando uma doença do tabaco (*Nicotiana tabacum*) que era problema na Crimeia, cujo agente causal era filtrável, isto é, não era retido por filtros que impediam a passagem de bactérias. Este material filtrado continha algo que inoculado em tabaco sadio, transmitir a doença. Foi concluído, portanto, que o agente filtrável devia ser menor do que bactérias tendo também na época sendo sugerida a possível presença de uma toxina. Casos semelhantes foram também descritos por outros pesquisadores. Relatos de doenças humanas e de animais domésticos eram também descritos como transmitidas sem um agente causal detectável. Estes agentes foram denominados de infrabactérias por Pasteur. Ainda no final do século XIX, Beijerinck descreveu a mixomatose, uma doença em coelhos causados por estes agentes filtráveis e, bem no início do século XX o norte-americano Walter Reed isolou o que poderia ser o agente causal, ou seja, um vírus da febre amarela. Os bacteriófagos, ou abreviadamente denominados de fagos, que são vírus que atacam bactérias destruindo (lisando) suas células hospedeiras, foram descobertos por Twort em 1915 na Inglaterra e, independentemente, por D`Herelle em 1917 conforme descrito por Azevedo (2008). Twort e também D`Herelle verificaram a presença destes elementos filtráveis, por inoculação de um filtrado após eliminação de micro-organismos não filtráveis em uma cultura turva, repleta

de bactérias que se tornava límpida por morte de lise destas bactérias. Também por semeadura de bactérias em meio sólido, e posterior inoculação de filtrados diluídos, contendo possíveis vírus, detectaram as denominadas ‘placas de lise’ cuja aparência está apresentada na Figura 1. Entretanto, os vírus só foram visualizados após a descoberta e uso de microscopia eletrônica de transmissão que começou a ser introduzida em pesquisa com vírus a partir dos anos 1930 a 1940 e cujos equipamentos vêm sendo constantemente aperfeiçoados. Também na mesma década iniciaram-se os experimentos mostrando serem os vírus constituídos por proteínas e ácidos nucleicos e, pela primeira vez, Stanley, nos EUA, cristalizou um vírus, o denominado TMV (*Tobacco mosaic virus*) do mosaico do tabaco que, como já mencionado havia sido estudado por Beijerinck e por Yvanovsky.



**Figura 1** - ‘Placas de lise’ de vírus em placas de Petri com bactérias. Gene h<sup>+</sup> placa límpida: h<sup>-</sup> placa turva. Gene r<sup>+</sup> placa pequena: r<sup>-</sup> placa grande.

Fonte: Ilustração de Sarina Tsui - Esalq/USP.

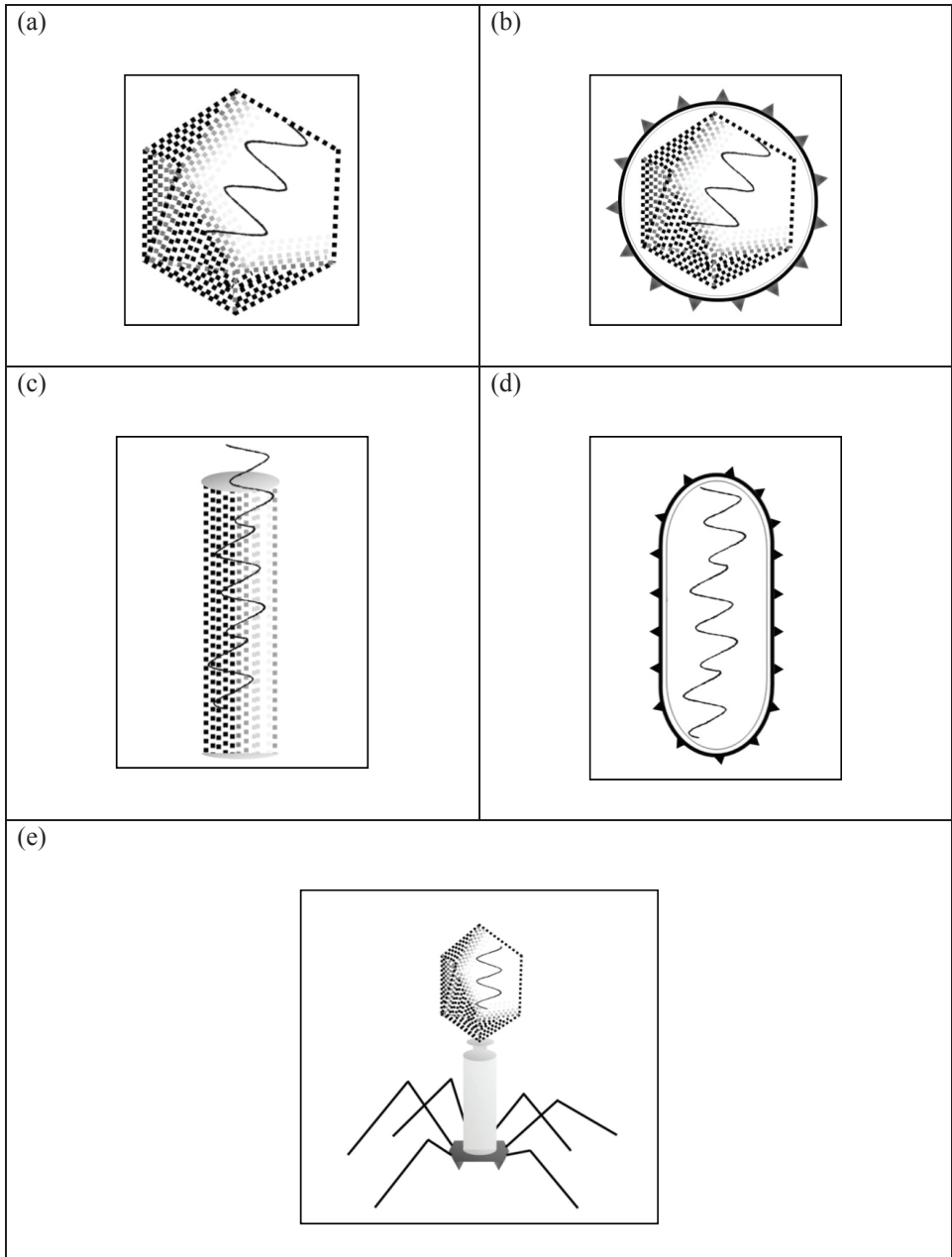
### 11.3 Multiplicação, classificação e formas dos vírus

Os processos de multiplicação dos vírus envolvem modificações do metabolismo das células que os albergam, ou seja, suas células hospedeiras. No estado extracelular eles são metabolicamente inertes, mas no estado intracelular, podem se duplicar muitas vezes utilizando os mecanismos das células hospedeiras para produzir mais partículas de vírus. Eles, em geral, possuem ou DNA ou RNA como material genético,

mas alguns podem usar DNA e RNA em diferentes fases da duplicação, como os denominados retrovírus. As partículas virais são, normalmente, muito pequenas, só observáveis através de microscopia eletrônica de transmissão, o que justifica a sua descoberta, apenas mais recentemente quando comparado com micro-organismos maiores como bactérias e fungos microscópicos, observáveis ao microscópio ótico. Também os vírus como não possuem maquinário para multiplicação autônoma, são considerados parasitas intracelulares obrigatórios, o que não permite sua definição como seres vivos. Entretanto, a biologia deve ser entendida, como um todo, possuir características diversas das ciências exatas e, em termos evolutivos. Em biologia, sempre existe um gradiente dentro dos diferentes sistemas e etapas biológicas. É isto que ocorre em biologia quando se estuda a separação do inanimado em relação ao animado ou à vida; neste particular os vírus, independentemente de sua origem, que ainda é discutida, podem ser considerados o limite entre formas viventes e não viventes, sendo dependentes de células vivas para reproduzirem-se. Eles são encontrados tanto em eucariotos como em procariotos e arqueias, constituindo um grupo a parte não formando um reino, filos ou classes.

São considerados, por muitos autores, como pertencentes à ordem Virales, família Viridae, gênero *Virus* e a espécie é designada de acordo com suas células hospedeiras; por exemplo, se um vírus foi pela primeira vez descrito em certa planta ele pode ser designado pela espécie da planta que o hospeda e pelo sintoma que causa na planta; o mesmo ocorre se ele foi encontrado em uma célula animal incluindo as células humanas. Os vírus encontrados em fungos são denominados de micovírus e os de bactérias, como já mencionado são designados por bacteriófagos ou abreviadamente fagos. Também são classificados pelo seu ácido nucleico podendo ser vírus de DNA de fita simples ou dupla (ssDNA e dsDNA) ou de RNA (ssRNA e dsRNA) ou retrotransposons (ssRNA-RT e dsDNA-RT). Os vírus variam em tamanho, forma e composição química. O tamanho situa-se, desde 20 a 60 nm, podendo chegar a 300 nm ou ainda maiores; recentemente foram descritos vírus enormes, os denominados gigantes como será mencionado mais adiante neste mesmo capítulo.

Nos vírus, o ácido nucleico fica rodeado por proteína e esta pode ser de apenas um tipo em envoltório denominado de capsídio que pode conter subunidades, denominadas de capsômeros. Em muitos vírus, certas proteínas, as chaperonas, auxiliam a montagem das subunidades embora sem fazer parte dos vírus. O conjunto capsídio mais ácido nucleico forma o nucleocapsídio que pode ser também envolvido por uma membrana lipídica. Quanto à sua simetria, os vírus podem ser bastonetes (helicoides), por exemplo, o vírus do mosaico do tabaco (TMV) ou esféricos (icosaédricos) como o vírus das verrugas humanas ou ainda no formato típico encontrado nos bacteriófagos. Os principais formatos de vírus estão representados na Figura 2.



**Figura 2** - Diferentes formas de vírus: a) icosaédrico sem envelope; b) icosaédrico envelopado; c) helicoidal não envelopado; d) helicoidal envelopado; e) bacteriófago (fago) típico.

Fonte: Ilustração de Sarina Tsui - Esalq/USP.



Para sua reprodução, os vírus usam o maquinário das células hospedeiras para duplicar o DNA ou RNA e montar as proteínas; detalhes desta reprodução estão descritos em livros de virologia ou textos gerais de microbiologia e genética como Madigan, Martinko e Parker (2000), Azevedo (2008) e Harper (2011).

## **11.4 Pontos positivos sobre os vírus**

A finalidade do presente capítulo não é descrever em detalhes as mais distintas características dos vírus que, como já mencionado, podem ser encontradas em textos especializados. Vai-se procurar aqui, salientar os pontos positivos dos vírus, principalmente em relação aos aspectos ecológicos, proteção de plantas e animais e, para a saúde humana e animal, bem como seu papel na pesquisa, seu valor biotecnológico e sua importância benéfica para a vida no planeta Terra. Serão destacados alguns dos muitos pontos positivos dos vírus, especialmente na agroindústria, o que distingue esta breve revisão da maioria dos textos sobre vírus que salientam suas características prejudiciais, causadores principalmente de doenças em plantas, animais domésticos e seres humanos. Pode-se mesmo dizer que há estimativas da presença de milhares ou mesmo milhões de tipos de vírus distintos, mas, mais de 90% deles são benéficos e apenas uma pequena porcentagem causa malefícios. Dentre os diferentes efeitos benéficos de vírus, serão mencionados processos em que os vírus controlam insetos-pragas da agricultura, doenças de plantas, são usados na produção de vacinas, na fagoterapia e enzibióticos, auxiliam a degradação de bactérias marinhas, poluentes e mecanismos de controle de poluição e outros aspectos ecológicos e até sua função como vetores e auxiliares das descobertas principais da genética moderna e tecnologia do DNA recombinante, principalmente seu papel no desenvolvimento de pesquisas genéticas e de biologia molecular entre outras antes e após as descobertas de Watson e Crick em 1953, sobre a natureza e função do material genético.

### **11.4.1 O papel dos vírus na proteção de plantas**

Os vírus, embora muitos deles sejam prejudiciais aos vegetais causando doenças, podem também atuar protegendo as plantas tanto selvagens como cultivadas, contra doenças causadas por bactérias e fungos ou reduzindo os efeitos danosos causados nas plantas por insetos, pragas da agricultura. Os vírus podem atuar também protegendo as plantas contra diferentes formas de estresse tais como o estresse hídrico (seca) ou

alta umidade, temperaturas extremas entre outros fatores ambientais. No presente capítulo vão ser descritos os principais processos pelos quais os vírus naturalmente ou por ação induzida, podem atuar favorecendo especialmente culturas de importância agrícola.

#### **11.4.2 Fatores de estresse**

As plantas estão constantemente sendo submetidas a fatores de estresse especialmente climáticos e adversidades presentes no solo tais como pH, inapropriado, compostos químicos indesejáveis e outros, além de ataques de patógenos e pragas. É natural, portanto, que os vegetais possuam mecanismos de defesa contra estes fatores de estresse. Em muitos casos existem micro-organismos tais como bactérias e fungos endofíticos que protegem as plantas contra estes fatores. Os micro-organismos endofíticos são aqueles que vivem pelo menos uma parte de seu ciclo no interior de plantas, sem causar danos e inclusive podendo favorecer seus hospedeiros. Tem sido recentemente constatado que em certas plantas que vivem em solos de climas extremamente quentes e secos, só há crescimento satisfatório quando estas plantas são colonizadas, por exemplo, por alguns tipos de fungos endofíticos. O que parecia ser uma simbiose entre plantas e fungos benéficos foi reavaliada recentemente. Constatou-se que existem vírus, os denominados micovírus, no interior destes fungos. Quando estes micovírus são eliminados do interior dos fungos que os albergam, cessa esta proteção contra estresse climático, mostrando que no caso, os micovírus têm papel fundamental nesta proteção contra solos secos e temperaturas elevadas. Isto foi constatado em plantas no Parque Nacional de Yellowstone nos Estados Unidos. Da mesma maneira foram identificados vírus em beterraba que permitem a estes vegetais sobreviverem a climas secos e frios. Mais um fator de estresse é a alta salinidade dos solos a que estão submetidos os vegetais neste ambiente. No caso a tolerância de plantas a esta condição tem também sido constatada ser devida a fungos e possivelmente a micovírus que ocupam o interior destes fungos. Estes e outros fatores de estresse relacionados à proteção de plantas influenciada por vírus benéficos podem ser encontrados em Rodrigues et al. (2008) e principalmente os descritos por Roossinck (2012), Bao e Roossinck (2011).

#### **11.4.3 Proteção contra insetos-pragas**

Já foi mencionado na introdução deste capítulo e bem descrito por Alves (1998), em livro sobre controle microbiano de insetos, que uma das primeiras

observações de John Evelyn, no século XVII, de que morte de insetos pragas em florestas na Inglaterra era motivada por causas não bem elucidadas. Atualmente presume-se que os vírus possam ter sido responsáveis pela morte destes insetos e hoje em dia, vários vírus vêm sendo empregados no controle biológico de insetos pragas da agricultura. Em diversos casos este controle é natural, já existindo vírus que no interior de plantas, sem qualquer interferência humana, são capazes de proteger seus hospedeiros. Por exemplo, foram encontrados vírus tais como o ALPV (*Aphid paralysis virus*) que ocorre naturalmente em certas plantas e protegem seus hospedeiros contra pragas agrícolas, especialmente afídeos. Eles são capazes de infectar e matar estas pragas de vegetais. Alguns destes vírus são transmitidos por sementes ou podem até ser incorporados a fungos funcionando como micovírus (BAO; ROOSSINCK, 2011; ROOSSINCK, 2012).

Como técnica no controle de pragas, o biocontrole tem adquirido importância devido ao uso abusivo de produtos químicos causando aumento de poluição, efeitos tóxicos e emergência de resistência genética dos insetos a estes produtos químicos, tornando muitas vezes o controle dispendioso, poluidor e ineficaz. Por outro lado, alguns vírus que atacam insetos e são inócuos aos humanos e à vida selvagem funcionam de maneira altamente conveniente e específica como bioinseticidas. Este é o caso dos baculovírus, que se tornam opções de valor (ALVES, 1998). Com aprimoramento das formulações e sua eficiência, atualmente existem excelentes alternativas de controle biológico de certos insetos-pragas da agricultura, por exemplo, da lagarta da soja, a *Anticarsia gemmatalis* e lagarta do cartucho do milho (*Spodoptera frugiperda*) (CRUZ, 1999). A eficiência destes biocontroladores virais tem sido também ampliada pelo uso de transgênicos graças às tecnologias de biologia molecular (SZEWCZYK et al., 2006).

O baculovírus tem um nucleocapsídeo em forma de bastão e é recoberto por uma membrana. Possui oclusão cristalina (poliedro ou grânulo) envolvendo o núcleo capsídeo. Há dois tipos de baculovírus, o extracelular e o ocluso. O inseto atacado pelo vírus continua se alimentando até morrer. Há uma procura pelo melhoramento genético do vírus e pela inclusão de genes para aumentar sua eficiência. Pode-se melhorar a virulência, a resistência dos vírus à radiação solar sua granulometria, molhabilidade etc. A técnica inicialmente desenvolvida pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), em Londrina no Paraná, foi e vem sendo usada em todo país, principalmente no controle da lagarta da soja, com alta eficiência. Em Cascavel, Paraná, há produção em larga escala do vírus *Gemmatalis multiple nucleopolihedrose vírus* (AGHNPV) que produz material para inoculação de centenas de milhares de lagartas por dia.

Além dos baculovírus, outros tipos de vírus podem ser usados no controle de insetos pragas. Alguns causam danos não só contra insetos, mas também em outros

artrópodos e até em coelhos, usados no controle destes animais quando se tornam problemas e multiplicam-se rapidamente e alimentam-se de culturas agrícolas, como será visto mais adiante. Outro exemplo de vírus de valor no biocontrole, além dos baculovírus é o *Oryctes rhinoceros virus*, contra insetos do gênero *Rhinoceros*. No entanto os inseticidas virais constituem apenas cerca de 2% do mercado em comparação com produtos químicos. Isto é devido a serem muito específicos o que, embora representem vantagem ecológica por não eliminar insetos úteis, por exemplo, abelhas e bicho da seda, tem a desvantagem de produzir efeitos mais demorados quando comparados com os produtos químicos, custos altos, além de serem muito sensíveis aos fatores ambientais, entre outros, a luz solar. Deve aqui ser mencionado também que vírus no interior de fungos (micovírus), de um lado podem ser usados no controle de fitopatógenos, pois diminuem sua virulência como será visto no próximo item. Entretanto, quando estão presentes em fungos entomopatogênicos, que são utilizados no controle de insetos pragas, eles podem prejudicar esse controle e nestes casos reduzem o controle biológico de pragas por fungos patógenos de insetos. Por exemplo, Dalzoto et al. (2006) verificaram que isolados do fungo *Beauveria bassiana* que é usado no controle biológico de insetos, foram estudados para a presença de micovírus sendo demonstrado que dois isolados possuíam micovírus de dsRNA com cerca de 35 nm de diâmetro. Por parassexualidade ele foi transmitido para linhagens sem vírus, demonstrando transmissão horizontal e vertical. O vírus pode ser eliminado com o composto cicloheximida. A virulência na comparação de linhagens isogênicas com e sem micovírus revelou que a presença de micovírus resultou em hipovirulência como ocorre em patógenos hipovirulentos de plantas (ver adiante). Entretanto, a eliminação de micovírus pode ter valor, ao contrário do que ocorre em plantas, na 'cura' de linhagens hipovirulentas tornando-as virulentas, o que seria uma vantagem no controle biológico de insetos pragas da agricultura ou insetos vetores de doenças animais e humanas. Em *Euschistus heros* (percevejo marrom, praga da soja), os fungos com vírus deram em média 28% de mortalidade, comparados com os sem vírus que causaram 60% de mortalidade, cinco dias após sua inoculação (DALZOTO et al., 2006).

Como já mencionado, além de artrópodes os vírus podem ser utilizados no controle de animais que se tornam pestes agrícolas, caso de alguns mamíferos. Um exemplo de controle biológico por vírus foi descrito na Austrália quando coelhos provenientes da Europa tornaram-se pragas, após serem introduzidos no continente em 1859. O *Mixoma virus* da família Poxviridae produz mixomatose em coelhos e, este tipo de biocontrole foi introduzido na Austrália em 1950 e causou morte de mais de 85% da população de coelhos. Em 1957 já 25% dos coelhos se tornaram resistentes ao vírus o que é um exemplo de coevolução. Também notou-se que estes vírus que controlam

coelhos podem ser transmitidos por certos insetos embora eles não persistam muito tempo nos mesmos.

Além de servirem no controle biológico de vários insetos e outros tipos de pragas, os vírus especialmente o baculovírus, podem também ser usados como vetores para terapia gênica e produção de vacinas como será citado no item sobre este assunto mais adiante neste mesmo capítulo.

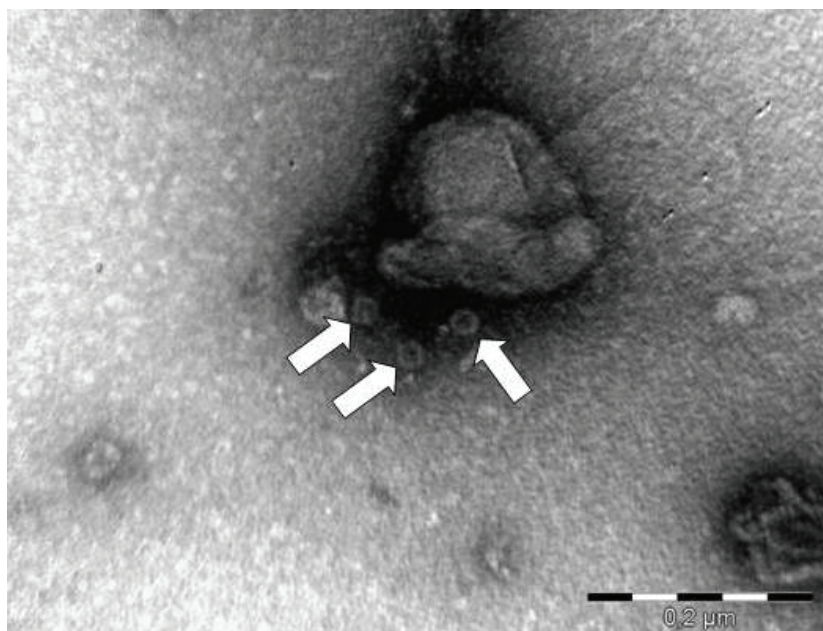
#### **11.4.4 Proteção contra fitopatógenos**

Os micro-organismos, entre eles as bactérias e, principalmente os fungos fitopatogênicos, são altamente danosos para culturas agrícolas. Como patógenos de plantas eles causam prejuízos de alta monta com redução e até perda total de grãos, frutas e hortaliças entre muitas outras culturas atacadas. Um ponto interessante que tem sido verificado é que muitos fungos causadores de moléstias em plantas possuem linhagens que têm no seu interior micovírus, ou seja, vírus que se multiplicam dentro dos fungos. Embora a maioria destes fungos seja críptica, ou seja, não ocasionam qualquer diferença fenotípica em relação a outras linhagens da mesma espécie, que não possuem vírus no seu interior, uma notável diferença que pode existir na sua funcionabilidade é de que fungos com micovírus, em grande parte dos casos, tem sua virulência atenuada sendo hipovirulentas portanto. Assim, uma maneira idealizada para controlar fungos fitopatogênicos é a busca de linhagens hipovirulentas possuidoras de micovírus e que podem ocupar o mesmo nicho nas plantas competindo com as virulentas, reduzindo os danos causados pelas formas virulentas, altamente patogênicas. Possivelmente do ponto de vista evolutivo é uma maneira de tanto fungos como plantas viverem em conjunto graças a uma atenuação da mortalidade das plantas atacadas pelos fungos. Com esta atenuação os fungos podem persistir dentro dos seus hospedeiros sem eliminá-los, com vantagem para fungos e plantas, com o auxílio dos vírus.

Existem micovírus em muitas espécies de fungos fitopatogênicos. Em geral eles são transmitidos durante a divisão celular e também podem ser transmitidos por protoplastos ou por parassexualidade isto é, por anastomose de hifas de linhagens distintas em crescimento, mas, não apresentam transferência extracelular (DALZOTO et al., 2006) A maioria dos micovírus tem dupla fita de RNA (dsRNA) englobadas por partículas isométricas embora sejam também encontrados micovírus não capsulados com RNA de fita simples (ssRNA) também conferindo hipovirulência aos seus fungos hospedeiros. Uma revisão sobre vírus encontrados em fungos fitopatogênicos a de Ghabrial e Suzuk (2009), na qual são relatados vários casos de hipovirulência ocasionados por micovírus.

Recentemente, vírus de DNA de fita simples (ssDNA) foram encontrados em *Sclerotines sclerotiorum* conferindo hipovirulência em fungos (YU et al., 2010; JIANG et al., 2013). Como já pode ser deduzido, estes fungos portando micovírus são usados no controle biológico dos fitopatógenos, descritos na revisão de Pearson et al. (2009). Já foram relatadas mais de 80 espécies de micovírus pertencentes a dez famílias. Muitos outros exemplos de fungos portadores de micovírus e de seu uso no controle biológico são encontrados nas revistas especializadas. Como já mencionado, a maioria dos micovírus é críptica, isto é, eles não causam aparentes modificações nos fungos hospedeiros e assim só podem ser encontrados por análise de ácidos nucleicos e microscopia eletrônica de transmissão em fungos que os albergam.

No Brasil existem vários exemplos de fungos fitopatogênicos contendo micovírus. Por exemplo, o trabalho de Figueiredo et al. (2012) demonstrou existência de diversidade em *Colletotrichm gloeosporioides*, indicando a presença de formas mais e menos patogênicas (hipovirulentas) em cajueiro, potencialmente utilizáveis no controle biológico da antracnose. Uma linhagem do fungo *C. gloeosporioides* (linhagem URM 4903, Depto. Micologia da Universidade Federal de Pernambuco) após análise molecular indicou uma banda de dsRNA e análise por microscopia eletrônica de transmissão revelou a presença de partículas isométricas (30-35 nm em diâmetro) ou seja um micovírus, sendo este um dos raros casos descritos em *C. gloeosporioides*, um fungo causador da antracnose em muitas plantas cultivadas. Estudos preliminares indicaram que esta linhagem possivelmente é hipovirulenta e poderá ser usada no controle biológico da antracnose. Um recente exemplo de controle de antracnose 'in vivo' foi realizado por Bezerra (2015) em sua tese de doutorado, realizada na Universidade Federal do Amazonas, quando estudou fungos endofíticos e patogênicos do guaranazeiro. A autora verificou que, de dois isolados estudados e identificados morfolologicamente como *C. gloeosporioides*, um deles mostrou a presença de vírus icosaédricos (Figura 3) enquanto o segundo não apresentou micovírus. Ensaios efetuados *in vivo* no guaranazeiro, em condições de casa de vegetação, demonstraram que houve diferença significativa em relação ao ataque de folhas, com os dois fungos isolados separadamente e quando em conjunto houve redução dos efeitos no guaranazeiro do fungo patogênico. Provavelmente um controle biológico deve ter ocorrido e, se ensaiado em campo poderá ter sucesso contra uma das mais importantes doenças do guaranazeiro na Amazônia. No Quadro 1 são apresentados os dados obtidos pelo uso do isolado hipovirulento controlando parcialmente o patógeno. Este e outros casos revelam a importância dos vírus, no caso micovírus, no controle biológico de doenças de interesse na agricultura.



**Figura 3** - As setas indicam a presença de micovírus (genoma de fita dupla de RNA (dsRNA) em fungo filamentososo da espécie *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de guaranazeiro.

Fonte: Bezerra (2015).

Patógenos	Sintomas (cm)
<i>C. gloeosporioides</i> (com micovírus)	0,92 b
<i>C. gloeosporioides</i> (sem micovírus)	2,43 a
<i>C. gloeosporioides</i> (com e sem micovírus)	0,70 b
Controle	0,00 c

**Quadro 1** - Sintomas da inoculação 'in vivo' de *Colletotrichum gloeosporioides* sem e com micovírus nas folhas jovens de *Paullinia. cupana*. Casa de vegetação da Universidade Federal do Amazonas – UFAM. Manaus – AM.

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância, para cada patógeno.

Fonte: Bezerra (2015).

## 11.5 Papel dos vírus em ecologia

Quando se citam as bactérias, ao contrário do que se pensa, a maioria de suas espécies é benéfica em muitos aspectos com relação à existência de seres vivos e ao ambiente em geral. Embora possa parecer estranho com relação aos vírus, estima-se

que, do total de tipos de vírus que são encontrados no nosso planeta, a maioria deles tem um papel fundamental na preservação do ambiente. Já foi discutido como os vírus podem controlar doenças e pragas, especialmente as que afetam e prejudicam as práticas agrícolas. Embora, nestes exemplos, o principal beneficiário seja a espécie humana, pois os vírus eliminam pragas tais como os insetos ou reduzem os efeitos prejudiciais de outros micro-organismos, principalmente os fitopatógenos, os vírus têm papel importante na ecologia. Os vírus multiplicam-se em células vivas e, em geral, eliminam seus hospedeiros durante este processo. Sempre haverá espécies prejudicadas por vírus, mas em muitos casos o processo de eliminação de formas viventes é essencial para continuidade da vida. Um dos casos mais evidentes desta função dos vírus vem a ser sua atuação controlando bactérias dos mais distintos ambientes. Examinando oceanos constata-se que existem muito mais vírus do que bactérias no ambiente submarino. O que se verificou é que os vírus (bacteriófagos) atacam as bactérias destruindo-as fazendo com que elas não contaminem e ocupem todo o oceano e, pelo contrário, tornando o material bacteriano lisado, uma fonte de alimento para outras formas de vida nos mares como foi relatado por Engelen, da Universidade de Oldenburgo, na Alemanha, citado na breve revisão de DiGregorio em 2013. Pode-se mesmo dizer que os bacteriófagos que destroem bactérias marítimas impedem com que elas se acumulem nos mares poluindo os oceanos. Principalmente a lise das bactérias pelos bacteriófagos é o fator que permite a alimentação e sobrevivência de muitas outras formas de vida marítima em um equilíbrio que seria afetado sem a presença de vírus. Também tem sido constatado, que muitos vírus marinhos que apresentam como material genético hélice dupla de DNA possuem genes codificadores de enzimas do sistema usado por bactérias que oxidam enxofre, mostrando que eles são agentes do ciclo do enxofre aumentando a oxidação bacteriana deste elemento. Também deve haver transferência horizontal de genes de vírus para bactérias e vice-versa. Os vírus estão então envolvidos em vários ciclos como os do carbono e do enxofre. Do carbono, 50% deste elemento que são fixados no ambiente marinho provêm dos vírus (DiGREGORIO, 2013; ROHWER; BAROTT, 2013).

No nosso planeta estima-se que existem  $10^{32}$  vírus e se considerarmos o tamanho de cada um deles, em média como sendo de 100 nanômetros, se colocados lado a lado elas iriam atingir um comprimento capaz de passar por cerca de 60 galáxias ou 100 milhões de anos luz! É uma estimativa assombrosa, mas que está a indicar a importância do papel dos vírus ainda pouco estudado e, portanto, pouco conhecido (WOMMACK, 2010). Tudo indica então que uma nova era da virologia está por surgir. Só para dar mais alguns dados, em 200 litros de água do mar há milhares de tipos distintos de vírus e, em 1 kg de sedimento marinho estima-se a existência de milhões de tipos assim como é estimado que em um ser humano ocorram cerca de 3 trilhões de vírus, muitos ocupando até nosso genoma e convivendo harmoniosamente no interior de nosso material genético. Pesquisadores que se constituem verdadeiros ‘caçadores de



vírus' trabalhando em várias universidades nos EUA e pesquisando os mais diversos ambientes, estão acrescentando informações que cada vez mais atestam a importância dos vírus na existência de outros seres na face da Terra; novos conhecimentos vão sendo incluídos na virologia. Um dos muitos exemplos recentes é o papel dos vírus em controlar bactérias que atacam a superfície de metazoários. Para prevenir este ataque bacteriano há todo um sistema de proteção constituído pelo muco que é um tipo de defesa antibacteriana. Há uma simbiose entre bacteriófagos e animais (metazoários como anêmonas, peixes e até seres humanos). Estes bacteriófagos que se aderem à superfície do muco, lisam bactérias protegendo assim os metazoários, Estes dados principalmente os trabalhos de Barr (San Diego State University, EUA) podem ser encontrados na revisão de Skawarecki em 2013. De fato, uma das defesas de animais contra bactérias é a proteção que reveste células; nos seres humanos e outros animais; este muco ocorre na boca, nariz, olhos, trato digestivo. No muco existem proteínas rodeadas por açúcares, as mucinas, e na proximidade das células este muco não contém bactérias, mas, a superfície do muco é atacada por bactérias. Aí entram os vírus do tipo bacteriófagos ou fagos, que eliminam as bactérias e protegem os animais, inclusive os seres humanos contra a destruição da capa protetora do muco. Trabalhos, utilizando, em laboratório culturas de tecidos pulmonares com dois tipos de tecidos, um possuindo e outro sem muco, mostraram que cerca de 50% das células morriam, mas, se fagos eram adicionados, a mortalidade nos tecidos com muco foi muito menor. Este foi o primeiro exemplo de simbiose fagos-animais. Este exemplo, além de outros, mostram a importância dos fagos a cada vez que novas pesquisas vão sendo realizadas, por exemplo, em seu papel no controle de úlceras estomacais (SKAWARECKI, 2013).

Em plantas, há vírus denominados de agudos, que são patógenos de seus hospedeiros, mas há outros, os persistentes, que são mantidos em sementes e passam de geração a geração e possivelmente devem ser benéficos às plantas (BAO; ROOSSINC, 2011). Também pelo emprego de técnicas mais modernas a diversidade e metagenômica principalmente relativas às plantas empregadas em amostras para vírus ambientais (ROOSSINCK, 2012), revelam mais uma vez que os vírus apresentam alta diversidade e embora possam causar efeitos prejudiciais, muitos deles causam benefícios não só para plantas, mas devem possuir efeitos benéficos nos mais diversos ambientes. Por exemplo, em águas poluídas por bactérias em ambientes tais como esgotos, os fagos exercem efeito na eliminação de bactérias patogênicas e o mesmo ocorre nos mais distintos ambientes.

Os recentes trabalhos de pesquisas com vírus têm revelado a presença de alguns deles com tamanho bem maior aos até então encontrados. São os vírus denominados de gigantes que, pelo seu grande tamanho, não são filtráveis equiparando-se a pequenas bactérias. Isto inclusive faz com que a definição de vírus como sendo elementos filtráveis aos filtros que não permitem passagem de bactérias, tenha sido reavaliada.

Vírus gigantes com DNA como material genético infectando amebas foram encontrados recentemente em sedimentos marinhos e lagos por Claverie e Abergel (2013), na França. Foram denominados de vírus Pandora. O primeiro, denominado de *Pandora salinus* foi encontrado no Chile e o segundo na Austrália (*Pandoradulcis*) com genomas de 2,47 Mb e 1,91 Mb, respectivamente (STONE, 2013). No Brasil, no rio Negro, próximo à cidade de Manaus, pesquisadores franceses e da Universidade Federal de Minas Gerais, também encontraram vírus gigantes. Segundo Jonatas Abraão, da Universidade Federal de Minas Gerais (DORNAS et al., 2014), ele é patogênico, infectando células de sangue humano. É um vírus de DNA com 1,2 Mb que possui no seu interior outro vírus que foi denominado de virófago. Os vírus gigantes podem ser importantes quando estudados do ponto de vista evolutivo. Eles podem servir para explicar a origem da vida na Terra ou ainda podem ser provenientes de outros tipos ainda não bem conhecidos de células vivas, abrindo desta maneira a possibilidade de um novo domínio, acrescentado a outros domínios já estabelecidos, ou seja, os eucariotos, bactérias e arqueias.

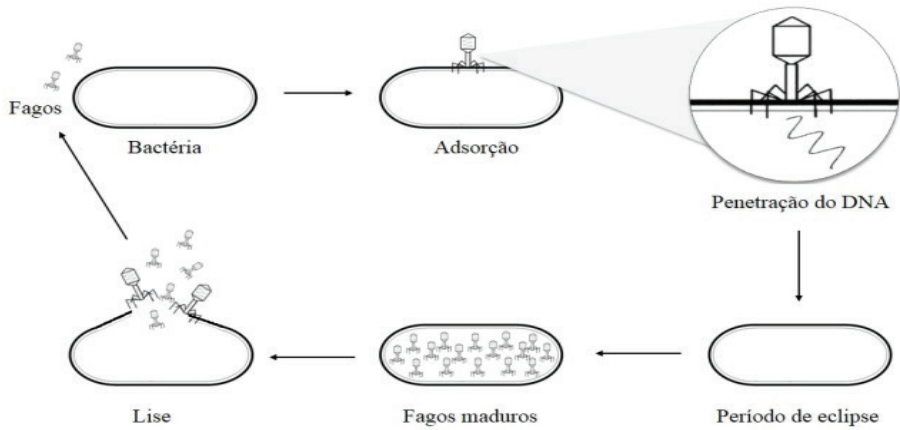
## 11.6 Vírus na pesquisa

Os vírus tiveram e continuam a ter um papel muito importante no desenvolvimento de pesquisas genéticas. Eles foram os responsáveis por boa parte do que se conhece em biologia molecular microbiana e também na engenharia genética ou tecnologia do DNA recombinante. Para maiores detalhes basta consultar revisões de periódico como *Nature Reviews Microbiology* ou textos gerais e especializados de genética, especialmente de genética de micro-organismos. Pode-se verificar, por exemplo, que Peters em 1959 em sua coletânea sobre os mais clássicos artigos de genética, destaca o de Fraenkel-Conrat e William sobre a reconstituição do vírus do mosaico do tabaco a partir de proteína e ácido nucleico e o de Benzer sobre a ultraestrutura do gene, pela primeira vez evidenciando que o gene é divisível em mutons (unidades de mutação) recon (unidades de recombinação) e cistron (unidade de função) graças ao uso de vírus, os bacteriófagos (PETERS, 1959). Se procurarmos as publicações de livros clássicos sobre genética como os de Wagner e Mitchell (1955), ou seja, cerca de duas décadas após a primeira visualização de um vírus ao microscópio eletrônico, verifica-se que naquela época, ainda eram poucas as contribuições dos vírus à genética. Neste livro foram dedicadas cerca de uma dezena de páginas às contribuições dos fagos e do TMV à genética. Em textos mais recentes o número de dados que a virologia tem produzido está em constante incremento demonstrando que seu papel foi, é e deverá ser cada vez maior dada a sua importância como material de experimentação que proporciona rápidos resultados graças a sua diversidade, multiplicação rápida, com grande número de partículas sendo produzidas em pouco tempo e podendo ser encontrados nas mais

diversas células e habitats. Eles podem ser considerados os 'buracos negros' da biologia. Atualmente, as técnicas de metagenômica permitem o estudo do conjunto de vírus, o denominado viroma, nos mais diversos sistemas. Por exemplo, devem existir cerca de 3 trilhões de vírus em nosso corpo e 43% do nosso DNA é constituído por transposons ou vírus. Cada bactéria pode produzir cerca de 25 vírus antes de se dividir. Então dá para estudar assuntos relacionados à evolução, pelo menos 25 vezes mais rápido do que estudos de evolução em bactérias e o que não dizer quando comparados a estudos de evolução em plantas e animais. Apenas mais um exemplo de contribuição de um único bacteriófago, vem a ser o denominado fago lambda ( $\lambda$ ). Este fago tem oferecido notáveis contribuições a problemas nos últimos 40 anos (ALLEN, 2010). Então, como sistema de pesquisa, os vírus foram e continuam sendo alicerces para adição de novos conhecimentos em genética, microbiologia e biologia como um todo, apesar de não serem propriamente considerados como seres vivos! Finalmente alguns dados de sua importância na pesquisa relacionada à genética de micro-organismos serão a seguir resumidos: o maior conhecimento dos sistemas de recombinação em bactérias; a contribuição para descobertas sobre o material genético (DNA e RNA); a mutação e recombinação em fagos; os vírus sendo usados como vetores.

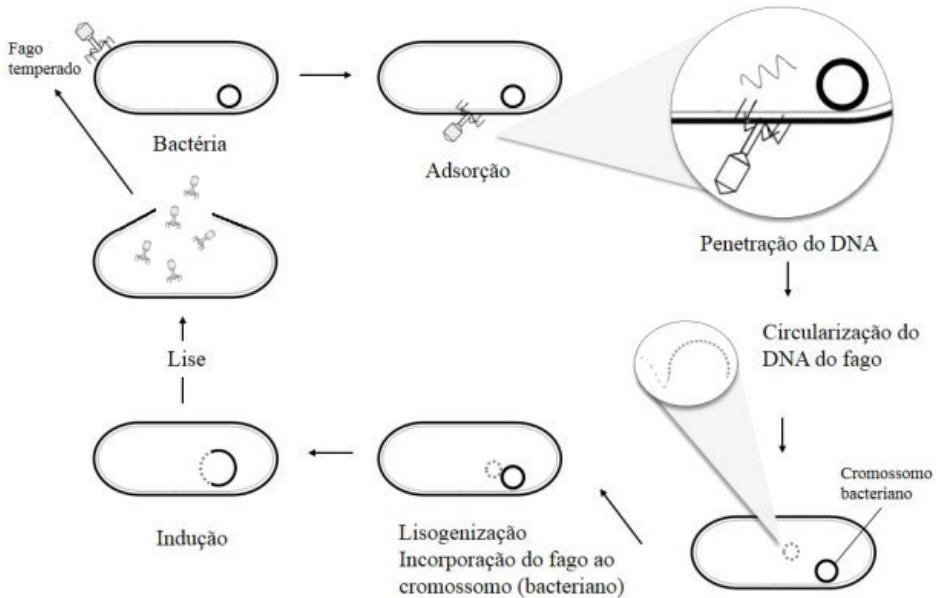
### 11.7 Tipos de recombinação em bactérias

Três tipos clássicos de recombinação foram descritos em bactérias, a transformação, a conjugação e a transdução. Dois deles, descritos na década de 1940 no século passado, foram baseados na contribuição dos vírus. A transdução vem a ser a recombinação envolvendo bacteriófagos que podem transmitir características genéticas de células bacterianas para outras. No sistema de recombinação por conjugação, características genéticas são também transmitidas entre bactérias de mesma espécie e mesmo entre espécies distintas; este sistema envolve a presença de plasmídios que muito provavelmente tem origem viral podendo ser considerados provenientes de vírus (bacteriófagos) sem capa proteica, mas que usam pontes, os *pilli* sexuais de bactérias, que possibilitam sua transferência e mesmo transferência de parte ou todo cromossomo de uma célula bacteriana para outra. Sem a descoberta dos sistemas de recombinação em bactérias não ocorreria o rápido desenvolvimento da genética microbiana, bem como a elucidação dos sistemas de regulação gênica e da tecnologia do DNA recombinante que ocorreram do início dos anos 1950 em diante. As Figuras 4 e 5 apresentam os sistemas de recombinação em bactérias por transdução em seus dois principais tipos, a transdução generalizada (Figura 4) e a restrita (Figura 5).



**Figura 4** - A transdução generalizada mediada por bacteriófagos em bactérias. O vírus não é integrado ao cromossomo bacteriano, multiplica-se e lisa a célula.

Fonte: Ilustração de Sarina Tsui - Esalq/USP.



**Figura 5** - A transdução restrita. O vírus é integrado ao cromossomo bacteriano (estado de profago) e pode conferir certas propriedades ao hospedeiro. Por indução pode ser liberado do cromossomo e no estado livre, lisa a célula.

Fonte: Ilustração de Sarina Tsui - Esalq/USP.

## 11.8 Material genético

Como revisto por Azevedo (2008), Hershey e Chase mostraram pela primeira vez, usando bacteriófagos marcados radiativamente com fósforo (DNA) e enxofre (proteínas), que embora haja penetração do DNA e de proteínas em células bacterianas, apenas o DNA era transmitido para a progênie dos vírus resultantes da lise das bactérias. Embora experimentos de transformação bacteriana mostrassem o mesmo neste sistema de recombinação em bactérias, esta pesquisa foi outro exemplo de que o DNA era o material genético, antes mesmo das clássicas descobertas de Watson e Crick (1953), mais uma vez colocando os vírus em papel de destaque no desenvolvimento da genética e biologia molecular. Outros dados importantes descobertos após a introdução dos vírus em genética foram relacionados à constatação de que os genes não são indivisíveis, mas possuem unidades de mutação, recombinação e função como já mencionado anteriormente quando foi citado o trabalho de Benzer em 1955. Estes dados foram, logo a seguir, usados para a descoberta de propriedades do código genético. Antes mesmo da decifração integral deste código. Neste caso foi empregado o fago T4 na forma selvagem e mutantes que atacam a bactéria *Escherichia coli* e cujos genes envolvidos ocupavam duas posições (A e B) do material genético do fago, quando foi mostrado pelo uso do mutagênico acridina que tem a capacidade de se inserir no DNA do fago, que o código genético devia ter três letras (03 nucleotídeos ou múltiplo de 03 nucleotídeos para cada aminoácido de 01 proteína) e deveria ter um ponto inicial e ponto final; este é mais um exemplo do valor dos vírus para elucidação e desenvolvimento de pesquisas na época. Muitos outros exemplos podem ser citados. Só para finalizar, há que se mencionar a descoberta de sistemas de restrição de entrada de bacteriófagos em bactérias que resultaram na descoberta de enzimas de restrição de grande importância para a tecnologia do DNA recombinante.

## 11.9 Mutantes em vírus e recombinação

Mutantes em vírus, especialmente em bacteriófagos foram inicialmente sendo descritos, a maioria relacionados às 'placas de lise' de diferentes tipos que formam em placas de Petri com meio de cultura semeado com bactérias hospedeiras. Estas placas de diferentes tipos (maiores, menores, turvas ou límpidas, circulares ou não) (Figura 1) permitiram a demonstração de que existem sistemas de recombinação em fagos e que eles trocam material genético. Surgiram assim pesquisas com genética de vírus

mesmo sem que eles fossem incapazes de formar colônias mas simplesmente pelos seus efeitos em células hospedeiras.

Vírus como vetores: um vetor é uma molécula de ácido nucleico podendo ser circular, de existência independente ou ligado ao cromossomo bacteriano e capaz de duplicar-se em células. Em geral, os vetores podem ser um plasmídeo ou vírus, o que dá no mesmo, se considerados os plasmídios como tendo origem viral. Estes vetores ou veículos são extremamente importantes, pois podem levar genes clonados (os passageiros) até uma célula hospedeira. Neste particular os vírus têm contribuído para um sistema de recombinação muito utilizado na tecnologia do DNA recombinante ou engenharia genética. Além de sua importância no estudo de vários aspectos básicos da pesquisa, eles têm enorme valor biotecnológico pela possibilidade de formação de produtos ditos transgênicos, combinando qualidades de diferentes espécies, gêneros e até reinos tendo assim enorme valor aplicado, tais como, na área de agricultura, para a obtenção de plantas transgênicas resistentes a herbicidas, insetos pragas ou com maior qualidade nutricional. No caso de vírus, por exemplo, o *Caulimovirus*, o *Geminivirus* e outros podem ser usados para introdução de genes em plantas visando produção de proteínas de interesse. Genes introduzidos nestes vírus podem, quando incorporados a vegetais, levar estes genes de interesse a se manifestar embora os próprios vírus não necessariamente sejam multiplicados, mas permitindo pelas plantas a produção de proteínas de genes passageiros, proteínas estas que podem ser de grande valor agrônômico. Os vírus ou parte deles podem ser inseridos em um plasmídeo como o de *Agrobacterium tumefaciens* (Ti) em um processo denominado de agroinfecção. Certos promotores de *Caulimovirus* podem ser empregados em plantas transgênicas como as resistentes a herbicidas, produtoras de toxinas de insetos e outras. Da mesma maneira, os vetores virais têm valor na área de saúde, na produção de vacinas, antígenos e anticorpos. O vírus pode também ser usado como vetor para terapia gênica e produção de vacinas e o baculovírus é usado como instrumento para produção de proteínas recombinantes em células de insetos (LU; CHEN; LIU, 2012). Entretanto essas são áreas que, por não fazer parte da área de alimentação e agricultura objeto principal do presente capítulo, não serão aqui discutidas em detalhes.

### **11.10 Vírus usados como antibióticos**

Antibióticos são empregados em rações animais com várias finalidades, por exemplo, aumentar o crescimento e peso de bovinos, aves e outros animais domésticos. A tendência é banir estas práticas em animais, pelo uso de antibióticos empregados no tratamento de infecções bacterianas na saúde humana, pois o problema de

resistência genética de micro-organismos está cada vez mais sério tornando muitos antibióticos ineficazes. O problema é incrementado pelo uso indevido e indiscriminado de antibióticos na saúde humana, animal e vegetal. Mais ainda, cada vez menos novos antibióticos são lançados no mercado tornando o problema ainda mais grave. Atualmente, a cefalosporina e o cloranfenicol são dois antibióticos já banidos para uso animal. Além disso, indústrias farmacêuticas têm diminuído ou cessado a busca de novos antibióticos de origem bacteriana ou de origem fúngica.

Uma alternativa vem a ser o uso de bacteriófagos que são os tipos mais comuns de vírus. A maioria pertence à ordem Caudovirus (caudados) e possuem como material genético o dsDNA com desde 33 mil até 170 mil pares de bases. Eles são muito limitados no tocante ao ataque de espécies bacterianas e podem lisar células, bem como nos profagos, podem ser lisogênicos (Figura 4), isto é, serem incorporados ao cromossomo bacteriano. Os fagos têm sido empregados desde o início do século XX no controle da *Salmonella* em aves. Eles foram também e ainda vêm sendo esporadicamente empregados, em pequena escala, em plantas atacadas por bactérias fitopatogênicas por aspersão de bacteriófagos em vegetais atacados por elas.

Mais recentemente fagos intactos ou suas enzimas líticas são empregadas e, neste caso, tomam o nome de enzibióticos, provenientes tanto de vírus como de outras fontes. Estes enzibióticos estão sendo usados também para preservação de queijos e vinhos, colírios e pastas dentífricas como será mencionado mais adiante. Eles não acarretam efeitos imunogênicos e alguns deles já foram aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration, USA*) e reconhecidos como GRAS, ou seja, considerados seguros. Este é mais um exemplo do uso benéfico dos vírus. O termo enzibióticos refere-se principalmente a vírus (fagos) que atacam e lisam bactérias luta contra doenças. (VEGA-CRESPO et al., 2007). É interessante que este tipo de emprego dos fagos como antibióticos já teve uma boa aceitação nos primórdios do século XX, após os trabalhos de Twort e D`Herelle já citados anteriormente. Foram muitas, na época, as pesquisas realizadas nos EUA, Europa Ocidental e principalmente na antiga União Soviética e Polônia, mas pouco divulgados por seus trabalhos serem publicados em russo o polonês, O denominado fenômeno Twort-D`Herelle já mencionado na introdução do presente capítulo desencadeou inclusive o uso de fagos por D`Herelle para curar crianças de surtos de disenteria. Em 1919/1921, os fagos foram usados contra doenças de pele causadas por *Staphylococcus*. Também foram relatados tratamentos da cólera e peste bubônica por meio de fagos. Estes remédios foram comercializados pela famosa empresa L`Oreal. Em 1940, a Ely Lilly Co., empresa norte-americana, também comercializou estes produtos de fagos mas, os mesmos foram quase que abandonados a partir dos anos 1940 em diante, devido ao sucesso dos antibióticos especialmente a penicilina. No entanto, um melhor e maior conhecimento dos fagos só ocorreu após 1939 com o uso da microscopia eletrônica. Esse fato limitava seu emprego, pois

pensava-se que eles eram muito amplos em espectro o que não era verdadeiro. Também o modo de aplicação limitava seu uso, pois muitos fagos já estavam inativos quando aplicados reduzindo assim sua eficiência. Como resultado, os fagos empregados como antibióticos foram praticamente deixados de lado e apenas na União Soviética este estudo ainda persistiu em pequena escala. Entretanto com o aumento da resistência aos antibióticos comuns e redução do número de novos antibióticos no mercado, vários produtos à base de fagos continuam sendo comercializados especialmente na Rússia destacando-se o Eliava Institute (EIBMV) que testou e está empregando vários destes produtos. Neste instituto já trabalharam cerca de 1.200 técnicos envolvidos em formulações contra *Proteus* e *Staphylococcus*. Também o Hirsfeld Institute (HIET), fundado em 1952, tem produtos contra as bactérias do gênero *Shigella*. Mais recentemente, o instituto contra doenças animais no Reino Unido, usa produtos de fagos no controle de doenças de porcos, carneiros e bovinos contra *Klebsiella* e *E. coli*. Este tipo de controle ou fagoterapia utiliza coleções de fagos contra infecções bacterianas humanas e de outros animais ou contra bactérias fitopatogênicas. Têm sido descritos casos de sucesso da ordem de 75% a 100% após 15 dias de tratamento.

Recentemente, uma instituição designada de GLOBAL VIRAL foi fundada em San Francisco, Califórnia, em 2009, por Nathan Wolfe, que procura meios de minimizar efeitos de doenças de alto impacto. Em 1980, William Smith, no Reino Unido, mostrou em camundongos, que os fagos estavam sendo mais efetivos que antibióticos comuns no controle de diarreias em porcos, carneiros e outros animais domésticos. A partir de 2007, cinco produtos foram licenciados nos EUA contra bactérias fitopatogênicas de tomateiros e pimentão, e também na destruição de bacterias que causam envenenamento de alimentos bem como no controle da febre aftosa animal. Há ainda problemas de aceitação, mas o futuro da fagoterapia é promissor e esperam-se novos produtos empregando vírus que venham a ser mais numerosos à medida que os antibióticos clássicos vão perdendo sua ação devido ao problema da resistência genética bacteriana aos mesmos. Mais detalhes sobre a fagoterapia pode ser encontrada em Sulakvelidze et al. (2001).

### **11.11 Vírus empregados na alimentação e outros produtos**

Já foi mencionado que a fagoterapia pode ser usada no controle de alimentos prevenindo emergência de bactérias danosas que são eliminadas pelos fagos. Outros exemplos podem aqui ser descritos.

Um dos exemplos mais bem estudados da utilização de vírus na indústria alimentícia é na produção de vinhos, bebidas destiladas e fermentações. É



conhecido que fungos do tipo leveduras são empregados em fermentações para produção de vinhos, bebidas destiladas, panificação etc. Muitas destas leveduras, por exemplo, as vinícolas são conhecidas por possuírem uma forma de vírus no seu interior, os denominados fatores ‘assassinos’ ou *killlers*. O caráter *killer* foi descrito pela primeira vez e, como quase sempre, na microbiologia da época, por Pasteur. Esta característica é encontrada em linhagens de vírus de dsDNA existentes em leveduras e outras espécies que são produtoras de toxinas secretadas para o exterior das células que albergam os vírus *killer*. Leveduras com o fator *killer* isolados de uvas foram avaliadas para produção de vinhos. Duas destas linhagens foram testadas em coexistência com as cepas comerciais Vin 7 e GS 1. A cepa GS-1 mostrou-se muito mais sensível em comparação com a cepa Vn 7. Em fermentações mistas, a produção depende do tamanho da população *killer* e da toxina produzida e o grau de sensibilidade da cepa de vinho usada. Um fator, o *killer*-103, praticamente exterminou a população de uma levedura de vinho em concentração de apenas 0,1% da população total de leveduras (JACOBS; VAN VUUREN, 1991). Então, o emprego de leveduras apropriadas vem se tornando muito importantes em fermentações alcoólicas devendo-se ter em conta as populações de leveduras utilizadas para que produtos de boa qualidade sejam obtidos. Mais recentemente têm sido apresentados resultados que demonstram que micro-organismos endofíticos podem alterar o *terroir* (palavra francesa que indica território e compreendem também outros fatores como clima, solo etc) de vinhos o que pode se constituir em um processo de melhoramento do flavor de vinhos finos. Da mesma forma, leveduras usadas na produção de vinhos podem ser adicionadas ao solo e têm sido visto que elas podem ser incorporadas as uvas (MANDI et al., 2015). Os vinhos modificados pelos micro-organismos são responsáveis pela aceitação do consumidor, aumento de qualidade e valor econômico e isto não é só devido ao clima, tipo de uva, solo etc. Entram os micro-organismos do solo e endofíticos que podem ser introduzidos ou mesmo manipulados geneticamente e aí se incluem leveduras como as *killer* salientando-se que o fator *killer* é um vírus ou originário de partículas virais. Ao se pensar em leveduras contendo vírus do tipo *killer*, isto pode contribuir para alterar para melhor ou pior o flavor de vinhos e outros alimentos que usam leveduras de fermentação. Também fagos da bactéria *Leuconostoc* australianos foram encontrados em quatro fermentações de vinhos tintos e foram inativados em pH menor que 3,5 e adição de dióxido de enxofre. Até o momento, leveduras *killer* são pouco estudadas em fermentação alcoólica. Elas podem prejudicar ou beneficiar a fermentação, eliminando cepas prejudiciais (ANTONINI et al., 2005). Da mesma forma que em vinhos, leveduras *killer* foram encontradas em caldo de cana para fabricação de cachaça e podem alterar sua produção, pois 7% das leveduras encontradas têm o fator *killer*. O mesmo deve estar ocorrendo em casos de fermentações para produção de etanol como combustível; neste caso o

rendimento tem sido aumentado por manipulação das leveduras empregadas e os vírus poderão ter um papel de destaque na eliminação de bactérias contaminantes nas fermentações.

No caso de laticínios, há também influência dos vírus em produtos lácteos como leite, queijos e outros. Em geral, os fagos podem ser prejudiciais, mas se bem manipulados eles podem deixar de se constituírem em problemas e se usados corretamente podem beneficiar a produção destes produtos à base de leite (MARCÓ; MOINEAU; QUIBERONI, 2012). Foi detectada também na bactéria *Kluyveromyces lactis* um elemento linear de origem viral com multiplicação semelhante à adenovírus que também pode alterar para melhor ou pior a valor comercial dos produtos lácteos.

Finalmente, os fagos podem ser usados em dentifrícios, corantes, cosméticos e outros produtos como eliminadores de bactérias indesejáveis. Estes produtos com vírus protetores ainda deverão se expandir, reduzindo a utilização de antibióticos e conseqüentemente também o uso de antibióticos para cura de infecções bacterianas. É mais um exemplo do uso dos vírus e seus aspectos benéficos.

## 11.12 Conclusões

O presente capítulo procurou mostrar que os vírus, muito mais que prejudiciais à vida na Terra, são essenciais para nossa sobrevivência. O seu papel na ecologia, na proteção de plantas e animais e inclusive na perpetuação da espécie humana é relevante e imprescindível. O tema foi abordado principalmente envolvendo a área da agroindústria e pesquisa, mas, espera-se que tenha ficado claro que os vírus têm pontos positivos também nas áreas de saúde e auxiliam o desenvolvimento de outros campos de pesquisas com amplas aplicações biotecnológicas.

## Referências

ALLEN, R. Modelling bacteriophage. **Microbiology Today**, London, v. 37, p. 20-23, 2010.

ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1998.

- ANTONINI, S. R. C. et al. The killer yeasts and the alcoholic fermentation. **Brazilian Journal Food Technology**, Campinas, 5º SIPAL, p. 40-46, 2005.
- AZEVEDO, J. L. **Genética de microrganismos**. 2. ed. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 2008.
- BAO, X.; ROOSSINCK, M. Multiplexed interesting virus of endophytic fungi. **Advances in Virus Research**, Amsterdam, v. 80, p. 32-58, 2011.
- BENZER, S. Fine structure of a genetic region in bacteriophage. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, D.C., v. 41, no. 6, p. 344-354, 1955.
- BEZERRA, T. E. **Potencial biotecnológico dos fungos endofíticos no guaraná (*Paullinia cupana var. sorbilis*) no controle biológico da antracnose**. 2015. 101 f. Tese de (Doutorado)-PPGF em Biotecnologia Interunidades, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2015.
- CLAVERIE, J.-M.; ABERGEL, C. Open questions about giant viruses. **Advances in Virus Research**, Amsterdam, v. 85, p. 25-56, 2013.
- CRUZ, I. Utilização do baculovírus no controle da lagarta do cartucho do milho *Spodoptera frugiperda*. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariuna: Embrapa, 1999. p. 201-230
- DALZOTO, P. R. et al. Horizontal transfer and hypovirulence associated with double-stranded RNA in *Beauveria bassiana*. **Mycological Research**, Amsterdam, v. 110, no. 12, p. 1475-1481, 2006.
- DIGREGORIO, B. In ocean sediments phages outnumber hosts raising questions. **Microbe Magazine**, St. Paul, v. 8, no. 12, p. 485-486, 2013.
- DORNAS, F. et al. Mimivirus circulation among wild and domestic mammals, Amazon region Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 20, no. 3, p. 469-472, 2014.
- FIGUEIRÊDO, L. C. et al. Genetic and pathogenic diversity of *Colletotrichum gloeosporioides*, the causal agent of cashew anthracnose. **Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences**, Jaipur, v. 2, no. 1, p. 250-259, 2012.
- GHABRIAL, S.; SUZUK, N. Viruses of plant pathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 47, p. 353-384, 2009.

HARPER, D. **Viruses: biology, applications and control**. New York: Garland Science, 2011.

JACOBS, C.; VAN VUUREN, J. Effects of different killer yeasts on wine fermentations. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 42, p. 295-300, 1991.

JIANG, D. et al. Virus of the plant pathogenic fungus *Sclerotinea sclerotiorum*. **Advances in Virus Research**, Amsterdam, v. 86, p. 215-248, 2013.

LU, H.-Y.; CHEN, Y.-H.; LIU, H.-J. Baculovirus as a vaccine vector. **Bioengineered**, Austin, v. 3, no. 5, p. 271-274, 2012.

MADIGAN, M.; MARTINKO, J.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. 9th ed. New Jersey: Prentice Hall, 2000.

MANDI, K. et al. Vines take up yeasts from soil and transport them through the vine to the stem and skins of grapes. **Journal fur Terroiwien Biodiversitat und Klimafarming**, Ithaka, p. 349-355, 2015.

MARCÓ, M. B.; MOINEAU, S.; QUIBERONI, A. Bacteriophages and dairy fermentations. **Bacteriophage**, Austin, v. 2, no. 3, p. 149-158, 2012.

PEARSON, M. et al. Mycoviruses of filamentous fungi and their relevance to plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 10, no. 1, p. 115-128, 2009.

PETERS, J. **Classic papers in genetics**. New Jersey: Prentice Hall, 1959.

RODRIGUES, R. et al. Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. **The ISME Journal**, London, v. 2, no. 4, p. 404-416, 2008.

ROHWER, F.; BAROTT, K. Viral information. **Biology & Philosophy**, New York, v. 28, no. 2, p. 283-297, 2013.

ROOSSINCK, M. Viruses can be our friends. **Microbiology Today**, London, v. 39, p. 100-103, 2012.

SKWARECKI, B. Friendly viruses protect us against bacteria. **ScienceAAAS/News**, Washington, D.C., 2013. Disponível em: <<http://news.sciencemag.org/2013/05/friendly-viruses-protect>>. Acesso em: 12 jan. 2015.

STONE, M. Newly analysed giant viruses suggest reconfigured tree of life. **Microbe Magazine**, Washington, D.C., v. 8, no. 10, p. 386-387, 2013.

SULAKIVELIDZE, A.; ALAVIDZE, Z.; MORRIS JR., G. Bacteriophage therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, D.C., v. 45, no. 3, p. 649-659, 2001.

SZEWEZYK, B. et al. Baculovirus: re-emerging biopesticides. **Biotechnology Advances**, Amsterdam, v. 24, no. 2, p. 143-160, 2006.

VEGA-CRESPO, P. et al. Enzybiotics: a look to the future, recalling the past. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 96, no. 8, p. 1917-1924, 2007.

WAGNER, R.; MITCHELL, H. **Genetics and metabolism**. New York: John Wiley, 1955.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. Compton. molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose. **Nature**, London, v. 171, no. 4356, p. 737-738, 1953.

WOMMACK, E. Viral ecology: old questions, new challenges. **Microbiology Today**, London, v. 37, no. 2, p. 96-99, 2010.

YU, X. et al. A geminivirus-related DNA mycovirus that confers hypovirulence to a plant pathogenic fungus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, D.C., v. 107, no. 18, p. 8387-8392, 2010.

# Microalgas: possível solução para um mundo sustentável?

---

Vanessa Kava, José Viriato Coelho Vargas, André Bellin Mariano

## 12.1 Introdução

O crescimento contínuo da demanda de energia global está exigindo o desenvolvimento de alternativas de combustível. Além da necessidade pelo consumo, a conscientização dos problemas ambientais gerados pelo uso de combustíveis fósseis tem impulsionado as pesquisas em busca de alternativas viáveis de energia limpa. Neste cenário, os investimentos na pesquisa e desenvolvimento de fontes energéticas renováveis têm sido incrementados, e a viabilidade econômica no uso de energia limpa que há poucas décadas parecia inatingível, atualmente passou a uma realidade possivelmente próxima. Uma das principais críticas na produção de biocombustíveis de origem vegetal é o uso de áreas agricultáveis para a produção de alimentos para fins energéticos, enquanto a fome continua a fazer parte das deficiências mundiais. Considerando este contexto, o desenvolvimento de uma metodologia economicamente viável para a produção de biocombustíveis e bioprodutos por microalgas aparece como uma solução que atende a todos estes requisitos.

Uma das aplicações mais importantes das microalgas é a energética, uma vez que podem gerar energia de diferentes formas, tais como bio-hidrogênio, biodiesel e biogás. A atenção das indústrias tem se voltado cada vez mais para o ramo de biodiesel derivado de microalgas, pois além de ecologicamente correto, as algas têm um potencial maior do que as culturas tradicionais (oleaginosas), oferecendo um rendimento satisfatório em curto espaço de tempo. Além de fonte energética, as microalgas produzem substâncias de interesse da indústria farmacêutica e nutracêutica de alto valor agregado, como os derivados de carotenoides. As microalgas podem ser cultivadas em fotobiorreatores (FBRs), desta forma não oneram o uso de terras que podem ser destinadas à agricultura. As condições de cultivo podem ser parcialmente controladas e devem ser adequadas para cada espécie de microalga. Atingindo-se as melhores condições, o incremento da produção torna-se limitado, porém estratégias

de melhoramento genético por tecnologia do DNA recombinante ou engenharia genética podem possibilitar real aumento de produtividade, viabilizando a produção em escala industrial.

Em uma análise cienciométrica realizada em bancos de dados indexados, Konur (2011) mostrou que no período de 30 anos (1980 - 2009) houve aumento no interesse da comunidade científica a respeito de microalgas e bioenergia. Foram, ao total, 717 artigos publicados naquele período, sendo possível observar aumento exponencial a partir de 2007. Os países que mais contribuíram foram Estados Unidos da América, China, Alemanha e Inglaterra. Infelizmente o Brasil contribuiu apenas com 1% de todos os artigos, mostrando que ainda é necessário avançar muito a respeito dos estudos acadêmicos e aplicações energéticas das microalgas.

Este capítulo, portanto, está organizado de forma a fornecer os fundamentos essenciais para o entendimento dos desafios a serem vencidos para viabilizar a utilização industrial das microalgas. Assim, apresentam-se as características biológicas das microalgas; possíveis aplicações diretas e indiretas; a busca pelo melhoramento genético focado em produtos de maior interesse; o uso da ferramenta de modelagem matemática e simulação computacional para avaliar potenciais resultados antes de investimentos financeiros de grande porte; perspectivas de produção de microalgas em larga escala, e uma apreciação crítica sobre os assuntos tratados.

## 12.2 Características das microalgas

As microalgas compõem um grupo extremamente heterogêneo de organismos. Para ser denominado de microalga, o organismo deve ser pequeno, geralmente microscópico, unicelular ou colonial, com pouca ou nenhuma diferenciação celular. Deve apresentar cor, pela presença de pigmentos e, ocorrer principalmente em água, mas não necessariamente. Microalgas também devem ser fotoautotróficas, mas não necessariamente todo o tempo. Filogeneticamente, as microalgas podem ser procariotas ou eucariotas e, em termos evolutivos, recentes ou muito antigas. Esta diversidade faz das microalgas uma fonte produtora de uma vasta gama de produtos químicos com aplicações na alimentação, indústria de cosméticos, farmacêutica e até mesmo indústrias de combustíveis.

Desta forma, as microalgas são um grupo artificial, pois inclui alguns táxons que são muito mais relacionados com outros procariotos não fotossintetizantes do

que com outras algas. Essa afirmação resulta de estudos filogenéticos com base na biologia molecular que superaram a classificação baseada na morfologia, mostrando que a diversidade biológica observada nas algas resulta de sua origem polifilética (BALDAUF, 2008). As microalgas incluem as assim denominadas cianobactérias, que pertencem ao domínio Bacteria, mas a maioria das espécies de microalgas pertence ao domínio Eukarya, dentro do grupo Archaeplastida (BALDAUF, 2008), segundo o esquema de classificação dos seres vivos, mais aceito atualmente, que define três domínios: Bacteria, Archaea e Eukarya (WOESE; KANDLERT; WHEELIS, 1990). O número exato de espécies de microalgas ainda é desconhecido, sendo encontradas citações relatando que podem existir entre 200.000 até alguns milhões de representantes deste grupo.

As Cyanobacteria ou Cyanoprokaryota (também denominadas Cyanophyceae quando classificadas como algas) são organismos unicelulares, coloniais ou filamentosos, caracterizados pela ausência de um núcleo e outras organelas envolvidas por membrana. Elas estão entre os primeiros organismos fotossintéticos a evoluir no planeta Terra há cerca de 3,5 bilhões de anos, capturando a luz do Sol através do pigmento verde clorofila A e uma combinação de pigmentos de proteína ficobilina solúveis em água (ficocianina e ficoeritrina). A origem das cianobactérias foi estimada em cerca de 3,5 bilhões de anos pela descoberta de fósseis (estromatólitos), em rochas sedimentares encontradas no noroeste da Austrália. Os estromatólitos são as únicas evidências de vida do período geológico Arqueano. Assim, esses seres fotossintéticos apareceram no Arqueano, e devem ter sido responsáveis pelo aparecimento do oxigênio na atmosfera terrestre. Isso parece ter acontecido há cerca de 2,5 bilhões de anos, viabilizando a origem da vida eucarionte dando lugar ao que se denomina atualmente o período proterozóico (que significa aproximadamente dos ‘animais primitivos’) (CARVALHO, 2004).

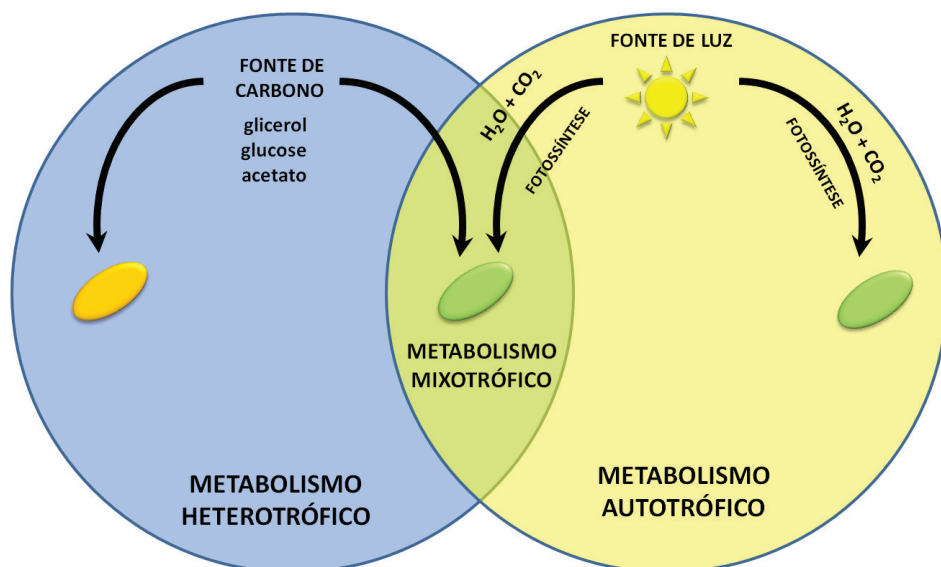
As cianobactérias são produtoras primárias assim como as algas eucarióticas. Há uma distante relação filogenética entre as cianobactérias e outros organismos denominados de ‘algas’. Atualmente sabe-se que estes organismos não têm relação filogenética com qualquer dos grupos de algas, a não ser como prováveis antepassados dos cloroplastos conforme a teoria da endossimbiose – e encontram-se classificados como um grupo dentro do domínio Bacteria (WOESE; KANDLERT; WHEELIS, 1990).

Neste ponto, é importante reconhecer que as microalgas, inicialmente através das cianobactérias e posteriormente das microalgas eucarióticas, além de viabilizar a vida com respiração celular aeróbica, originaram as plantas terrestres. Assim, indiretamente criaram as condições básicas para o aparecimento da espécie humana e de todos os outros animais que surgiram no planeta Terra.



## 12.3 Metabolismo e fatores para o crescimento de microalgas

O metabolismo da microalga pode ser autotrófico, heterotrófico ou mixotrófico, conforme é mostrado na Figura 1. No primeiro, as funções são regidas pela fotossíntese, podendo ser denominado também de fotoautotrófico. No cultivo heterotrófico são disponibilizados nutrientes para que o metabolismo ocorra na ausência de luz. E por último, no cultivo mixotrófico ocorrem ambos os metabolismos citados anteriormente. Cultivos heterotróficos são altamente produtivos, contudo esses sistemas dependem diretamente do fornecimento de fonte de energia orgânica, normalmente açúcares redutores, o que torna esses sistemas diretamente dependentes da produção primária de alimentos.



**Figura 1** - Diferentes metabolismos presentes nas microalgas: heterotrófico, autotrófico e mixotrófico.

Fonte: Os autores.

Tanto no ambiente natural quanto nos cultivos, o crescimento de uma população de microalgas é o resultado da interação entre fatores biológicos, físicos e químicos. Os fatores biológicos estão relacionados às próprias taxas metabólicas da espécie cultivada, bem como a possível influência de outros organismos sobre o desenvolvimento algal. Quanto aos fatores físico-químicos, que influenciam no crescimento das microalgas, são principalmente reportados estudos sobre a radiação solar, a temperatura, a

disponibilidade de gases como oxigênio e dióxido de carbono, agitação e mistura, controle de pH e a disponibilidade de nutrientes.

A radiação solar é o fator mais utilizado no processo fotossintético, não apenas pela sua natureza, mas pela sua distribuição de forma global. Convertida em energia química ela é armazenada sob a forma de carboidratos (monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos), proteínas, lipídios e até muitas vezes, combustíveis fósseis, fotossintetizados em épocas remotas. As reações de captação da luz ocorrem nas membranas internas, ou tilacoides, onde são encontrados a clorofila e outros pigmentos. O padrão de absorção da radiação por um pigmento é conhecido como espectro de absorção de cada substância. A clorofila absorve radiação nos comprimentos de onda azul, violeta e também no vermelho, e como reflete a luz verde, apresenta a cor verde. A fotossíntese ocorre pela absorção da radiação na faixa de 400-700 nm por pigmentos fotossintéticos, i.e., clorofila ou carotenoides. Esta faixa do espectro é utilizada pelos vegetais como fonte de energia para as suas atividades metabólicas, sendo comumente denominada em fisiologia de plantas de Radiação Fotossinteticamente Ativa (PAR, do inglês *Photosynthetically Active Radiation*) (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 1996).

O segundo fator que influencia diretamente no crescimento de todos os organismos vivos é a temperatura que, além de influenciar nas velocidades de reações celulares, afeta também a natureza do metabolismo, a concentração de biomassa, as necessidades nutricionais e a composição do organismo. Cada microalga tem uma temperatura ideal para que ocorra o crescimento máximo mas, em geral, tolera um intervalo de temperatura que em média é de 10°C para mais ou para menos da temperatura ideal. A temperatura exerce uma influência muito importante em culturas de microalgas, pois chega a controlar as espécies que dominam certas regiões. Estas influências foram testadas experimentalmente e concluiu-se que se em um sistema forem colocadas diversas culturas de microalgas irá se destacar e crescer a microalga que tem o seu metabolismo adequado para a faixa de temperatura em que o sistema se encontra. O isolamento de espécies tolerantes a elevadas temperaturas (40°C – 60°C) vem sendo considerado um importante critério na seleção de microalgas para fins biotecnológicos, uma vez que possibilitaria a injeção direta de dióxido de carbono oriundo de processos térmicos no sistema de cultivo (ONO; CUELLO, 2007).

A variação do pH em culturas de microalgas ocorre devido ao consumo de substratos, solubilização e consumo do dióxido de carbono, e à degradação de metabólitos produzidos. A faixa de pH considerada ótima para a fotossíntese situa-se entre 7,5 e 10. O pH pode ser controlado facilmente nos cultivos de microalgas através da dissolução do dióxido de carbono na fase aquosa de FBRs.

A concentração de  $O_2$  no meio de cultivo microalgal é outro fator que deve ser considerado, pois níveis extremos de  $O_2$  dissolvido podem gerar danos foto-oxidativos nas células. Entretanto, como o oxigênio é um produto do metabolismo fotossintético, sua formação e solubilização em fotobiorreatores é um indicativo de elevadas taxas de consumo de carbono inorgânico (MUÑOZ et al., 2004).

O meio de cultura preparado para o cultivo influencia diretamente no crescimento celular microalgal, bem como na composição química da microalga. Os elementos nutritivos mais importantes são carbono, nitrogênio, hidrogênio, oxigênio, fósforo, magnésio, cobre, zinco e molibdênio. Enxofre, potássio e cálcio também são necessários, mas eventualmente podem ser substituídos. Dependendo da quantidade necessária, estes elementos podem ser classificados como macronutrientes (centenas ou milhares de  $\mu\text{g g}^{-1}$  de massa seca) ou como micronutrientes (unidades ou dezenas de  $\mu\text{g g}^{-1}$  de massa seca). Alguns elementos podem ser identificados como macro ou micronutrientes por apresentarem uma concentração limítrofe (LOURENÇO, 2006).

O carbono é um dos principais elementos necessários para as microalgas. Sua demanda decorre do fato de que o carbono constitui-se no componente mais importante de todas as substâncias orgânicas sintetizadas pelas células (e.g., proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos, vitaminas, lipídeos). O dióxido de carbono é a fonte de carbono que contribui para o crescimento fotossintético e autotrófico das microalgas. Em alguns cultivos se faz necessária a adição de  $\text{CO}_2$  gasoso, pois no ar existe em média apenas cerca de 0,03% de  $\text{CO}_2$ , ou de sais carbonatos ou bicarbonatos.

A proporção de nitrogênio na biomassa pode variar de 1 a 10% em peso seco, sendo que uma grande variedade de compostos nitrogenados, orgânicos e inorgânicos, pode ser utilizada como fonte de nitrogênio para o cultivo de microalgas. O nitrogênio é incorporado dentro do micro-organismo na síntese de proteínas, sendo que sua ausência acarretaria a diminuição de aminoácidos e, conseqüentemente, do teor proteico.

O oxigênio e o hidrogênio não constituem um problema, pois são facilmente obtidos pelas microalgas nos sistemas aquáticos. O primeiro é abundante nas águas em geral, estando em concentrações baixas apenas em grandes profundidades, nas quais formas de vida fotossintetizantes não ocorrem e em águas poluídas ou com grande concentração de matéria orgânica. Já o hidrogênio é obtido pela quebra da molécula de água durante a fotossíntese, sendo então disponível em todos os ambientes aquáticos onde há microalgas.

O fósforo é considerado um dos principais elementos limitantes ao crescimento das microalgas. Regiões marinhas pobres neste nutriente, como o mar do sul

da China, apresentam baixa biomassa fitoplanctônica (LOURENÇO, 2006). Este elemento é necessário para a realização de todos os processos que envolvem trocas energéticas nas células, compondo as moléculas de ATP (Adenosina trifosfato), açúcares fosfatados, ácidos nucleicos e fosfoenzimas. A energia luminosa atua na assimilação do fósforo, possivelmente em razão da acumulação de energia na forma de ATP.

O enxofre é abundante em ambientes marinhos na forma de íons sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) sendo um componente estrutural das proteínas. Algumas vitaminas como tiamina e biotina também apresentam altas concentrações de enxofre.

Outro elemento abundante em ambientes aquáticos, especialmente marinhos, é o potássio, cujas funções principais referem-se à regulação osmótica, ao controle de pH e à conformação e estabilidade de proteínas. Este elemento pode ser substituído, ao menos em parte pelo sódio. O magnésio é essencial às microalgas por ser constituinte da molécula de clorofila. A falta de magnésio no sistema gera um processo designado de clorose, no qual as células perdem seu conteúdo pigmentar.

Outros elementos como o cobre, zinco e molibdênio participam de vários processos celulares das microalgas como a fotossíntese e a respiração.

Os micronutrientes manganês e cobalto se adicionados ao cultivo podem influenciar significativamente as microalgas. O primeiro micronutriente funciona como um cofator de enzimas que participam da síntese de ácidos graxos, sendo fundamental para o transporte de elétrons no fotossistema II, e atua também na manutenção das estruturas das membranas dos cloroplastos, além de ser um componente estrutural da superóxido-dismutase, enzima que remove radicais superóxidos tóxicos das células. O cobalto é exigido em pequenas concentrações, porém é um componente fundamental da vitamina  $\text{B}_{12}$ , a cianocobalamina, uma das três vitaminas mais importantes para o desenvolvimento de microalgas, participando dos processos de fixação de nitrogênio pela célula, estando, portanto, associado ao metabolismo do nitrogênio.

Algumas microalgas requerem vitaminas adicionais para o ótimo crescimento. As mais comuns são, além da  $\text{B}_{12}$ , a tiamina e a biotina (LOURENÇO, 2006).

Por fim é importante ressaltar que a agitação no meio de cultivo também favorece o crescimento das microalgas. Em cultivos em FBRs, a agitação auxilia na circulação das microalgas para que elas recebam radiação solar de forma uniforme, uma vez que as células de microalgas próximas à parede do reator recebem alta densidade de fluxo fotônico que pode causar fotoinibição, enquanto que as células que se encontram em áreas sombreadas do reator, por receberem baixo fluxo fotônico acabam tendo crescimento mais lento. No entanto, com o movimento das células entrando e saindo

da zona de ótima iluminação com uma determinada frequência, pode-se aumentar a produtividade (LUO et al., 2003).

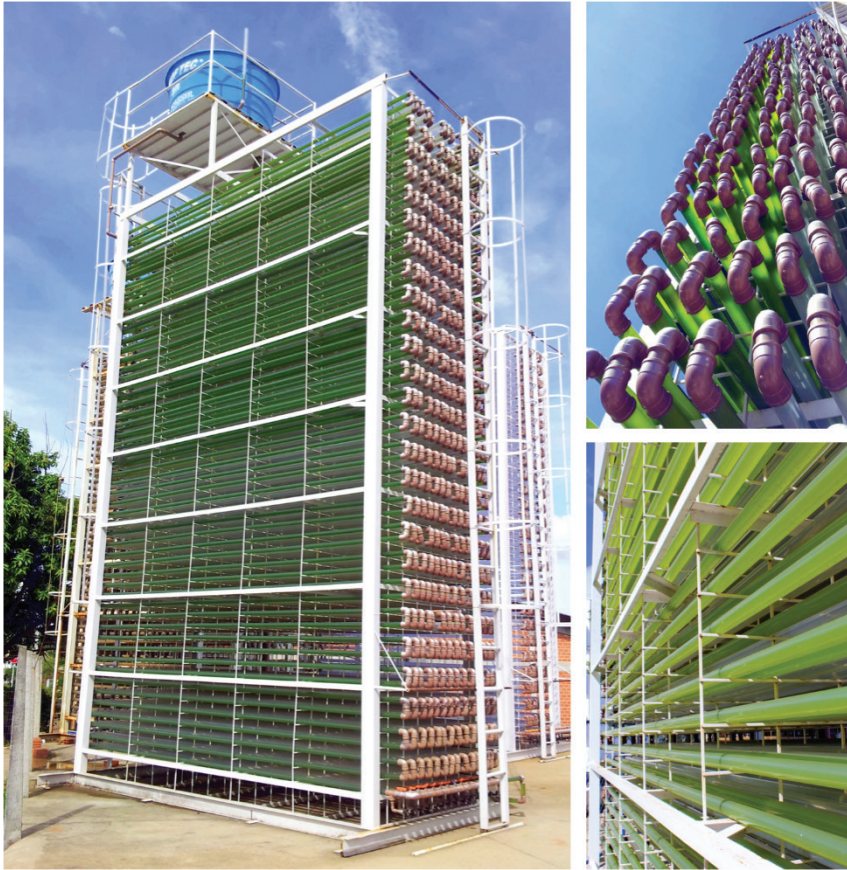
Muitos estudos têm sido desenvolvidos no mundo buscando viabilizar técnica e economicamente a utilização industrial das microalgas (SATYANARAYANA; MARIANO; VARGAS, 2011). A título de ilustração, pode-se citar uma planta autossustentável em energia a partir da biomassa de microalgas cultivadas em fotobiorreatores e outras fontes em desenvolvimento no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento em Energia Autossustentável, NPDEAS, na Universidade Federal do Paraná, UFPR, na cidade de Curitiba, Brasil (SATYANARAYANA; MARIANO; VARGAS, 2011). Nesse projeto, decidiu-se estudar e desenvolver o processo de produção de ração para peixe em escala piloto a partir do resíduo de microalgas utilizadas para produzir biodiesel como material primário, usando fotobiorreatores compactos desenvolvidos pelo próprio grupo de pesquisa, mostrados na Figura 2. A concepção desse fotobiorreator é inovadora e foi recentemente requerida a patente internacional (VARGAS et al., 2012).

## 12.4 Microalgas e possibilidades de aplicações diretas

Considerando-se as possibilidades de aplicações diretas das microalgas, pode-se citar o consumo humano, a nutrição animal e a produção de biocombustíveis.

### 12.4.1 Consumo humano

Um dos maiores problemas que o homem enfrentará neste século será a produção de alimentos para atender a crescente população mundial. O primeiro registro do consumo de microalgas para a alimentação humana tem mais de 2.000 anos, quando o gênero *Nostoc* foi utilizado por chineses para o seu consumo direto, em um período de escassez de outras fontes alimentares. Ainda na Antiguidade, populações africanas, residentes na região do lago Chade, incorporaram o hábito de consumir microalgas como base alimentar, destacando-se neste caso o gênero *Spirulina*. Esta alga era coletada do lago, desidratada e moldada na forma de tabletes para o consumo. Este mesmo gênero era utilizado para consumo pelos Astecas no México. Com a conquista do México pelos espanhóis, a forma como os astecas coletavam esta microalga no lago Texcoco e a consumiam na forma de molho à base de cereais, conhecido como *chimolli* ou molho asteca, foi difundida para outros povos (SPOLAORE et al., 2006).



**Figura 2** - Protótipo de fotobiorreator compacto para aquicultura de microalgas, construído na Universidade Federal do Paraná (8 m x 5 m x 2 m).

Fonte: Os autores.

Fundamentalmente, a utilização de microalgas por humanos na atualidade concentra-se no uso como alimento ou suplemento alimentar, como corante natural de alimentos e ainda nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos. O uso direto de microalgas na alimentação humana dá-se principalmente por meio da preparação de encapsulados ricos em proteínas e vitaminas ou da mistura de pós de alga em alimentos industrializados, como massas, biscoitos, doces e bebidas. Algumas espécies de microalgas vêm sendo cultivadas há mais de 35 anos para a produção de biomassa, empregada na forma de tabletes, pílulas e líquidos. As microalgas podem ser consideradas um alimento funcional (PULZ; GROSS, 2004), ou seja, que trazem algum benefício à saúde, além de nutrir o indivíduo que as consome, como a promoção do crescimento intestinal de *Lactobacillus*, benéficos ao ser humano. Vários produtos obtidos de microalgas apresentam função terapêutica, além

de alimentar, enquadrando-se na classe de produtos denominados atualmente como nutracêuticos. Em extensa revisão sobre o tema, Blas-Valdivia et al. (2012) ressaltam a existência de inúmeros produtos obtidos de microalgas, especialmente de clorofíceas, e suas respectivas ações nutracêuticas, destacando-se propriedades antitumorais, anti-inflamatórias, neuroprotetoras e antioxidante.

O uso de microalgas em cosméticos está parcialmente relacionado às suas propriedades como corantes naturais, mas envolvem também outros atributos, derivados da ação de minerais, vitaminas e outras moléculas presentes nos extratos. Estes extratos de microalgas podem ser encontrados principalmente em produtos para a pele utilizados como protetores solares, em produtos para o cabelo, para a prevenção do envelhecimento da pele e na formação de estrias (SPOLAORE et al., 2006).

#### 12.4.2 Nutrição animal

As microalgas são o alimento principal de várias espécies de peixes, de moluscos e de crustáceos em ambientes naturais. Por serem os principais produtores primários marinhos, as microalgas são fundamentais para a estruturação de quase todos os ecossistemas costeiros e oceânicos. A principal utilização de microalgas em aquicultura é como fonte nutricional, podendo ser utilizada ao natural ou adicionada a rações. Também é utilizada para aumentar a coloração da carne em salmonídeos ou ainda induzir outras atividades metabólicas. O conteúdo proteico é o principal componente avaliado na seleção de microalgas para ração animal. Porém, quando selecionadas para o consumo *in natura*, especialmente na fase larval de organismos aquáticos, devem também apresentar tamanho e forma adequados para serem ingeridas. Ainda são critérios desejáveis para a produção de microalgas para consumo animal a facilidade de cultivo e a inexistência de metabólitos produzidos pelas microalgas que possam apresentar um efeito tóxico nestes animais (LOURENÇO, 2006; SPOLAORE et al., 2006).

O uso de microalgas na suplementação de rações de animais de estimação e também de pecuária tem aumentado significativamente nos últimos anos. Além das propriedades nutricionais das microalgas, já elencadas no caso do consumo humano, efeitos como melhoria da pele e do pelo de animais de estimação foram relatados, certamente pelos mesmos efeitos nutracêuticos já descritos para humanos. No caso de rações para animais de criação, 5 a 10% de fonte proteica podem ser de microalgas, sem nenhuma consequência adversa para os animais. Concentrações superiores a estas, em longo prazo, podem acarretar algumas alterações como as relatadas no padrão de coloração da pele de galinhas e da gema do ovo (SPOLAORE et al., 2006).

### 12.4.3 Biocombustíveis: biodiesel, bio-hidrogênio e biomassa

Tanto rações animais como biocombustíveis têm como matéria-prima principal produtos da agricultura. Este é um dos principais aspectos em que se baseiam os críticos do uso de biocombustíveis, i.e., a competição por terras agriculturáveis que deveriam prioritariamente ser destinadas a produzir alimento humano. O aumento da demanda global por combustíveis oriundos de fontes renováveis, motivado por isenções fiscais, alavancou muitas iniciativas nos setores privado e federal, objetivando a produção de biocombustíveis, particularmente no Brasil, Estados Unidos da América e Europa (ERIKSEN, 2008). Em termos globais, o biodiesel europeu representou 43% da produção mundial em 2011, sendo o maior produtor mundial de biodiesel, de acordo com o Departamento de Energia dos Estados Unidos da América. A produção total de biodiesel na Europa, em 2016, foi de 11.576.000 ton (EUROPEAN BIODIESEL BOARD, 2016). A produção de biodiesel no Brasil foi de 21.695.452 barris equivalentes de petróleo (3.449.576.888 L ~ 4.311.971 ton) em 2014 (AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS, 2015). No Brasil, o Programa Nacional de Produção de Biodiesel foi criado em 2004 e com objetivos definidos por lei (BRASIL, 2005), tendo concretizado o primeiro uso de 2% de biodiesel no óleo diesel em 2009, e então de 5% em 2012-13, atingindo em 2014 o percentual de 7% (AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS, 2015). É interessante ressaltar outras vantagens que resultam do uso do biodiesel, tais como aumento de empregos e coprodutos úteis obtidos durante o processamento desse novo combustível tais como cerca de 110 kg de glicerina para cada tonelada de biodiesel (BEHR et al., 2008). Essas iniciativas requerem novos desenvolvimentos na tecnologia de biocombustíveis.

Segundo Chisti (2007), algumas microalgas chegam a ter 70% de lipídio em sua estrutura e são capazes de produzir mais de 30 vezes a quantidade de óleo (por ano e por unidade de área de terra) quando comparada com as culturas de oleaginosas. Isto se deve ao fato de terem a duplicação da biomassa em intervalo de tempo muito curto, a utilização de um espaço físico menor, a capacidade de serem cultivadas em zonas não apropriadas para a agricultura e a menor geração de resíduo. O grande desafio é purificar a porção lipídica com as propriedades adequadas para uso como biodiesel. Este processo ainda requer um custo energético maior do que a energia gerada.

A fim de buscar maior rendimento visando à viabilidade econômica de um sistema energético à base de microalgas, pode-se incluir a geração de hidrogênio a partir de fotobiorreatores como os mostrados na Figura 2. O desenvolvimento do processo de separação temporal da fotossíntese normal (evolução para  $O_2$ ) da produção de  $H_2$  em algas verdes, permite, hoje, a produção sustentável de gás hidrogênio fotobiológico. A base para esse método foi a diminuição específica, mas reversível da evolução do oxigênio na alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* sem afetar a taxa de respiração



mitocondrial. Isso foi obtido pela privação de nutrientes sulfurados do meio de cultivo das algas, i.e., em culturas seladas. Assim, foi possível a fotoprodução de  $H_2$  pelas algas acumulando grandes quantidades de  $H_2$  na forma de bolhas produzidas diretamente no meio de cultura. Este método serviu como importante ferramenta de teste e melhoria da produção de hidrogênio de algas verdes, bem como para o uso em sistemas integrados (MELIS; MELNICKI, 2006). Cabe lembrar que o hidrogênio é considerado o combustível do futuro, pois é renovável, sua fonte é inesgotável e não gera nenhum poluente, além de possuir alta capacidade energética.

É importante destacar que há poucos trabalhos na literatura relacionados à análise de ciclo de vida de processos que utilizam algas como fonte de biomassa para geração de energia. Clarens et al. (2010) publicaram um dos trabalhos mais importantes e informativos dos encontrados na literatura. Nesse estudo, foram determinados os impactos associados à produção de algas usando um modelo de ciclo de vida estocástico e compararam com outras culturas terrestres (canola, milho e gramíneas) e os resultados indicaram que as culturas terrestres têm menores impactos ambientais do que as algas no uso de energia, emissões de gases do efeito estufa e água, independentemente do local de cultivo. Somente em ocupação total de área e potencial eutrófico, as algas foram superiores segundo os autores. Estes resultados trazem controvérsia e mostram, portanto, os grandes obstáculos a serem vencidos para viabilizar o uso de microalgas para geração de energia, principalmente em escala industrial, como se propõem os grupos de pesquisa e países que buscam essa tecnologia. O artigo analisou somente o processo de lagoas de cultivo e, para as culturas terrestres, a partir dos campos de cultivo até a geração da biomassa, i.e., sem considerar muitas cogerações possíveis. Um sistema de cogeração, ou seja, um processo combinado formando mais de um tipo de produto, deverá ser a resposta para um sistema energético sustentável à base de microalgas.

A análise do ciclo de vida dos sistemas fechados de produção de biomassa de microalgas por meio do cultivo em fotobiorreatores tubulares compactos em escala industrial, conforme mostrado na Figura 2, para fornecimento de biocombustíveis e geração de eletricidade (SILVA et al., 2015) demonstrou que: i) a utilização de PVC e aço devem ser minimizadas para reduzir o impacto ambiental e aumentar a sustentabilidade, ii) o uso do cultivo em sistemas fechados tem potencial de causar menos impacto que os sistemas de cultivo aberto pela baixa necessidade de área e produção de alta densidade celular. Outra recomendação desse estudo consiste no uso de águas degradadas, como efluentes agroindustriais, para utilização das microalgas como fonte de nutrientes.

Uma análise técnica e econômica dos biocombustíveis de microalgas pode ser realizada a partir dos grandes investimentos feitos por vários países recentemente.

Por uma perspectiva política e de investimento, importantes conclusões podem ser tiradas. Inicialmente, observa-se que houve crescimento de aproximadamente 400% no investimento mundial em biocombustíveis de microalgas no período de 2006 a 2008 (HUGGETT, 2008), e que continuou a aumentar até os dias de hoje, o que é bastante significativo. Assim, era de se esperar que resultados concretos, dos pontos de vista tecnológico e econômico para o uso desses biocombustíveis em futuro próximo, já estivessem disponíveis. Isso levanta a questão do porque isso ainda não ocorreu. Stephens et al. (2010) apresentam dois argumentos para tentar responder a essa pergunta: i) as plantas-piloto e de demonstração ainda estão abaixo da escala de viabilidade econômica, e ii) não houve tempo suficiente para a indústria evoluir por meio da injeção de capital recente para a produção comercial em larga escala.

Waltz (2009) conduziu trabalho investigativo junto aos maiores investidores mundiais em pesquisa para obter biocombustível de microalgas, que juntos somavam US\$ 565 milhões, os quais expressaram a opinião de que dados de laboratório têm sido extrapolados inapropriadamente. Em escala laboratorial, existem várias tecnologias disponíveis, tanto para o cultivo como para o processamento da biomassa, porém a experiência prática no desenvolvimento de sistemas de maior porte mostra que não há tempo a perder para identificar os problemas e apresentar soluções científicas que viabilizem a produção em larga escala de biocombustível de microalgas, tornando-a competitiva com outros combustíveis, por meio, por exemplo, da geração de produtos de alto valor agregado no processo.

## **12.5 Aplicações indiretas das microalgas**

Como aplicações indiretas das microalgas, pode-se citar o sequestro de carbono, tratamento de resíduos, entre outras (biossensores, biofertilizantes).

### **12.5.1 Sequestro de carbono**

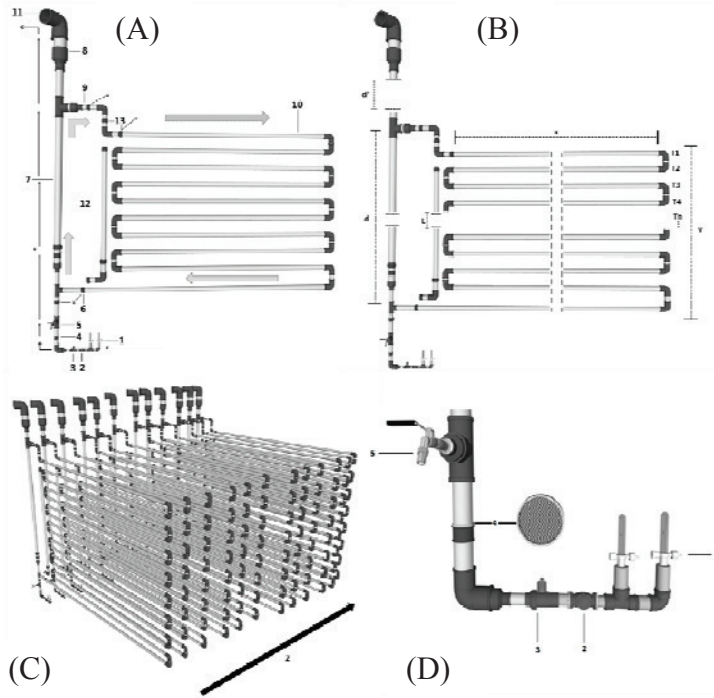
Para reduzir a quantidade de dióxido de carbono emitida para a atmosfera existem duas possibilidades: a primeira é a redução das emissões e a segunda é a absorção do dióxido de carbono produzido em excesso, também denominado como sequestro de carbono. As microalgas podem colaborar para diminuir essas emissões de CO<sub>2</sub> na atmosfera, pois o CO<sub>2</sub> é aporte necessário ao processo de fotossíntese. As microalgas são as principais responsáveis pela absorção biológica

do CO<sub>2</sub> atmosférico nos oceanos, que cobrem 3/4 da superfície do globo terrestre, uma vez que estão presentes em grande quantidade na superfície dos oceanos. Uma parte do CO<sub>2</sub> absorvido pelas microalgas é transferida para o fundo oceânico num processo conhecido como ‘bomba biológica’. Este processo, juntamente com a difusão direta do CO<sub>2</sub> para a água, impede que o acúmulo de gases do ‘efeito estufa’ seja ainda maior.

A capacidade de fixação biológica de CO<sub>2</sub> pelas microalgas apresenta ainda grande potencial de aplicação biotecnológica. Recentemente foi desenvolvido um sistema integrado para tratamento de emissões e efluentes simultaneamente (VARGAS et al., 2013). Esse equipamento consiste em fotobiorreator tubular modular para o cultivo de microalgas capaz de funcionar em modo batelada, semicontínuo ou contínuo. Nas condições de operação para as quais o equipamento foi desenvolvido, as microalgas contribuem para a remoção de poluentes tais quais fontes de nitrogênio e fosfato, bem como CO<sub>2</sub> e NO<sub>x</sub> presente nas emissões. O sistema pode ser usado de forma integrada ao tratamento de resíduos animais em sistemas produtivos agrícolas, tais como a suinocultura e bovinocultura, tratando os efluentes de biodigestores e purificando o biogás pela remoção de CO<sub>2</sub>. O sistema é capaz de: i) agregar valor ao tratamento dos resíduos pela produção de biomassa de microalgas, ii) fornecer biogás com teores de metano maiores que 95%, iii) fornecer água Conama, classe 3 (CONAMA, 2005), iv) fixar o CO<sub>2</sub> proveniente do uso do biogás em sistemas geradores de eletricidade. A característica modular do equipamento, conforme mostra a Figura 3, permite diversas configurações possíveis para atender diferentes demandas da indústria. Uma característica dos fotobiorreatores desenvolvidos consiste na presença de um sistema de trocas gasosas, compacto e eficiente e, dessa forma, podem ser aplicados para a fixação de CO<sub>2</sub> de diversos processos industriais como sistemas de incineração, grupos geradores, cimenteiras, entre outros.

### 12.5.2 Tratamento de resíduos

Outra aplicação das microalgas é no tratamento de águas residuais. As águas residuais que resultam das atividades humanas incluem detergentes, óleos, pesticidas e metais pesados, entre outros constituintes. Estes compostos são substâncias consideradas perigosas, pela sua alta toxicidade e devem ser retirados do meio ambiente. As microalgas fornecem O<sub>2</sub> às bactérias, tornando a sua atividade de degradação biológica mais eficiente, removem nutrientes, como nitrogênio e fósforo, responsáveis pelos processos de eutrofização de meios hídricos, além de removerem alguns metais pesados e micro-organismos patogênicos.



**Figura 3** - Sistema de tratamento de efluentes e emissões pelo cultivo de microalgas em fotobiorreatores tubulares compactos e modulares: (A) Desenho de um módulo, (B) Dimensões ajustáveis de cada módulo, (C) Visão de um arranjo de reatores arranjados de modo compacto, (D) Detalhes do sistema de injeção de ar e gases.

Fonte: Os autores.

Os processos produtivos são carentes de metodologias eficientes para tratamento de efluentes. Infelizmente, na maior parte das vezes, os resíduos são descartados diretamente nos corpos hídricos provocando grandes problemas ambientais. A produção de proteína animal acarreta em grandes produções de resíduos pelo alto adensamento das unidades produtivas. O Brasil tem produzido acima de três mil toneladas de carne suína por ano, ocupando a posição de quarto produtor mundial. Em média, um animal entre 25 e 100 kg produz cerca de 7 kg de dejetos por dia e quando se considera que o rebanho brasileiro de suínos atingiu, em 2013, a marca de 36,7 milhões de cabeças pode-se ter uma ideia da quantidade de resíduos produzida (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL, 2015). O dejetos suíno é um dos resíduos agroindustriais mais poluentes existentes, e caso não seja processado adequadamente, as altas concentrações de matéria orgânica, fósforo e nitrogênio podem causar inúmeros problemas como a contaminação de solos e mananciais subterrâneos, volatilização de amônia e degradação de solos férteis devido à superfertilização dos mesmos (KRAPAC

et al., 2002). O recomendado para o tratamento desse material consiste no uso de biodigestores para redução da carga orgânica e aproveitamento do biogás. Entretanto, o efluente do biodigestor apresenta altas cargas de nitrogênio e fósforo total cujo destino adequado ainda é uma incógnita.

As microalgas são capazes de tratar com eficiência o resíduo altamente poluente da suinocultura, bem como outros resíduos agroindustriais. O rápido crescimento das microalgas em sistemas de cultivo permite o rápido aproveitamento dos nutrientes presentes no meio de cultivo fornecendo ao final do processo a biomassa de microalgas e água tratada (TAHER, 2013).

### 12.5.3 Outras aplicações de microalgas

As microalgas podem ainda ser utilizadas como biossensores para a avaliação de contaminação em ambientes aquáticos. Ferro et al. (2012) selecionaram três microalgas para uso como bioindicadores de toxicidade: *Chlorella vulgaris*, *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlamydomonas reinhardtii*. Estas microalgas foram imobilizadas em hidrogéis de alginato e sílica e expostas a várias concentrações do herbicida atrazina. Alterações celulares foram detectadas e os autores propõem a utilização deste sistema para monitorar bacias hidrográficas próximas de ambientes com alta incidência de utilização de herbicidas como a atrazina e outros agrotóxicos.

Biofertilizantes estão sendo desenvolvidos a base de microalgas, especialmente para culturas de agricultura intensiva. Recentemente a empresa Bioalgal Marine, *spin-off* da Universidade de Almería, na Espanha, lançou no mercado um produto denominado Algefert, que é a mistura da microalga *Spirulina*, água e enzimas. A referida mistura é aquecida e, ao atingir certa temperatura, rompe as microalgas e libera aminoácidos. Quando este fertilizante é fornecido à planta, seu crescimento ocorre muito mais rápido (FLORES, 2008).

Considerando a diversidade biológica das microalgas e as espécies ainda desconhecidas, certamente novos produtos e novas aplicações a base de microalgas serão descritos no futuro.

## 12.6 Melhoramento genético

Atingindo-se as condições ótimas de cultivo das microalgas, o aumento da produtividade de biocombustíveis, biomassa ou qualquer outro bioproduto só

poderá ser atingido com o melhoramento genético destes organismos. Desde os tempos primitivos, o homem tem procurado os melhores recursos disponíveis para sustentar a vida humana no planeta. Desenhos rupestres de civilizações antigas confinando gado e selecionando os melhores indivíduos para obter a melhor prole possível confirmam que o melhoramento genético era executado intuitivamente por seres humanos, muito antes de qualquer conhecimento formal de genética e hereditariedade. O potencial de melhoramento genético das microalgas é enorme, há muitos esforços neste sentido, e nas últimas décadas muitos avanços foram alcançados.

O melhoramento genético de micro-organismos antes da era -ômica: era realizado exclusivamente pela seleção de melhores isolados na natureza, seleção de mutantes espontâneos, obtenção de mutantes com o uso de agentes mutagênicos como a luz ultravioleta e o ácido nitroso, e ainda mecanismos de recombinação, como o ciclo sexual, para combinar características favoráveis em uma mesma linhagem. O caso de maior sucesso de melhoramento genético de um micro-organismo utilizando estas técnicas, denominadas de clássicas, foi a produção de penicilina a partir do isolado fúngico de *Penicillium notatum* de Fleming. A seleção de cepas melhores isoladas na natureza (*P.chrysogenum*) e basicamente a seleção de mutantes espontâneos ou induzidos com o uso de agentes mutagênicos físicos e químicos gerou aumento sem precedentes na produção de penicilina durante os mais de 60 anos de aplicação destas estratégias de melhoramento genético. Após o sequenciamento do genoma deste fungo (VAN DEN BERG et al., 2008), cepas industriais foram comparadas com linhagens selvagens e, apesar de vários mutantes apresentarem modificações em genes diretamente relacionados à síntese de penicilina, outras modificações genéticas foram selecionadas ao longo destas décadas de melhoramento genético. Este conhecimento abriu novas possibilidades de melhoramento genético para a produção de penicilina, porém, desta vez por estratégias de engenharia genética. Com este modelo foi possível verificar que muitas vezes alterações em genes indiretamente relacionados a um produto podem resultar em ganho de produtividade. Esta estratégia poderá ser aplicada para microalgas.

As ferramentas de engenharia genética disponíveis para outros organismos como fungos e plantas foram adaptadas para microalgas, e um número quase ilimitado de alternativas de melhoramento genético utilizando estas ferramentas pode ser realizado atualmente. Estas técnicas permitem a transformação genética do DNA presente no núcleo (no caso das microalgas eucarióticas), e também do DNA presente nos cloroplastos e nas mitocôndrias. Estratégias incluindo o aumento do número de cópias de um gene, aumento ou diminuição da expressão de um ou mais genes, e ainda a expressão de genes heterólogos, selecionados a partir de

outras espécies, são possíveis para várias espécies de microalgas. Basicamente, deve-se fazer a clonagem do DNA de interesse em vetores a serem inseridas em microalgas, seguido de seleção dos transformantes através de meios seletivos (SPECHT; MIYAKE-STONER; MAYFIELD, 2010).

Uma variedade de métodos de transformação tem sido usada para transferir DNA para as células de microalgas, incluindo agitação na presença de pérolas de vidro ou cristais de carboneto de silício para permitir a permeabilidade da parede celular, a eletroporação, a biobalística e a transferência mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. A eficiência da transformação é dependente da espécie e do método de transformação utilizado para cada microalga. Em muitos casos, a transformação resultou em expressão estável do gene alvo, tanto do núcleo como das mitocôndrias ou dos cloroplastos. O sucesso na transformação genética tem sido relatado para algas verdes (Chlorophyta), vermelhas (Rhodophyta) e pardas (Phaeophyta); para diatomáceas (Chrysophyta); euglenas (Euglenophyta) além das algas azuis (Cyanophyceae) (RADAKOVITS et al., 2010).

O conhecimento gerado pelo sequenciamento do genoma de algumas espécies de microalgas, como *Chlamydomonas reinhardtii* (MERCHANT et al., 2007), considerada um organismo modelo em biologia, permitiu maior conhecimento dos processos biológicos complexos, incluindo aqueles relacionados à produção de biocombustíveis como o bio-hidrogênio. Alguns genes-alvo foram identificados e selecionados para o melhoramento genético (DUBINI; GHIRARDI, 2015), mas outros genes relacionados com a produção de hidrogênio ainda são desconhecidos (TOEPEL et al., 2013). Todos os três genomas (cloroplasto, mitocondrial e nuclear) podem ser transformados em *Chlamydomonas*, e cada um tem particularidades que os tornam distintos (SPECHT; MIYAKE-STONER; MAYFIELD, 2010). Além disso, a vantagem de possuir um ciclo sexual bem conhecido e rápido, que leva cerca de duas semanas, permite a combinação de mutações favoráveis em uma estirpe de *Chlamydomonas*, por meio de metodologia de genética clássica. As modificações genéticas são consideradas atualmente a grande promessa que poderá levar a um cenário economicamente viável para a produção de energia limpa e bioprodutos por microalgas.

## 12.7 Modelagem matemática e simulação computacional

A dificuldade de obtenção do combustível renovável (e.g., etanol, biodiesel) em comparação com o combustível fóssil, obtido diretamente por extração mineral, requer a previsão de sistemas eficientes energeticamente para atender à

demanda energética, que reduzam a demanda de combustível para realizar seus propósitos. Os sistemas de cogeração, trigeração ou multigeração visam atingir esse objetivo. A melhoria, otimização e controle de sistemas desse tipo é um aspecto crucial para a obtenção de bons resultados. Uma análise teórica de um sistema energético, para ser confiável, deve ser capaz de capturar os aspectos ‘realísticos’ dos processos de transferência de calor e massa que ocorrem na instalação. Vários estudos modelaram esses aspectos usando o método da minimização da geração da entropia ou otimização exergética (VARGAS; PARISE, 2000; MATOS et al., 2004), que busca modelos matemáticos realísticos que levam em consideração as irreversibilidades dos escoamentos e dos processos de transferência de calor e massa. Portanto, a modelagem matemática e simulação computacional de um sistema energético se constitui em uma etapa vital para acessar o potencial de aplicação do sistema antes da realização de investimentos financeiros.

O fluxograma mostrado na Figura 4 apresenta uma metodologia que tem sido largamente utilizada para a modelagem matemática dinâmica de sistemas físicos (DILAY et al., 2015). Primeiramente escolhe-se o tipo de modelagem a adotar (ordem alta: dependência espacial e temporal, ordem baixa: dependência temporal apenas ou ordem reduzida: modelo intermediário) e identifica-se o sistema físico que será estudado (existente ou hipotético) na etapa 1. Na etapa 2, é feita uma síntese, em que são adotadas hipóteses simplificadoras a fim de reduzir a um mínimo a complexidade matemática do modelo, porém sem deixar de captar os fenômenos físicos principais responsáveis pela ocorrência do processo ou funcionamento do equipamento, em que é necessária a percepção ou ‘arte’ do modelador. Na etapa 3, é desenvolvido um modelo matemático com base nas hipóteses adotadas e nas leis físicas que governam o sistema, resultando em um conjunto de equações algébricas, diferenciais ordinárias ou parciais. Na etapa 4, decide-se quais serão as incógnitas e os parâmetros do modelo matemático, verificando se é possível uma solução analítica e, caso negativo, decide-se sobre qual método numérico será utilizado para obter a solução do equacionamento. Na etapa 5, decide-se sobre o código computacional a ser empregado para a implementação do método numérico, que pode ser um programa computacional próprio, ou um aplicativo pré-existente, que permitirá a simulação do sistema. A etapa 6 é a de ajuste e validação experimental do modelo, nesta ordem, que permite verificar a precisão dos resultados e, conseqüentemente, seu uso prático posterior como ferramenta de simulação. A etapa 7 consiste da aplicação do modelo, verificando se o equipamento ou processo atende aos objetivos inicialmente propostos através da análise de desempenho, paramétrica, e resposta dinâmica, tal que em caso negativo, o sistema seja repensado e um novo



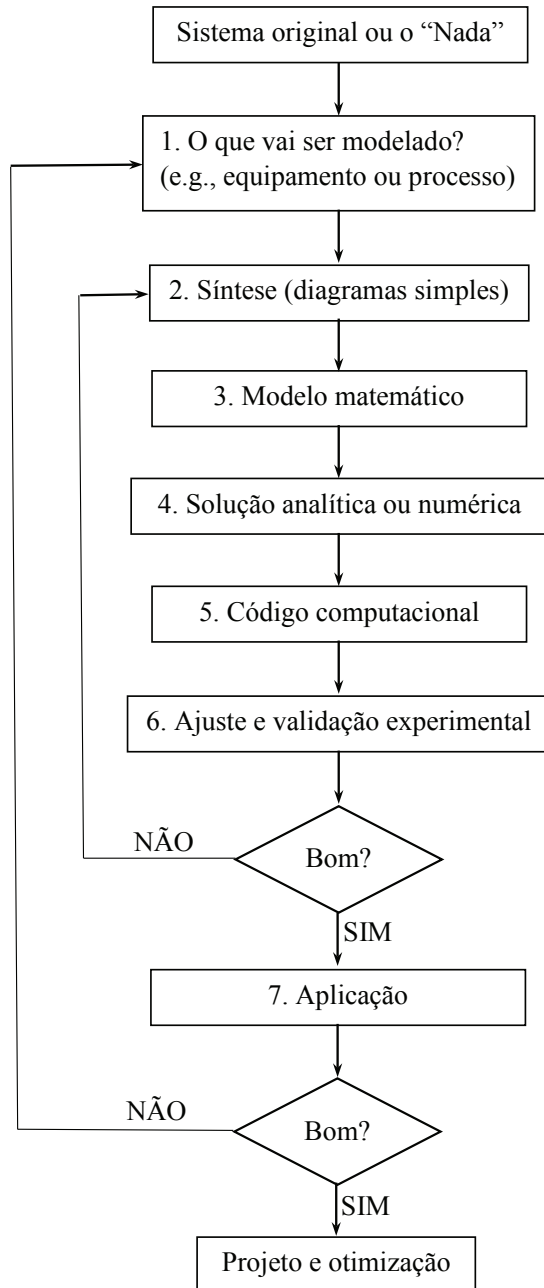
modelo seja escrito, e em caso positivo, o modelo estará pronto para uso em projeto, controle e otimização.

Generalizando, um modelo matemático é concebido para permitir simular a resposta ou comportamento de um sistema real em um computador, que permite calcular a distribuição espacial e temporal de uma grandeza física qualquer dentro do sistema físico em estudo (e.g., temperatura, umidade relativa, concentração de espécies). Estas distribuições são determinadas pelas condições do ambiente externo, fluxo de fluidos, geometria do sistema físico, e termos de geração interna do sistema.

Muitos modelos matemáticos para prever o crescimento de microalgas em fotobiorreatores têm sido propostos (XU; BOEING, 2014). Como exemplo de avanço recente, cita-se um modelo matemático apresentado por Kava-Cordeiro e Vargas (2015) para contemplar inclusive a possibilidade de modificação genética em microalgas para melhorar algum aspecto de interesse (e.g. aumento de conteúdo lipídico, produção de bio-hidrogênio).

## **12.8 Produção de microalgas em larga escala: Principais espécies de microalgas em uso industrial**

Dentre as espécies de microalgas mais utilizadas no mundo podem ser citadas: *Chlorella* sp. e *Spirulina* utilizadas como nutracêuticos; *Dunaliella salina* como fonte de caroteno; *Haematococcus pluvialis* para produção comercial de astaxantina e *Scenedesmus* sp. para tratamento de efluentes e biorremediação (AZEREDO, 2012; BOROWITZKA, 2013).



**Figura 4** - Fluxograma para modelagem e simulação de sistemas físicos  
fonte: Dilay et al. (2015).

### 12.8.1 *Scenedesmus* sp.

A microalga eucariótica *Scenedesmus* sp., encontrada em praticamente todos os tipos de água doce, é amplamente utilizada na produção de biomassa e na biorremediação de efluentes. Esta espécie tem demonstrado extraordinária vitalidade nas águas residuais urbanas, registrando taxas de crescimento semelhantes às relatadas por meio sintético completo. Tolerantes diferentes níveis de temperatura e de pH, tornando-se versáteis para a purificação de águas residuais. Entre as microalgas, esta espécie apresenta diversas características desejáveis para a combinação eficiente e econômica da fixação de CO<sub>2</sub>, tratamento de efluentes e síntese de lipídeos para a produção de biocombustíveis (TANG et al., 2011).

### 12.8.2 *Spirulina*

Espécies de *Spirulina*, que são cianobactérias, têm sido amplamente utilizadas na suplementação alimentar humana e animal, assim como na obtenção de compostos utilizados em fórmulas farmacêuticas. Esta microalga é rica em proteínas, vitaminas, aminoácidos essenciais, minerais, ácidos graxos polinsaturados e outros nutrientes. Ela cresce em água com níveis alcalinos de pH, e pode ser facilmente recolhida e processada. Esta espécie ganhou popularidade significativa na indústria de alimentos em muitos países da Ásia, sendo utilizada como suplemento alimentar. Uma das principais barreiras para a produção de *Spirulina* é o custo e disponibilidade dos nutrientes. Contudo, existe a alternativa de usar fontes de nutrientes orgânicos, especialmente a partir de efluentes (BOROWITZKA, 2013).

### 12.8.3 *Chlorella* sp.

A microalga *Chlorella* é um organismo unicelular, esférico com 2,0 - 10,0 µm de diâmetro. Esta microalga é encontrada tanto em água doce de lagoas e lagos quanto em ambiente salino. Elas também são encontradas em solo úmido ou outras situações úmidas, como a superfície de troncos de árvores, potes de água e paredes úmidas. As aplicações desta espécie vão desde a alimentação humana para aplicações em viagens espaciais até a geração de bioenergia. Illman, Scragg e Shales (2000) estudaram a composição de cepas de *Chlorella* sp. cultivadas em meio com baixa concentração de nitrogênio e concluíram que essas microalgas podem ser utilizadas como fonte de matéria-prima para produção de biodiesel. Xu, Miao e Wu (2006) também obtiveram sucesso na produção de biodiesel a partir de cultivos de *Chlorella* sp.

### **12.8.4 *Dunaliella salina***

*Dunaliella salina* é uma microalga marinha verde, fonte natural de antioxidantes como  $\beta$ -caroteno e luteína, que tem sido utilizada como suplemento alimentar com função nutracêutica. O  $\beta$ -caroteno produzido a partir de *D. salina* foi o primeiro produto de alto valor agregado a ser comercializado (BOROWITZKA, 2013). Em condições ambientais extremas, com a limitação de nutrientes, baixas temperaturas, aumento da intensidade de luz, ou altas concentrações de sal, essa espécie apresenta alterações morfológicas e bioquímicas concomitantes com suas estratégias de sobrevivência (GÓMEZ; GONZÁLEZ, 2005).

### **12.8.5 *Haematococcus pluvialis***

*Haematococcus pluvialis* é uma microalga verde unicelular biflagelada que em condições de estresse acumula astaxantina e lipídeos em grandes concentrações (GRÜNEWALD; HIRSCHBERG; HAGEN, 2001). Diversos estudos sobre a produção de ácidos graxos e de astaxantina a partir de *H. pluvialis* já foram realizados (BOROWITZKA, 2013). A capacidade desta microalga de sobreviver em uma ampla gama de condições ambientais, juntamente com a sua capacidade de modificar de maneira eficaz o seu metabolismo lipídico em resposta a diferentes condições de cultura, a torna um organismo interessante quando o foco é a produção de biomassa. As células vegetativas desta espécie crescem de maneira ótima mesmo com baixa irradiação.

## **12.9 Cultivo de microalgas em larga escala: Sistemas de produção**

As microalgas podem ser cultivadas em diferentes sistemas, em volumes que variam desde poucos litros até bilhões de litros. Para viabilizar qualquer processo de cultivo de microalgas em larga escala, destaca-se a necessidade de um sistema com elevada produtividade por área ocupada, baixo custo de instalação e de operação. Para desenvolver tal sistema, é necessário compreender o processo de cultivo de microalgas e conhecer os principais sistemas existentes. A biodiversidade destes organismos representa uma importante característica tecnológica, possibilitando o cultivo de diferentes gêneros e espécies em uma ampla faixa de condições operacionais. Em geral, os sistemas de produção são pouco sofisticados, com sistemas de cultivo a céu aberto em tanques com fundo de terra e com baixo ou nenhum controle dos parâmetros ambientais.

Recentemente equipamentos específicos, denominados fotobiorreatores (FBR), foram desenvolvidos para o cultivo de microalgas nos quais é possível algum controle dos parâmetros de crescimento. Estes sistemas têm apresentado elevada produtividade, viabilizando a produção em larga escala de microalgas. Definem-se fotobiorreatores como sistemas utilizados para o desenvolvimento de reações fotossintéticas, baseando-se em processos naturais em que o metabolismo fotossintético dos microorganismos converte energia solar, água e  $\text{CO}_2$  em produtos como oxigênio, hidrogênio, lipídios, carboidratos e proteínas. Consequentemente, estes processos necessitam de sistemas de iluminação, trocadores de gases (adição de  $\text{CO}_2$  e remoção de  $\text{O}_2$ ), adição de nutrientes e até controle de temperatura, dependendo das condições ambientais.

Os fotobiorreatores fechados oferecem ótima estrutura, pois são caracterizados por elevada eficiência fotossintética associada a um preciso controle das variáveis operacionais, com destaque para menor risco de contaminação, e permitem a manutenção de um ambiente físico-químico estável com controle de evaporação, pH e nutrientes. Considerando a utilização de microalgas geneticamente modificadas, os FBRs são o sistema mais adequado, pois minimizam o risco de contaminação biológica do ambiente por estes organismos. Além disso, os FBRs podem ser instalados em terras degradadas ou até mesmo em desertos, bastando apenas que haja luz, nutrientes, gás carbônico e água, que pode ser até mesmo salgada ou imprópria para consumo humano ou animal.

Por outro lado, a construção dos FBRs fechados apresenta custos mais elevados do que lagoas de cultivo, por exemplo, uma vez que necessitam de materiais transparentes, são mais complexos operacionalmente e são de difícil escalonamento. Há a necessidade ainda de muita pesquisa e desenvolvimento a fim de aperfeiçoar e melhorar os sistemas existentes para que sejam aplicados em escala industrial. Alguns desafios técnicos são aumentar a velocidade de fotossíntese e de produtividade de biomassa, reduzir os danos celulares devido a estresse hidrodinâmico, bem como reduzir os custos de fabricação, operação e manutenção dos FBRs.

### **12.10 Questões comerciais associadas à produção de microalgas**

A questão de produção comercial consiste principalmente em capital inicial de investimento. Partindo-se de um cenário de produção de biomassa de microalgas a partir de vários fotobiorreatores, a escala de produção admite a utilização de equipamentos mais eficientes para a realização da separação da biomassa e processamento sequencial. O acoplamento de operações unitárias permite a seleção de equipamentos com menor valor de capital, menor consumo energético e menor custo de manutenção.

Atualmente, produzir biodiesel de soja apenas não viabiliza a produção do biocombustível. Quando se considera toda a cadeia produtiva da soja percebe-se que é possível obter lucro com a comercialização do biodiesel de soja em complementação à produção de farelo. Para as microalgas a realidade é a mesma. Somente o biodiesel de microalgas não vai sustentar um empreendimento como esse. Contudo, vale ressaltar que o biodiesel será a menor fonte de renda para a cadeia produtiva das microalgas. Os lipídeos acumulados pelas microalgas são classificados de acordo com o número de carbono. Ácidos graxos com cadeia de 14-20 carbonos são utilizados na produção do biodiesel, enquanto aqueles com cadeias maiores são usados como suplementos alimentares como, por exemplo, o ácido eicosapentaenoico (EPA) e o ácido docosaenoico (DHA) (YEN et al., 2013).

Além dos lipídeos, as microalgas possuem outros metabólitos de valor agregado como, por exemplo, carboidratos, proteínas e pigmentos que podem ser refinados e comercializados com diferentes aplicações. Os carboidratos são um dos compostos das microalgas com maior importância (YEN et al., 2013). Esses compostos possuem alto valor agregado, com diversas aplicações nas indústrias alimentícias, cosméticas, têxteis, lubrificantes, entre outras (ARAD; LEVY-ONTMAN, 2010). Alguns exemplos são a comercialização de suplementos alimentares à base de *Chlorella* e *Spirulina* (US\$ 10 - 50/kg),  $\beta$ -caroteno (US\$ 320 - 3.200/kg), ficobiliproteínas (US\$ 16/mg), astaxantina (US\$ 10.000/kg), óleo rico em ácido docosahexaenoico (US\$ 60/g), entre outros. Desta forma, deve-se explorar toda a potencialidade fornecida pela biomassa de microalgas. Além disso, outro ponto muito importante a respeito dos biocombustíveis é o custo do petróleo. Sempre que a cotação do barril estiver baixa, as vantagens econômicas dos combustíveis renováveis diminuem.

### 12.11 Conclusões

Baseado na argumentação apresentada ao longo deste capítulo, no momento atual de possível futura escassez de recursos energéticos e alimentares para manter os padrões de vida da sociedade humana, é razoável pensar que as microalgas poderão trazer possível solução para um mundo sustentável. Enfim, elas foram os organismos que transformaram as condições inóspitas de nosso planeta em um ambiente favorável à vida como a conhecemos atualmente. De fato, as microalgas se reproduzem rapidamente, são as maiores fixadoras de CO<sub>2</sub> do planeta, e estão na base da cadeia alimentar. Elas geram enormes quantidades de biomassa, portanto, são os maiores armazenadores de bioenergia conhecidos, e têm o potencial para suprir a energia necessária à manutenção de uma sociedade humana sustentável, de forma

ambientalmente correta, por se tratar de energia renovável. Com a presença de sistemas multigeradores e de remediação ambiental acoplados ao cultivo de microalgas, espera-se ser possível um desempenho superior do uso de microalgas em comparação com culturas terrestres em todos os pontos de vista, bem como buscar tornar as microalgas comercialmente competitivas na produção de biocombustíveis e outros produtos de alto valor agregado. No entanto, não se trata de um objetivo fácil de ser atingido. Há grandes desafios tecnológicos a serem vencidos para viabilizar a utilização industrial das microalgas com todos os recursos que podem ser obtidos destes pequenos, porém versáteis organismos.

## Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **Brasil, produção nacional de biodiesel puro: B100 por produtor - 2005-2015** (barris equivalentes de petróleo). Rio de Janeiro, 2015.

ARAD, S.; LEVY-ONTMAN, O. Red microalgal cell-wall polysaccharides: biotechnological aspects. **Current Opinion in Biotechnology**, Amsterdam, v. 21, no. 3, p. 358-364, 2010.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatório anual 2015: produção mundial de carne suína**. Disponível em: < [http://abpa-br.com.br/files/RelatorioAnual\\_UBABEF\\_2015\\_DIGITAL.pdf](http://abpa-br.com.br/files/RelatorioAnual_UBABEF_2015_DIGITAL.pdf) >. Acesso em: 19 out. 2017.

AZEREDO, V. B. S. **Produção de biodiesel a partir do cultivo de microalgas: estimativa de custos e perspectivas para o Brasil**. 2012. 188 f. Dissertação (Mestrado em Planejamento Energético)-Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

BALDAUF, S. An overview of the phylogeny and diversity of eukaryotes. **Journal of Systematics and Evolution**, Xiangshan, v. 46, no. 3, p. 263-273, 2008.

BEHR, A. et al. Improved utilization of renewable resources: new important derivatives of glycerol. **Green Chemistry**, Cambridge, v. 10, no. 1, p. 13-30, 2008.

BLAS-VALDIVIA, V. et al. (2012). Microalgae of the Chlorophyceae Class: potential nutraceuticals reducing oxidative stress intensity and cellular damage. In: LUSHCHAK, V. (Ed.). **Oxidative stress and diseases**. Disponível em: <<http://cdn.intechopen>.

com/pdfs/35964/intech-microalgae\_of\_the\_chlorophyceae\_class\_potential\_nutraceuticals\_reducing\_oxidative\_stress\_intensity\_and\_cellular\_damage.pdf>.  
Acesso em: 12 jun. 2015.

BOROWITZKA, M. High-value products from microalgae: their development and commercialization. **Journal of Applied Phycology**, Netherlands, v. 25, no. 3, p. 743-756, 2013.

BRASIL. Presidência da República. Casa Civil. Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira; altera as Leis nºs 9.478, de 6 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de outubro de 1999 e 10.636, de 30 de dezembro de 2002; e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 jan. 2005.

CARVALHO, I. S. **Paleontologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2004. v. 1.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, Amsterdam, v. 25, no. 3, p. 294-306, 2007.

CLARENS, A. et al. Environmental life cycle comparison of algae to other bioenergy feedstocks. **Environmental Science & Technology**, Washington, D.C., v. 44, no. 5, p. 1813-1819, 2010.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 053, 18 mar. 2005. p. 58-63. Alterada pelas Res. n. 370, de 2006, nº 397, de 2008, nº 410, de 2009, e nº 430, de 2011, complementada pela Res. n. 393, de 2009.

DILAY, E. et al. A volume element model (VEM) for energy systems engineering. **International Journal of Energy Research**, New York, v. 39, no. 1, p. 46-74, 2015.

DUBINI, A.; GHIRARDI, M. Engineering photosynthetic organisms for the production of biohydrogen. **Photosynthesis Research**, Heidelberg, v. 123, no. 3, p. 241-253, 2015.

ERIKSEN, N. The technology of microalgal culturing. **Biotechnology Letters**, Heidelberg, v. 30, no. 9, p. 1525-1536, 2008.



EUROPEAN BIODIESEL BOARD. **The EU biodiesel industry statistics 2016**. Disponível em: <<http://www.ebb-eu.org/stats.php>> Acesso em: 19 out. 2017.

FERRO, Y. et al. Development of a biosensor for environmental monitoring based on microalgae immobilized in silica hydrogels. **Sensors**, Switzerland, v. 12, no. 12, p. 16879-16891, 2012.

FLORES, I. La biotecnología: futuro cierto. **Campus EBT**, Almeria, n. 2, 2008. Disponível em: <<http://cms.ual.es/idc/groups/public/@serv/@otri/documents/documento/documentorevistacampus2.pdf>>. Acesso em: 12 jun. 2015.

GOMEZ, P.; GONZALEZ, M. The effect of temperature and irradiance on the growth and carotenogenic capacity of seven strains of *Dunaliella salina* (Chlorophyta) cultivated under laboratory conditions. **Biological Research**, Santiago, v. 38, no. 2-3, p. 151, 2005.

GRÜNEWALD, K.; HIRSCHBERG, J.; HAGEN, C. Ketocarotenoid biosynthesis outside of plastids in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Biological Chemistry**, Maryland, v. 276, no. 8, p. 6023-6029, 2001.

HUGGETT, B. Investors temper interest in grain biofuels, focus on alternatives. **Nature Biotechnology**, New York, v. 26, no. 11, p. 1208-1209, 2008.

ILLMAN, A. M.; SCRAGG, A. H.; SHALES, S.W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. **Enzyme and Microbial Technology**, Amsterdam, v. 27, no. 8, p. 631-635, 2000.

KAVA-CORDEIRO, V.; VARGAS, J. V.C. Microalgae derived hydrogen production enhancement via genetic modification. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON HYDROGEN PRODUCTION, 6., 2015, Oshawa. **Proceedings...** Oshawa: University of Ontario Institute of Technology - UOIT, 2015. v. 1, p. 1-12.

KONUR, O. The scientometric evaluation of the research on the algae and bio-energy. **Applied Energy**, Amsterdam, v. 88, p. 3532-3540, 2011.

KRAPAC, I. G. et al. Impacts of swine manure pits on groundwater quality. **Environmental Pollution**, Amsterdam, v. 120, no. 2, p. 475-492, 2002.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa. 2006.

LUO, H.-P. et al. Analysis of photobioreactors for culturing high-value microalgae and cyanobacteria via an advanced diagnostic technique: CARPT. **Chemical Engineering Science**, Amsterdam, v. 58, no. 12, p. 2519-2527, 2003.

MATOS, R. S. et al. Optimally staggered finned circular and elliptic tubes in forced convection. **International Journal of Heat and Mass Transfer**, Amsterdam, v. 47, no. 6-7, p. 1347-1359, 2004.

MELIS, A.; MELNICKI, M. Integrated biological hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam, v. 31, no. 11, p. 1563-1573, 2006.

MERCHANT, S. S. et al. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. **Science**, Washington, D.C., v. 318, no. 5848, p. 245-250, 2007.

MUÑOZ, R. et al. Photosynthetically oxygenated salicylate biodegradation in a continuous stirred tank photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, Medford, v. 87, no. 6, p. 797-803, 2004.

ONO, E.; CUELLO, J. Carbon dioxide mitigation using thermophilic cyanobacteria. **Biosystems Engineering**, Amsterdam, v. 96, no. 1, p. 129-134, 2007.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 65, no. 6, p. 635-648, 2004.

RADAKOVITS, R. et al. Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production. **Eukaryotic Cell**, Washington, D.C., v. 9, no. 4, p. 486-501, 2010.

RAVEN, P.; EVERT, R.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

SATYANARAYANA, K.; MARIANO, A. B.; VARGAS, J. V.C. A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials. **International Journal of Energy Research**, New York, v. 35, no. 4, p. 291-311, 2011.

SILVA, A. G. et al. Life cycle assessment of biomass production in microalgae compact photobioreactors. **Global Change Biology Bioenergy**, New York, v. 7, no. 2, p. 184-194, 2015.

SPECHT, E.; MIYAKE-STONER, S.; MAYFIELD, S. Micro-algae come of age as a platform for recombinant protein production. **Biotechnology Letters**, Heidelberg, v. 32, no. 10, p. 1373-1383, 2010.

SPOLAORE, P. et al. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Amsterdam, v. 101, no. 2, p. 87-96, 2006.

STEPHENS, E. et al. An economic and technical evaluation of microalgal biofuels. **Nature Biotechnology**, New York, v. 28, no. 2, p. 126-128, 2010.

TAHER, D. M. **Biodiesel de microalgas cultivadas em dejetos suíno biodigerido**. 2013. 106 f. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

TANG, D. et al. CO<sub>2</sub> biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO<sub>2</sub> levels. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 102, no. 3, p. 3071-3076, 2011.

TOEPEL, J. et al. New insights into *Chlamydomonas reinhardtii* hydrogen production processes by combined microarray/RNA-seq transcriptomics. **Plant Biotechnology Journal**, New York, v. 11, no. 6, p. 717-733, 2013.

VAN DEN BERG, M. A. et al. Genome sequencing and analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. **Nature Biotechnology**, New York, v. 26, no. 10, p. 1161-1168, 2008.

VARGAS, J. V. C.; PARISE, J. A. R. Thermodynamic optimization of heat driven refrigerators in transient regime. **Heat Transfer Engineering**, London, v. 21, no. 1, p. 35-45, 2000.

VARGAS, J. V. C. et al. Patent Number(s): US2012088296-A1; WO2012050608-A1 – Photo-bioreactor for growing algae e.g. microalgae within nutrient medium, comprises support frame, horizontal bioreactor tubes, gassing/degassing housings, pH sensor, temperature sensor, and pump for circulating nutrient medium, 2012, Estados Unidos da América. US Patent and Trademark Office.

VARGAS, J. V. C. et al. Fotobiorreator tubular para tratamento integrado de efluentes líquidos e emissões. Depósito de pedido de patente BR1020130263958, 2013. Instituto Nacional da Propriedade Industrial, INPI, Brasil.

WALTZ, E. Biotech's green gold? **Nature Biotechnology**, New York , v. 27, no. 1, p. 15-18, 2009.

WOESE, C.; KANDLERT, O.; WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 87, no. 12, p. 4576-4579, 1990.

XU, Y.; BOEING, W. J. Modeling maximum lipid productivity of microalgae: review and next step. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, Amsterdam, v. 32, p. 29-39, 2014.

XU, H.; MIAO, X.; WU, Q. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 126, no. 4, p. 499-507, 2006.

YEN, H.-W. et al. Microalgae-based biorefinery - from biofuels to natural products. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 135, p. 166-174, 2013.



# Nanotecnologia e micro-organismos

---

Adriana Garcia, Luiz Fernando Cótica, Paula Nunes de Oliveira, Sandro Augusto Rhoden

## 13.1 Introdução

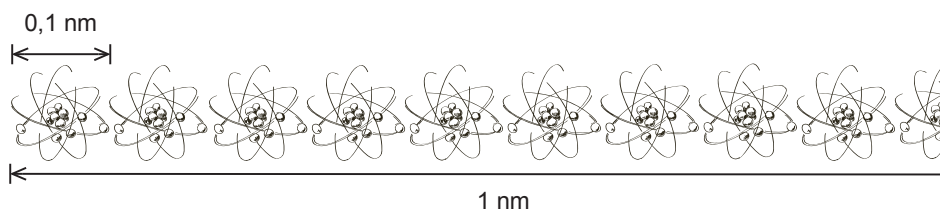
O prefixo ‘nano’, derivado do grego ‘nanos’ que significa ‘anão’, está se tornando cada vez mais comum na literatura científica. ‘Nano’ tornou-se um rótulo muito popular em grande parte da ciência moderna. Muitas palavras ‘nano’ surgiram recentemente, incluindo: nanômetros, nanoescala, nanociência, nanotecnologia, nanoestrutura, nanotubos, nanofios, nanopartículas e nanorobôs. Muitas palavras que ainda não são amplamente reconhecidas já estão sendo utilizadas em publicações respeitadas e tradicionais das diferentes áreas do conhecimento, tais como da microbiologia, genética, bioquímica e química, entre outras afins. Estas incluem nanoeletrônica, nanocristais, nanoválvulas, nanoantenas, nanocavidades, nanofibras, nano-ímãs, nanoporos, nanomatrizes, nanolitografia, nanousinagem, nanoencapsulação etc.

## 13.2 A nanoescala

O que é ‘nano’? Ainda não é possível apresentar uma resposta definitiva a esta questão. O ‘nano’ é um termo popular em áreas emergentes da ciência e da tecnologia atual. O estudo de sistemas em escala ‘nano’ métrica tem atraído a atenção de pesquisadores de todas as ciências da vida, da física à química, da biologia às engenharias.

A escala nanométrica é convencionalmente definida como o intervalo que vai de 1 a 100 nm. Um nanômetro é um bilionésimo de um metro ( $10^{-9}\text{m}$ ). Este intervalo de tamanhos é normalmente definido com um limite inferior de 1 nm para se evitar átomos individuais ou sistemas muito pequenos. O limite superior é normalmente de 100 nm, mas isto é um limite flexível; muitas vezes objetos com dimensões maiores (até 200 ou 300 nm) são definidos como nanomateriais. Entretanto, a ciência do ‘nano’ não é apenas a ciência do pequeno, mas a ciência em que materiais com pequenas dimensões

apresentam novos fenômenos, denominados coletivamente de efeitos quânticos, que são dependentes do tamanho e que são muito diferentes das propriedades de materiais em escala macro. Portanto, a ciência do ‘nano’ é baseada no estudo de materiais que apresentam propriedades funcionalidades e fenômenos notáveis devido à influência de suas pequenas dimensões (Figura 1).



**Figura 1** - Comparação entre as dimensões de um átomo e um nanômetro.

Fonte: Os autores.

### 13.3 O que é um nanomaterial?

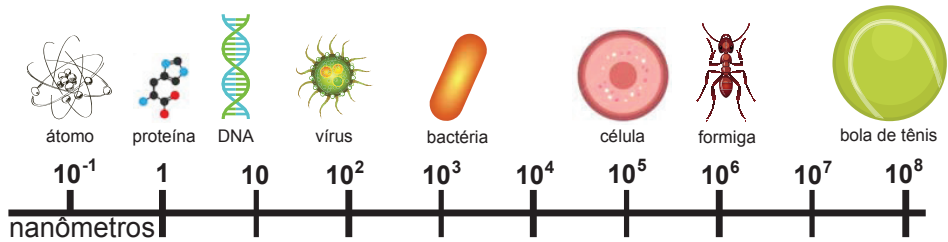
Um nanomaterial é um objeto que tem pelo menos uma dimensão na escala nanométrica. Os nanomateriais são classificados de acordo com as suas dimensões, como mostrado na Tabela 1.

**Tabela1** - Classificação dos nanomateriais de acordo com as suas dimensões.

Dimensão	Exemplos
Todas as 3 dimensões < 100 nm	nanopartículas, pontos quânticos, nanocápsulas
2 dimensões < 100 nm	nanotubos, nanofibras, nanofios
1 dimensão < 100 nm	filmes finos, camadas, revestimentos

Fonte: Os autores.

Um aspecto importante a ser notado é a dimensão do ‘nano’ quando comparado com outros sistemas. Os nanomateriais são maiores do que os átomos individuais, mas menores que as bactérias e células. É útil para se usar uma escala, como a mostrada na Figura 2, onde se pode visualizar a relação entre materiais ‘grandes’ e nanomateriais.



**Figura 2** - Comparação entre 'nano-objetos' e 'grandes-objetos'.

Fonte: Os autores.

Outros bons exemplos:- As nossas unhas crescem a uma taxa de 1 nanômetro por segundo; - O diâmetro da cabeça de um alfinete é de cerca de 1 milhão de nanômetros;- O diâmetro de um fio de cabelo humano é de cerca de 80 mil nanômetros;- uma molécula de DNA tem largura de cerca de 1-2 nanômetros;-o transistor de um processador Pentium Core Duo de última geração tem dimensões de 45 nanômetros.

### 13.4 O que torna o 'nano' especial?

A primeira pergunta que alguém que não é familiarizado com o 'nano' mundo faz é 'por que os nanomateriais são tão especiais?' A principal vantagem desta escala de tamanho é a grande relação área superficial/volume exibida pelos nanomateriais. Como consequência, isto traduz-se numa reatividade da superfície do nanomaterial muito elevada com a superfície dos outros materiais que estão a sua volta. Esta é a situação ideal para aplicações de catálise ou de sensores, por exemplo. Além disso, os materiais em nanoescala apresentam dimensões compatíveis com sistemas biológicos como, por exemplo, as proteínas que possuem tamanhos de 1-20 nm e o DNA que tem diâmetro de aproximadamente 2,5 nm. Ainda, os nanomateriais são candidatos promissores para aplicação de componentes artificiais no interior de células (que tem diâmetros de aproximadamente 10.000-20.000 nm) para diagnosticar/combater doenças, enfermidades, vírus etc. Outro benefício importante advindo dos nanomateriais é a capacidade de variar suas propriedades fundamentais (por exemplo, magnetização, propriedades ópticas (cor), ponto de fusão, dureza etc.) em relação aos materiais a 'grandes' sem nenhuma mudança na composição química.



### 13.5 Da nanociência à nanotecnologia

Embora exista muito entusiasmo atualmente sobre o uso dos nanomateriais, na verdade não há nada de novo na nanociência. As primeiras civilizações já utilizavam materiais em nanoescala para uma variedade de aplicações. Por exemplo, os Maias utilizavam uma argila de silicato de alumínio e magnésio denominada paligorsquita, que continha canais nanométricos que eram preenchidos com água. As civilizações mesopotâmicas usavam vidros coloridos para aplicações decorativas. Estes vidros continham nanopartículas metálicas incorporadas.

O ganhador do prêmio Nobel de Física, Richard Feynman, proferiu o que é considerado a primeira palestra a respeito das aplicações para materiais em nanoescala. Sua palestra, intitulada 'Há muito espaço lá em baixo' foi proferida em 29 de dezembro de 1959, na reunião anual da Sociedade Americana de Física, no campus da Caltech. Sua palestra continha referências a um mundo futuro que até aquele momento nunca tinha sido imaginado. Feynman apontou que a concepção de materiais átomo por átomo era uma possibilidade real, desde que não violasse as leis físicas. Ele também previu algumas realizações de ficção científica como escrever os 24 volumes da Enciclopédia Britânica na cabeça de um alfinete e, ainda mais surpreendentemente, a reprodução completa de todos os livros já produzidos dentro de um pequeno panfleto de menos de 40 páginas.

O primeiro uso do termo 'nanotecnologia' é atribuído a Norio Taniguchi que cunhou este termo, em 1974, na Conferência Internacional sobre Engenharia de Precisão (ICPE). Sua definição se referiu a 'tecnologia de produção para se obter ultra-alta precisão e dimensões ultrafinas, ou seja, precisão e espessurada ordem de 1nm'.

Embora tenham sido sugeridas muitas definições para a nanotecnologia, a Nasa sugeriu recentemente uma descrição mais completa: 'a criação de materiais funcionais, dispositivos e sistemas através do controle da matéria em escala nanométrica (1-100 nm) e a exploração de novos fenômenos e propriedades (física, química e biológica) nesta escala de comprimento'.

Apesar de Feynman ter popularizado a nanotecnologia, a sua influência não conduziu diretamente à concepção de materiais em nanoescala. Um progresso rápido da nanotecnologia só ocorreu após a chegada de instrumentação sofisticada, capaz de visualizar e manipular materiais em escala nanométrica. Na década de 1980, a microscopia de varredura por sonda (SPM) foi desenvolvida. Isto permitiu aos cientistas atender a visão de Feynman de localizar átomos individuais em torno de uma superfície.

O prêmio Nobel de Física de 1986 foi concedido a Gerd Binnig e Heinrich Rohrer em honra ao seu projeto do microscópio de tunelamento (STM). Eles dividiram o prêmio com Ernst Ruska, o inventor do primeiro microscópio eletrônico, outra ferramenta essencial para o estudo moderno de nanomateriais. Na verdade, a resolução dos microscópios eletrônicos modernos agora é suficientemente elevada para proporcionar imagens de átomos individuais. Estes microscópios são na maioria das vezes equipados com detectores que são capazes de determinar a composição química e/ou estado de oxidação dos átomos da superfície.

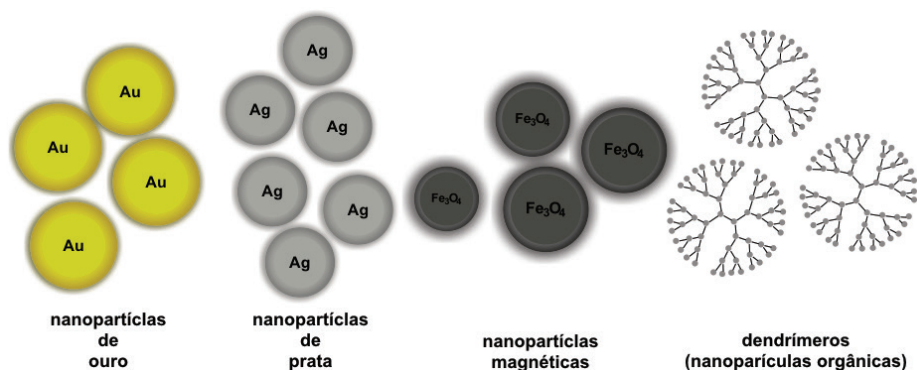
### **13.6. Nanopartículas**

Uma nanopartícula é um nano-objeto com dimensão 0 (0D) no qual todas as dimensões lineares características são da mesma ordem de grandeza (não mais que 100 nm). Por isso, na maioria das vezes, as nanopartículas possuem forma de esferoides.

As nanopartículas são parte essenciais do nosso meio ambiente, da ciência moderna e da alta tecnologia. As nanopartículas representam uma ponte entre materiais 'grandes', moléculas e estruturas em nível atômico. Elas podem ser consideradas como pseudomoléculas gigantes que têm um núcleo e uma 'casca' e, muitas vezes, grupos funcionais externos (Figura 3).

Por exemplo, nanopartículas metálicas têm diferentes propriedades físicas e químicas de partículas metálicas grandes como pontos de fusão mais baixos, áreas superficiais específicas maiores, propriedades ópticas específicas, magnetizações específicas etc. Estas propriedades são muito atraentes para várias aplicações industriais. Em particular, as propriedades ópticas são muito exploradas. Por exemplo, uma nanopartícula de ouro de 20 nm tem uma cor de vinho tinto característica. Uma nanopartícula de prata é cinza amarelado. Nanopartículas de platina e paládio são negras.

Um outro exemplo são as aplicações de administração de fármacos. Neste processo a droga é dissolvida, aprisionada, encapsulada ou ligada a uma matriz de nanopartículas. Dependendo do método de preparação podem ser obtidas nanopartículas, nanoesferas ou nanocápsulas. As nanocápsulas são sistemas nos quais o fármaco está confinado a uma cavidade rodeada por uma membrana polimérica, enquanto as nanoesferas são sistemas matriz nos quais o fármaco é fisicamente e uniformemente disperso.



**Figura 3** - Diferentes tipos de nanopartículas utilizados em estudos biológicos.

Fonte: Os autores.

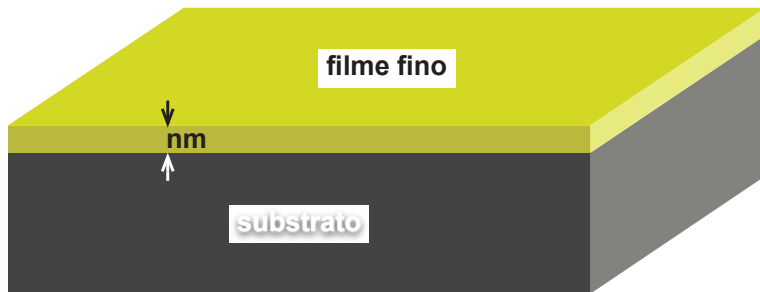
## 13.7 Nanofios

Nanofios, são nano-objetos unidimensionais (1D). Nestes sistemas, uma dimensão (comprimento) excede por pelo menos uma ordem de grandeza as outras duas dimensões, que são nanométricas. Os nanofios apresentam propriedades ópticas, elétricas e magnéticas significativamente diferentes em relação aos seus equivalentes cristalinos 'grandes' (3D). Impulsionada por novas oportunidades tecnológicas, os comprimentos em menores escalas têm sido utilizados nas indústrias de semicondutores, optoeletrônica e de materiais magnéticos. Este fato tem colaborado com o desenvolvimento da indústria de nanobiotecnologia, por exemplo.

## 13.8 Filmes finos

Filmes finos são nanoestruturas bidimensionais (2D) caracterizados por uma fina camada de um material, aderida a um substrato, que possui espessura manométrica (Figura 4). Os filmes finos têm propriedades muito interessantes que são bastante diferentes das dos materiais convencionais dos quais eles são feitos. Estas propriedades específicas dos filmes finos possuem uma vasta gama de aplicações. Comumente os filmes são utilizados para a proteção de materiais contra corrosão, oxidação e desgaste; o aumento da transmissão ou da reflexão de um determinado comprimento de onda, utilizado em filtros de separação de

cor; o aumento da resistência ao fogo; a produção de supercondutores de alta temperatura, dispositivos eletrônicos de silício e dispositivos de memória. Nos últimos anos novas aplicações surgiram nas áreas de conversão eficiente de energia solar, conversão de hidrogênio e conversão de CO<sub>2</sub>; e revestimentos bioativos e biocompatíveis.

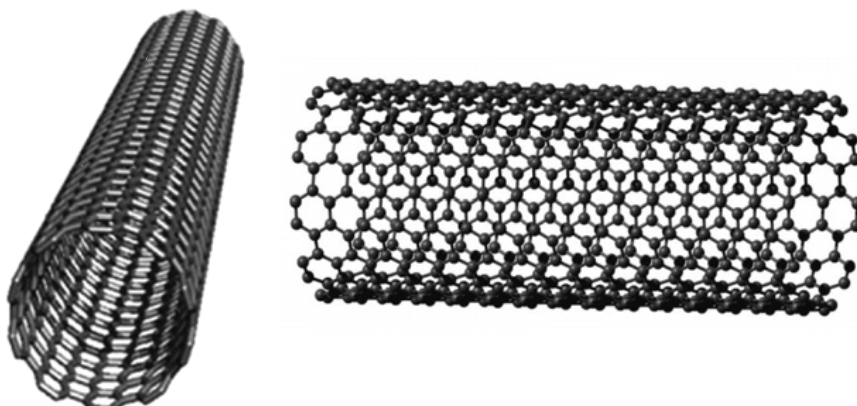


**Figura 4** - Esquema mostrando um filme fino depositado em um substrato.

Fonte: Os autores.

### 13.9 Nanotubos

Os nanotubos de carbono (Figura 5) têm propriedades físicas e químicas únicas que os pesquisadores estão tentando entender melhor por meio de experimentos e simulações. Uma das principais características dos nanotubos de carbono é que é possível construí-los com apenas uma única camada atômica de espessura. Isto significa que eles têm cerca de 1/50.000 da espessura de um cabelo humano. Uma propriedade física interessante dos nanotubos de carbono está relacionada com o fato de que quando se tem dois deles com estruturas físicas um pouco diferentes e eles são unidos, a junção entre eles pode funcionar como um dispositivo eletrônico. Estes dispositivos podem ser utilizados como nanossensores. Estes nanossensores comportam-se como materiais semicondutores em circuitos microeletrônicos detectando pequenas mudanças na corrente elétrica. Estas mudanças na corrente elétrica podem estar associadas, por exemplo, a mudanças na reatividade química em uma solução, ou mudanças na pressão do ar ou na temperatura de um sistema.



**Figura 5** - Um nanotubo de carbono.

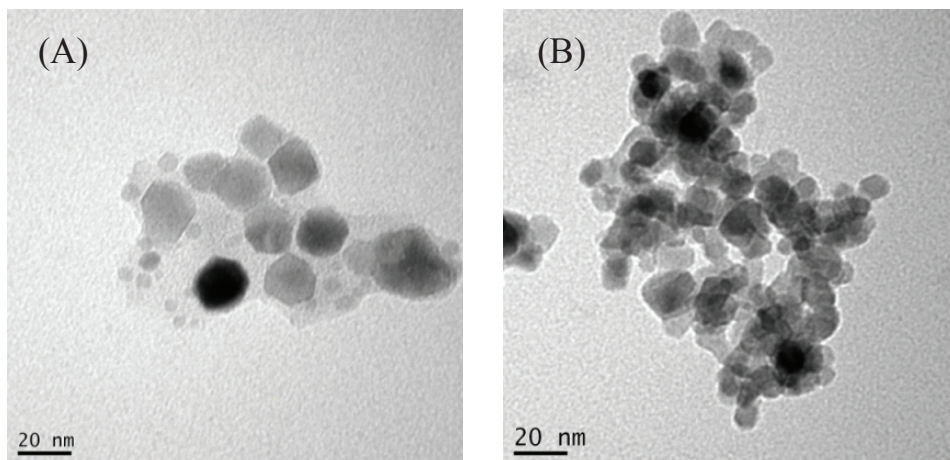
Fonte: Os autores.

### 13.10 Síntese de nanomateriais

Na nanociência e na nanotecnologia, a preparação dos materiais vem despertando grande interesse dos pesquisadores, que se empenham na síntese de novos nanomateriais ou aperfeiçoamento de rotas de síntese já existentes para a obtenção desses novos materiais. Considerando a maioria das aplicações biológicas, um dos maiores desafios encontrados nos métodos para obtenção dos nanomateriais, está diretamente relacionado à obtenção de um sistema homogêneo e estável, em que se consiga o controle das diferentes interações que atuam entre as partículas e as interações entre as moléculas do fluido carregador e as nanopartículas. Essa estabilidade nas interações permite um melhor controle sobre algumas variáveis durante as sínteses, possibilitando maior controle quanto à faixa de distribuição no tamanho de partículas, a cristalinidade e a estabilidade química, fatores esses que terão influência direta nas propriedades dos nanomateriais. Essas nanopartículas podem ser formadas por materiais inorgânicos, como os óxidos (GAO; GU; XU, 2009), ou materiais orgânicos, como os polímeros (VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009).

Em geral, pode-se utilizar dois tipos de síntese quando se trata de materiais inorgânicos: os métodos mecânicos ou os métodos químicos. Os métodos mecânicos em geral, manipulam o material em escala macro e através de processos físicos, quebram-se as partículas até que estas fiquem em escala nanométrica (processos *top down*). Os métodos químicos possibilitam maior controle sobre o processo. Tais métodos são baseados em reações químicas e utilizam precursores

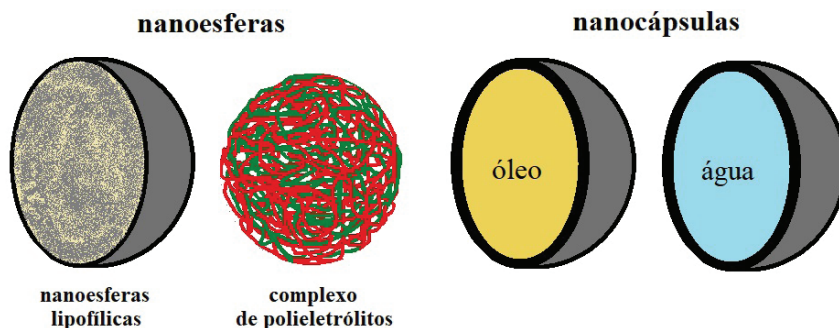
moleculares ou atômicos para a obtenção dos nanomateriais (processos *bottom up*), com controle rigoroso de tamanho e distribuição de tamanho, forma e composição química como, por exemplo, as nanopartículas mostradas na Figura 6. A síntese de nanomateriais a partir de materiais orgânicos, em geral os polímeros, usa métodos químicos e suas propriedades têm sido otimizadas conforme requer a aplicação.



**Figura 6** - Nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )(A) e ferrita de cobalto ( $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ )(B) obtidas pelo método do PVA.

Fonte: Os autores.

Dentre as rotas de síntese mais citadas na literatura para obtenção de nanopartículas inorgânicas uniformes estão os métodos de coprecipitação, decomposição térmica e precursores poliméricos. Muitos trabalhos descrevem essas rotas como sendo as mais eficientes para controlar a forma, o tamanho, a estabilidade e a monodispersividade (GAO; GU; XU, 2009; HAO et al., 2010). Para a obtenção de nanopartículas poliméricas, nanoesferas ou nanocápsulas, como ilustrado na Figura 7, pode ocorrer a polimerização de monômeros (polimerização *in situ*), onde os polímeros são formados simultaneamente às nanopartículas e métodos que utilizam a dispersão de polímeros, sendo este último o mais comumente utilizado. Para tanto dentre os métodos mais empregados pode-se citar a emulsificação-evaporação do solvente, nanoprecipitação e *salting-out* (VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; RAO; GECKELER, 2011).



**Figura 7** - Estrutura de diferentes tipos de nanopartículas poliméricas.

Fonte: Vauthier e Bouchemal (2009).

### 13.11 Síntese de nanopartículas inorgânicas

As nanopartículas inorgânicas podem ser sintetizadas por coprecipitação, por precursores poliméricos ou por decomposição térmica.

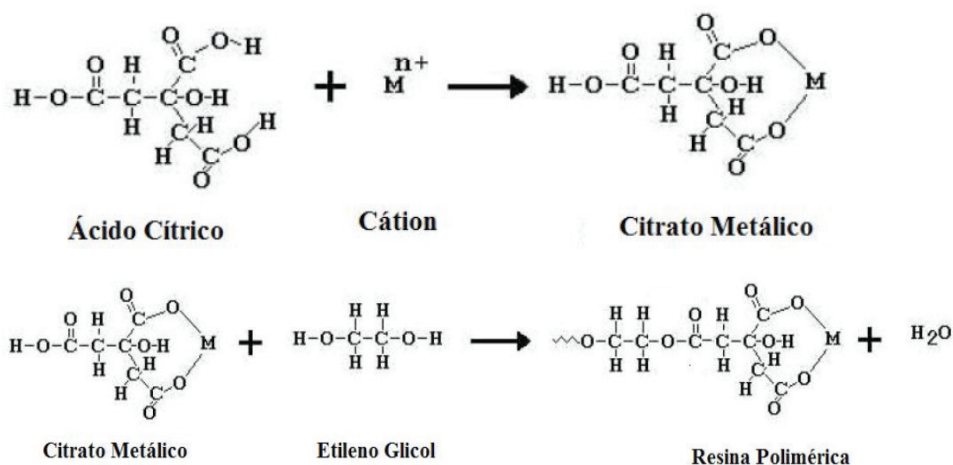
#### 13.11.1 Síntese por coprecipitação

A síntese por coprecipitação consiste na preparação de uma solução homogênea, aquosa ou não aquosa, contendo cátions desejados seguida da precipitação estequiométrica desses cátions, simultaneamente e estequiometricamente na forma de hidróxidos, oxalatos, entre outros. Para que ocorra a precipitação simultânea é preciso que os cátions ou os ânions em solução estejam em concentração que não exceda o produto de solubilidade, e que não ocorra a precipitação de nenhum dos cátions quando a solução contendo os sais precursores é preparada. A precipitação simultânea ocorre em decorrência da mudança do pH, pela adição de um ânion formador de um sal insolúvel.

#### 13.11.2 Síntese por precursores poliméricos - método Pechini

Nesse método de síntese as reações são aquosas e consistem na capacidade que certos ácidos orgânicos, sendo o mais comumente utilizado o ácido cítrico, de formarem quelatos com o íon metálico. Os sais podem estar na forma de nitratos,

cloretos, oxalatos, acetatos ou hidróxidos os quais são adicionados à solução aquosa concentrada do ácido. A completa complexação dos cátions torna a solução límpida. Os complexos típicos, citrato-íon metálico, são muito estáveis em função da forte coordenação que envolve dois grupos carboxílicos e um hidroxílico. Estes quelatos podem esterificar quando aquecidos com um poliálcool (etilenoglicol) e polimerizar a temperaturas mais elevadas formando uma resina intermediária que em seguida é calcinada. Na Figura 8, pode-se observar uma representação das reações envolvidas na síntese pelo método Pechini. A síntese por Pechini e suas variações têm sido utilizada para a preparação de pós com partículas nanométricas, em uma variedade de óxidos metálicos usando sais inorgânicos como precursores e um poliálcool como agente de ligação.



**Figura 8** - Esquema das reações que ocorrem durante a decomposição térmica dos complexos metal-citrato formados durante a síntese de Pechini.

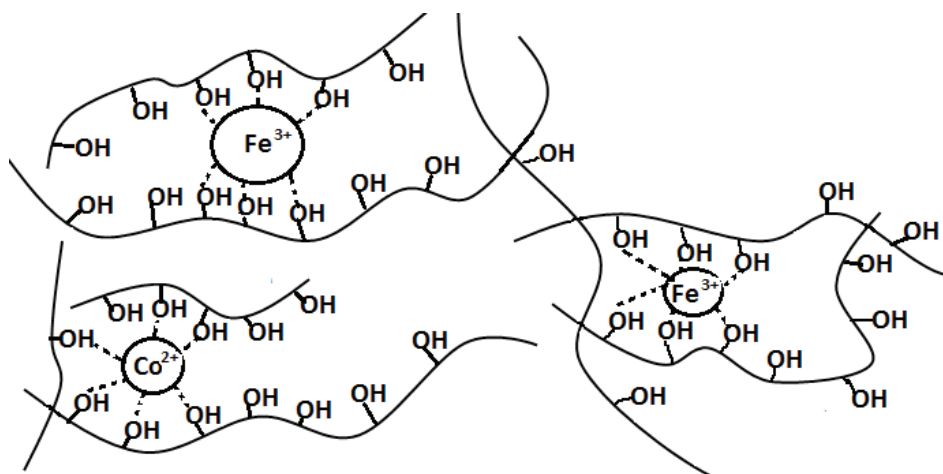
Fonte: Os autores.

### 13.11.3 Síntese por precursores poliméricos - técnica do PVA

O composto álcool polivinílico (PVA) é uma substância efetiva e versátil devido à sua estabilidade em solução, sua compatibilidade química com diversos componentes e sua variedade de tipos, de acordo com as características de síntese. O álcool polivinílico (PVA) é a resina sintética, solúvel em água, produzida em maior volume no mundo. É um polímero poli-hidroxilado, cujo monômero 'álcool vinílico'  $[CH_2 - CHOH]$  não existe no estado livre.



O método polimérico para a síntese de nanomateriais, utilizando o PVA ou, simplesmente, técnica do PVA, é um método químico simples e versátil que pode ser utilizado para a preparação de pós finos de óxidos e outros materiais (BEPARI; BHARALI; DAS, 2014). A estrutura polimérica do PVA mantém a viscosidade da solução e inibe a segregação ou precipitação dos constituintes metálicos da solução. O PVA se decompõe exotermicamente a temperaturas menores que 500°C, sem deixar resíduos. A técnica compreende a evaporação rápida de uma solução aquosa 10% em massa de álcool polivinílico e dos nitratos dos metais desejados. Quando o volume da solução de PVA e nitratos metálicos são reduzidos por evaporação, os íons nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) promovem um meio de oxidação 'in situ' para a decomposição do PVA. Quando a desidratação se completa, os nitratos se decompõem com a formação de vapores de  $\text{NO}_2$ , formando uma resina orgânica. Este precursor é então desaglomerado e calcinado, obtendo-se assim o óxido desejado. A evolução do aquecimento a partir da combustão da matéria orgânica facilita a reação entre os constituintes metálicos. A Figura 9 apresenta os tipos de interação que podem ocorrer para a formação da resina polimérica.



**Figura 9** - Interações entre a cadeia polimérica do PVA e os íons metálicos para a formação da resina.

Fonte: Os autores.

Uma das principais vantagens desta técnica em relação à técnica desenvolvida por Pechini é a menor quantidade de matéria orgânica liberada e, portanto, menor dificuldade de eliminação deste material.

#### **13.11.4 Síntese por decomposição térmica**

Métodos que envolvem a decomposição térmica de líquidos são geralmente baratos e oferecem os melhores produtos e os melhores rendimentos, bem como facilidade de preparação. Entre os métodos de decomposição térmica, uma das rotas de síntese amplamente utilizada para a obtenção de nanopartículas monodispersas atualmente reside no método polioliol ou nas suas variações. Este método consiste na redução de íons metálicos na presença de surfactantes ou não, em um solvente orgânico com alto ponto de ebulição. O polioliol atua no meio reacional simultaneamente como solvente, agente redutor, passivante e meio para o crescimento das partículas, permitindo assim a obtenção de nanopartículas magnéticas monodispersas. Atualmente, diversas variantes do método polioliol vêm sendo empregadas na literatura, nas quais a principal modificação é a substituição dos precursores metálicos carbonílicos, por precursores de menor toxicidade, tais como acetatos e acetilacetatos. A maior vantagem da utilização de sais acetatos e acetilacetatos como precursores metálicos é a volatilidade destes compostos, que é praticamente desprezível e o controle sobre a composição do produto final.

#### **13.12 Síntese de nanopartículas orgânicas (poliméricas)**

As nanopartículas orgânicas podem ser sintetizadas por meio de diferentes métodos como a emulsificação-evaporação do solvente, nanoprecipitação, *Salting-out* e coacervação.

##### **13.12.1 Emulsificação-evaporação do solvente**

Um dos métodos mais empregados para a obtenção de nanopartículas a partir de polímeros é a emulsificação-evaporação do solvente, a qual ocorre em duas etapas. Primeiramente, ocorre a homogeneização, sob alta agitação, de duas fases imiscíveis, sendo estas a fase aquosa, que contém um tensoativo disperso e a fase orgânica, composta pelo ativo e o polímero dissolvidos em solvente orgânico, dando origem, então, a uma emulsão. A evaporação do solvente orgânico confere a segunda etapa, realizada geralmente por rota-*evaporação*. Dessa maneira é promovida a precipitação do polímero contido na fase interna da emulsão, formando nanoesferas, que se apresentam em suspensão. Devido às características da emulsão formada esta técnica é mais indicada quando são utilizados ativos lipofílicos.

Dentro desta mesma técnica existe a dupla emulsificação-evaporação do solvente que é realizada em três fases, duas emulsificações e a evaporação. Ou seja, na segunda etapa a fase dispersa é uma emulsão, dando origem a uma outra emulsão. Ao final de todo o processo, são obtidas nanocápsulas constituídas por um núcleo aquoso contendo ativos de características hidrofílicas.

### 13.12.2 Nanoprecipitação

Esta técnica também pode ser denominada de método do deslocamento do solvente e é uma das técnicas mais simples, econômica, reprodutível e rápida. Consiste na precipitação ou na deposição interfacial de um polímero, uma vez que ocorre na interfase de uma emulsão O/A. Aqui a fase interna é constituída por um polímero dissolvido num solvente orgânico polar como, por exemplo, a acetona ou acetonitrila, no qual se encontra dispersa ou dissolvida o princípio ativo. A fase externa é formada por uma solução aquosa, contendo um tensoativo do tipo O/A como, por exemplo, o PVA. A fase interna, onde se encontra o polímero dissolvido, deve ser vertida sobre a fase externa, em agitação magnética, ocorre a emulsificação espontânea com a formação de um sistema opalescente devido à miscibilidade de ambas as fases. Em seguida, o solvente orgânico é removido à pressão reduzida, formando-se as nanopartículas, como resultado da difusão rápida do solvente do polímero, através da fase aquosa. Este método permite a obtenção de nanoesferas ou nanocápsulas. As nanoesferas são obtidas quando o princípio ativo se encontra dissolvido ou disperso na solução orgânica polimérica. Já as nanocápsulas são obtidas quando o princípio ativo é previamente dissolvido num óleo, e este, em seguida, é emulsificado na solução orgânica polimérica antes da dispersão da fase interna na fase externa da emulsão.

### 13.12.3 *Salting-out*

Este método baseia-se na preparação de um solvente hidromiscível, de uma solução aquosa, através de um efeito de *salting-out*, que resulta na formação de nanoesferas. Prepara-se uma emulsão do tipo O/A, através da adição de uma fase interna, formada por uma solução do polímero num solvente orgânico polar como, por exemplo, acetona ou o tetra-hidrofurano, contendo o princípio ativo dissolvido ou disperso, a uma fase externa formada por uma solução aquosa saturada de um eletrólito ou não eletrólito, contendo um tensoativo como, por exemplo, o PVA. A emulsão O/A é preparada, em agitação intensa, à temperatura ambiente. A emulsão é então diluída num volume adequado de água deionizada ou de uma solução aquosa, de modo a permitir a difusão do solvente orgânico para a fase externa, a precipitação do polímero

e a consequente formação das nanoesferas. A separação das nanoesferas do excesso de eletrólito e do tensoativo é realizada por ultracentrifugação ou ultrafiltração, obtendo-se uma dispersão aquosa de nanoesferas. Por este método são obtidas nanopartículas com tamanhos que variam de 170 a 900 nm. Suas características físico-químicas são afetadas por um conjunto de parâmetros tecnológicos, que incluem a solubilidade do princípio ativo, a natureza do solvente orgânico e do agente de *salting-out* e a concentração do tensoativo.

#### **13.12.4 Coacervação**

Este procedimento pode também ser denominado de complexação de polieletrólitos e utilizam-se dois ou mais polímeros hidrofílicos com cargas opostas. Dessa forma, as frações aquosas e seus respectivos polímeros são homogeneizados sob forte agitação, que pode ser ultrassônica ou mecânica, para que haja interação eletrostática. Geralmente, são usados polímeros de origem natural como, por exemplo, os polissacarídeos quitosana (carga positiva) e condroitina (carga negativa). É feita a gelificação iônica de ambos os sistemas e depois as duas fases são misturadas, entretanto é necessário somente um polímero. Então pode ser empregada uma solução com polímero catiônico e a outra solução com tripolifosfato de sódio, um poliânion.

### **13.13 Técnicas de estudo de nanomateriais**

Agora já sabemos que o tamanho e dimensão dos nanomateriais exibem influência nas suas posteriores aplicabilidades, sendo assim a caracterização correta destes materiais desempenha papel fundamental, por exemplo, a sua forma e estado de aglomeração pode afetar a disposição e translocação dos nanomateriais a absorção celular, biocompatibilidade e retenção em tecidos e órgãos (LIN et al., 2014).

Diversas técnicas são utilizadas para a caracterização dos nanomateriais (ARRUDA et al., 2015), esses estudos incluem o tamanho, a forma, as propriedades de superfície, composição, pureza e estabilidade. Existem vários métodos que podem ser utilizados para avaliar e caracterizar os nanomateriais, dentre eles neste capítulo abordaremos algumas das técnicas como a microscopia eletrônica de varredura, a microscopia eletrônica de transmissão, a microscopia de força atômica, o espalhamento dinâmico de luz e o potencial Zeta, apresentando resumidamente cada uma com suas vantagens e limitações.

### **13.13.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

O surgimento de microscópicos com resolução cada vez maiores, assim como a utilização de outras técnicas de caracterização de nanomateriais, permitiu o acesso ao mundo nanoscópico com sistemas que demonstram a riqueza dos detalhes e sua correta caracterização (ZARBIN, 2007).

Devido à sua alta resolução e rapidez na obtenção das imagens a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a microscopia eletrônica de transmissão (MET) são os métodos-padrão para imagens diretas e medições dimensionais de micro e nanoestruturas (BUHR et al., 2009).

O MEV pode fornecer rapidamente informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos de uma amostra sólida e é um dos mais versáteis instrumentos disponíveis para a observação e análise de características microestruturais de objetos sólidos, pela sua alta resolução e forma tridimensional da imagem. Isto é resultado direto da grande profundidade de campo que permite, também, o exame em pequenos aumentos com grande profundidade de foco. Existe ainda a possibilidade de combinar a análise microestrutural com a microanálise química, o que contribui para o amplo uso destas técnicas.

Para gerar imagens de resolução muito maior quando comparadas com imagens de microscopia óptica, as técnicas de microscopia eletrônica utilizam feixes de elétrons acelerados e lentes eletromagnéticas com base em comprimentos de onda mais curtos que os da luz visível (LIN et al., 2014). Ainda, as análises por MEV necessitam do uso de materiais condutores sobre as amostras que também devem estar secas. Nesse processo pode ocorrer o encolhimento do espécime podendo assim alterar as características dos nanomateriais. Amostras biológicas não estarão em condições fisiológicas exceto quando se utiliza o MEV em modo denominado de 'modo ambiental'. No modo ambiental, a câmara de amostra do MEV é operada em um ambiente gasoso de baixa pressão (10-50 Torr) e alta umidade. Ainda, no modo ambiental do MEV as amostras não necessitam de um material condutor e, portanto, podemos obter imagens de biomoléculas em estado natural (LIN et al., 2014). Tanto no MEV comum como no MEV em modo ambiental podemos observar o tamanho, distribuição, forma, agregação e dispersão dos nanomateriais.

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) também proporciona imagens diretas e informações químicas dos nanomateriais assim como o MEV, permitindo também a observação do tamanho, distribuição, forma, agregação e dispersão de nanomateriais. O MET possui maior resolução que o MEV e vários métodos analíticos podem ser utilizados na investigação da estrutura eletrônica e composição química dos

nanomateriais (LIN et al., 2014). No MET um feixe de elétrons incidente é transmitido e a ampliação é determinada principalmente pela razão entre a distância da lente objetiva e a amostra e a distância entre a lente objetiva e seu plano de imagem.

### 13.13.2 Microscopia de força atômica (AFM)

AFM (*Atomic Force Microscopy*) é uma técnica de alta resolução da microscopia de varredura de sonda. Os componentes básicos de AFM consistem em um microcantilever (Suporte muito pequeno) contendo uma sonda muito fina para a superfície da amostra. Tipicamente, o braço de suporte é feita por nitreto de silício ou em silício. No AFM geração de imagem baseia-se na mudança das forças entre a ponta do cantilever e a superfície da amostra com a qual a sonda entra em contato. As forças que podem ser analisadas incluem força mecânica de contato, forças de Van der Waals, força capilar, força de ligação química, eletrostática e forças magnéticas. Essas forças são medidas por meio da deflexão do cantilever, que se comporta como minúscula mola, seguindo a lei de Hooke. Essa deflexão é detectada por um laser focalizado no topo do cantilever e, posteriormente, refletida em um arranjo de diodos. Quaisquer desvios posicionais minúsculos do ponto de laser, como resultado de deflexão do cantilever são registrados e convertidos numa imagem 3-D (GADEGAARD, 2006).

Embora tanto o AFM quanto outras técnicas de microscopia por varredura de sonda possam produzir imagens 3-D, o AFM tem várias vantagens; pode-se produzir imagens com uma resolução vertical de 0,5 nm; além disso, nanomateriais analisados por AFM não requerem preparação especial; o AFM funciona de forma eficiente em ambiente contendo ar ou em meio líquido, facilitando estudos de macromoléculas biológicas e organismos vivos em nanoescala. Ele pode ser utilizado na investigação de tamanho, forma, estrutura, sorção, dispersão e agregação de nanomateriais. O diferente modo de varredura empregado no estudo de AFM inclui modo de não contato (modo estático), modo de contato e modo de contato intermitente com a amostra (modo dinâmico). Em adição à sondagem de tamanho e forma dos nanomateriais em condições fisiológicas, o AFM é capaz de caracterizar a dinâmica entre nanomateriais em situações biológicas, assim como observar a interação dos nanomateriais com o suporte. O AFM tem grande importância pela sua capacidade de formar imagens de biomateriais sem causar danos apreciáveis a diversos tipos de superfícies nativas (LIN et al., 2014).

### 13.13.3 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

Espalhamento dinâmico de luz (do inglês, *Dynamic Light Scattering*, DLS), é uma das técnicas mais utilizadas na determinação de distribuição de tamanhos

de nanopartículas, moléculas ou polímeros da escala micrométrica até alguns nanômetros, isso em solução ou suspensão utilizando uma luz monocromática como, por exemplo, um laser.

O princípio da técnica é monitorar a flutuação da intensidade do espalhamento elástico da luz como, por exemplo, o espalhamento Rayleigh. Quando utilizado um laser como fonte de luz, observa-se uma flutuação na intensidade do espalhamento que varia em função do tempo. Essas flutuações ocorrem em função das nanopartículas (ou pequenas partículas em solução) não estarem estáticas, mas em movimento constante e aleatório (Movimento Browniano) e assim a distância entre os dispersores na solução está constantemente mudando com o tempo. Esta luz difusa, em seguida, sofre interferências construtivas ou destrutivas em torno das partículas e, por meio de cálculos matemáticos, utilizando a equação de Stokes-Einstein (e considerações sobre o efeito Doppler), é possível associar essa variação de intensidade de espalhamento de luz em função do tempo ao tamanho das partículas dispersas em solução (LIN et al., 2014, SAPSFORD et al., 2011).

As vantagens da técnica incluem o tempo curto para aquisição dos dados (minutos), precisão na determinação do tamanho hidrodinâmico de amostras monodispersas e capacidade de medidas em amostras diluídas. O aparelho possui um baixo custo e reprodutibilidade nas análises. Entretanto, existem algumas desvantagens como a dificuldade de correlação de tamanho com a composição quando agregados estão presentes na amostra, isso pela interferência na intensidade do espalhamento, e uma limitação na escala de tamanho. Em adição a isto, o DLS tem utilidade limitada na análise de amostras com tamanhos heterogêneos e na resolução de dimensões de amostras misturadas em populações variando o tamanho em um fator menor que três. O DLS não tem precisão na medida de amostras não esféricas, pois a natureza esférica da partícula é sempre assumida nessa análise (LIN et al., 2014).

#### **13.13.4 Potencial Zeta**

Potencial Zeta é uma abreviação de potencial eletrocinético em sistemas coloidais. Do ponto de vista teórico, todos os materiais macroscópicos ou particulados em contato com um líquido adquirem uma carga elétrica em sua superfície. A carga líquida na superfície da partícula afeta a distribuição de íons na sua vizinhança, aumentando a concentração de contra-íons junto à superfície. Assim, forma-se uma dupla camada elétrica na interface da partícula com o líquido. Essa dupla camada divide-se em duas regiões: uma região interna que inclui íons fortemente ligados à superfície e uma região exterior onde a distribuição dos íons é determinada pelo equilíbrio entre forças eletrostáticas e movimento térmico. Dessa forma, o potencial nessa região

decai com o aumento da distância da superfície até, a uma distância suficientemente segura, atingir o potencial da solução. Esse potencial é convencionalmente denominado como potencial 0. Em um campo elétrico, como em microeletroforese, cada partícula e os íons mais fortemente ligados à mesma se movem como uma unidade, e o potencial no plano de cisalhamento entre essa unidade e o meio é denominado potencial Zeta. Esse potencial é função da carga superficial da partícula, de qualquer camada adsorvida na interface com o meio, e da natureza e composição do meio que a circunda. Como esse potencial reflete a carga efetiva nas partículas, ele se relaciona com a repulsão eletrostática entre elas e com a estabilidade da suspensão. O potencial Zeta também varia em função do pH e com a força iônica da solução que se deseja analisar (LIN et al., 2014; SAPSFORD et al., 2011).

O potencial Zeta com valor de  $\pm 30$  mV é geralmente utilizado para deduzir a estabilidade da partícula, em que o valor absoluto maior que 30 mV indica condições estáveis, entretanto um valor baixo, menor que 30 mV indica uma condição em direção à instabilidade, agregação, coagulação ou floculação (LIN et al., 2014).

### **13.14 Nanomateriais, entidades biológicas em escala nanométrica, biomimética e suas aplicações em biotecnologia ambiental**

Uma vez que foram apresentadas as características dos nanomateriais, síntese e formas de análise, deve-se observar como podem ser aplicados do ponto de vista biotecnológico.

A nanotecnologia é uma área em crescente desenvolvimento, oferece perspectivas de grandes avanços para melhorar a qualidade de vida e preservação do meio ambiente; essa ciência contempla um campo multidisciplinar que revoluciona as diversas áreas científicas como a física, a química e a biologia e as suas aplicações formando a base da nanotecnologia de materiais.

A obtenção de produtos que podem ser utilizados em processos biotecnológicos vem aumentando a cada dia. Esses produtos podem ser utilizados em várias áreas como meio ambiente, medicina, indústria farmacêutica, indústrias têxteis, embalagens, construção civil, cosméticos, indústria alimentícia, biologia molecular entre outras (FARIA et al., 2013). Em particular, abordaremos os principais benefícios do uso de nanomateriais em processos de descontaminação da água.

O uso de nanopartículas tem sido muito eficiente quando aplicadas em sistemas biológicos. A utilização de micro-organismos como um novo candidato para a aplicação



de nanomateriais é uma opção sensata, pois pode apresentar um sistema menos tóxico, quando se fala, por exemplo, do uso crescente de agrotóxicos e os problemas acarretados pelo excesso dessas e outras substâncias tóxicas no ambiente. Trabalhos utilizando micro-organismos aliados aos nanomateriais estão apresentando sucesso em relação à biorremediação de ambientes contaminados. A procura por métodos de descontaminação da água que são ecologicamente corretos e tem menor custo levam os pesquisadores a buscarem soluções para esses problemas.

Desta forma, o emprego dos nanomateriais para a remediação de compostos poluentes no ambiente vem aumentando, no entanto existem algumas barreiras encontradas, com a utilização desses compostos individualmente. Para Quina (2004), o pequeno tamanho das nanopartículas facilita sua difusão e transporte na atmosfera, em águas e em solos, ao passo que dificulta sua remoção por técnicas usuais de filtração.

Como já vimos, a área superficial das nanopartículas lhes confere excelentes propriedades de adsorção de metais e substâncias orgânicas, as etapas superiores de coleta das partículas e remoção de poluentes podem ser facilitadas pelo uso, por exemplo, de nanopartículas magnéticas, outro avanço em relação à poluição ambiental é a fabricação de sensores cada vez menores, mais seletivos e mais sensíveis para a detecção e monitoramento de poluentes orgânicos e inorgânicos no meio ambiente, detectando precocemente a existência de problemas de contaminação, em tempo real dos procedimentos de tratamento e remediação de poluentes (QUINA, 2004; FARIA et al., 2013).

As nanopartículas magnéticas vêm sendo utilizadas, aliadas também com micro-organismos, podendo ser separadas ou removidas a partir das amostras complexas utilizando um campo magnético externo (por exemplo, usando um filtro magnético, um ímã permanente, ou um eletroímã). Este processo é muito importante para bioaplicações devido ao fato de a maioria dos materiais biológicos terem propriedades diamagnéticas, o que permite a separação seletiva e eficiente de materiais magneticamente modificados. Partículas magnéticas podem ser direcionadas para o local desejado e mantidas lá usando um campo magnético externo (SAFARIK; SAFARIKOVA, 2009; FARIA et al., 2013).

Recursos hídricos superficiais e subterrâneos estão enfrentando continuamente mudanças profundas e deterioração da sua qualidade, causadas por várias atividades antrópicas. Atividades industriais, em particular, são muitas vezes responsáveis pela descarga direta de efluentes contendo poluentes orgânicos e metais em ecossistemas aquáticos deterioração à qualidade da água, gerando assim um grande problema no contexto global (KANU; ACHI, 2011). Diversas pesquisas demonstram novas tecnologias para combater a questão da poluição da água, entre eles a nanotecnologia/nanomateriais tornou-se uma ferramenta para aplicação no tratamento de água.

Qu, Alvarez e Li (2013) realizaram uma revisão sobre os avanços da nanotecnologia em relação ao tratamento de águas residuais, eles discutem as propriedades dos nanomateriais, mecanismos, vantagens e limitações em comparação com processos já existentes e também a necessidade de investigação para comercialização na gestão sustentável da água, para os autores o tratamento atual da água não são mais sustentáveis e a nanotecnologia pode oferecer soluções mais acessível, podendo superar os tratamentos já existentes e fornecer novas técnicas mais econômicas em fontes não convencionais para expandir o abastecimento de água.

Nanomateriais baseados em nanopartículas metálicas demonstraram um grande potencial para remover uma variedade de metais pesados como o arsênio, chumbo, mercúrio, cobre, cádmio, cromo, níquel, entre outros (QU; ALVAREZ; LI, 2013). Alguns nanomateriais têm propriedades antimicrobianas, isso os torna uma alternativa promissora para desinfecção de água e controle microbiano. Por exemplo, nanopartículas de prata foram incorporadas em microfiltros de cerâmica como uma barreira para agentes patogênicos, que podem ser empregados em áreas remotas de países em desenvolvimento (PETER-VARBANETS et al., 2009).

Entretanto, o desenvolvimento e a comercialização desses produtos para o tratamento de água enfrentam uma série de desafios, obstáculos técnicos como a relação custo-eficácia e o potencial de risco para o ser humano e o meio ambiente. Por isso existe a necessidade da investigação da eficiência/aplicabilidade em grande escala (por exemplo, no tratamento da água/esgoto) utilizando-se diferentes métodos e nanomaterias. Ainda, tem a necessidade de se estudar também a eficiência em longo prazo já que a maioria dos estudos foi realizada em um curto período de tempo em laboratório.

Ainda, um dos problemas atualmente estudado na nanotecnologia/nanomateriais envolve a compreensão das questões relacionadas com a toxicidade e impacto ambiental dos materiais em nanoescala. A avaliação dos riscos é crucial para a liberação ambiental e suas concentrações analisando os possíveis efeitos ecotoxicológicos (GOTTSCHALK; SUN; NOWACK, 2013). Isto porque o pequeno tamanho dos nanomateriais facilita seu transporte e difusão na atmosfera, em águas e solos, podendo dificultar a sua remoção por técnicas de filtração. Existem muitos trabalhos na literatura que estão em análise os possíveis efeitos tóxicos das nanopartículas e dos novos nanomateriais, porém ainda é cedo para chegar a conclusões do risco/benefício da sua utilização. Estes impactos potenciais só poderão ser dimensionados de forma clara através de uma avaliação dos impactos das nanotecnologias. Contudo, as propriedades únicas dos nanomateriais e sua convergência com o tratamento atual apresentam grandes oportunidades para revolucionar o tratamento da água (QU; ALVAREZ; LI, 2013).

### **13.15 Entidades biológicas em escala nanométrica, biomimética e suas aplicações**

Como discutido acima, a bionanotecnologia é capaz de combinar a engenharia em nanoescala com a biologia, com o propósito de manipular sistemas vivos ou também construir materiais biologicamente inspirados (biomimética) em nível molecular. Desta forma, ao considerar que os nanomateriais são aqueles com dimensões entre 1 e 100 nanômetros, alguns vírus se enquadram nestas dimensões, pois variam entre 20 a 300 nm, são capazes de replicação utilizando a maquinaria celular como ambiente físico e estrutural para esse processo, portanto, podem ser utilizados como ferramentas na bionanotecnologia. Tornam-se excelentes ‘veículos’ de entrega de material genético e de outras substâncias (medicamentos), com empregabilidade na indústria farmacêutica, médica, agroindústria, na transformação genética, no controle biológico e também em processos de biorremediação.

Em particular, desde o início do novo século XXI existe um grande interesse na exploração de vírus, especialmente, vírus de plantas, para a destinação de novos nanomateriais (EVANS, 2009).

Os recentes avanços na nanotecnologia nos permitirá manipular e produzir materiais com controle de nível molecular. No campo emergente da bionanomedicina, é essencial controlar com precisão as propriedades físicas, químicas e biológicas dos materiais. Dentre os blocos de construção biológicos, as partículas virais são nanomateriais promissores que podem ser estruturadas e controladas com precisão. Uma vez que a produção de partículas virais é dirigida pela informação genética encapsulada nos seus invólucros de proteína, as partículas virais podem criar formas e tamanhos precisamente definidos. Além disso, as propriedades da composição e superfície das partículas pode ser controlada por meio de engenharia genética e de modificação química (FARR; DONG; LEE, 2014).

Dentre as aplicações, destaca-se de acordo com Raper (2005) a terapia gênica, na qual os vírus são utilizados como veículos de material genético, que podem carregar uma nova informação genética, não somente aquela do genoma viral. A transferência de genes e também a aplicação de novas terapias são consideráveis avanços em biotecnologia, podendo ser aplicadas em células cancerosas, no tratamento da hemofilia, anemia falciforme, fibrose cística, doenças musculares e também neurológicas. Os vetores virais têm proporcionado métodos eficientes para a entrega de genes ‘in vivo’ para uma grande variedade de fins terapêuticos. Os vetores atualmente utilizados em terapia genética humana sofrem de um número de limitações em termos de segurança e reprodutibilidade (RAPER, 2005).

Em 2002, Costanzi-Strauss e Strauss já descrevia que os vírus eram utilizados como vetores biológicos para introdução de genes em células de mamíferos, com a utilização de vários métodos físicos, tais como microinjeção direta, eletroporação, injeção de plasmídeo e também processos de injeção balística. Os retrovírus, adenovírus, vírus adeno-associado (AAV) são dos exemplos de vírus que foram modificados com sucesso por meio de técnicas de DNA recombinante. Atualmente, a construção de vetores virais tem sido realizada por técnicas de transferência, a recombinação e a expressão do gene, e, além disso, têm sido amplamente utilizados no rastreamento de ensaios clínicos para a terapia genética, uma vez que a tecnologia de transferência genética ocorre por meio da grande capacidade em que os vírus têm de transferência de parte do seu genoma para as células alvos.

Na área farmacêutica algumas das aplicações que podem ser exemplificadas estão no trabalho de Ma, Nolte e Cornelissen (2012), como novas plataformas de vírus como entregadores de substâncias específicas em células-alvo. Assim, a estrutura viral é considerada uma embalagem de medicamentos. É possível ainda realizar modificações genéticas sobre as superfícies externas e internas das cavidades virais, permitindo a preparação de novos materiais que podem atender os requisitos de biocompatibilidade, solubilidade e alta eficiência de absorção no momento da entrega da droga.

Consideradas as ferramentas de estudos, é possível, assim como explica Hamdi et al. (2008), simular a dinâmica molecular associada como uma contribuição virtual de bionanorobôs moleculares, ou seja, computacionalmente estudar as interações moleculares e também possíveis formas de aplicações.

Em vista das aplicabilidades na agroindústria, os vírus de plantas são componentes fundamentais versáteis, com várias estratégias de síntese possíveis, além de modelos para fins de exploração em bionanociência. Podem ainda ser funcionalizadas com uma série de moléculas, incluindo aquelas de origem inorgânica ou organometálico, e a sua superfície exterior pode ser então mineralizada para dar novas rotas para as nanopartículas (EVANS, 2010), com aplicações variáveis, mas em especial, no controle de pragas na agricultura.

Na natureza, além dos vírus como estrutura mais complexa, é possível a utilização das proteínas, que são 'máquinas' capazes de realizar muitas funções, pelo fato do seu reconhecimento específico e, além disso, a possibilidade na interação em sistemas biológicos (biomimética molecular). Este processo é realizado por meio da especificidade molecular, conduzindo a uma formação de estruturas e funções que podem ser controladas em todas as escalas, capazes ainda de uma hierarquia dimensional. Utilizando a biologia como um guia, podemos entender as interações entre os peptídeos e outras moléculas, capazes de explorar e adaptar a novos materiais

e sistemas para aplicações práticas. Esta abordagem, denominada de biomimética molecular, abre novos caminhos para a concepção e utilização de sistemas moleculares multifuncionais com aplicações de largo espectro, desde a engenharia de tecidos, a entrega de drogas e biossensores, a nanotecnologia e também a processos de biorremediação (TAMERLER; SARIKAYA, 2007).

### 13.16 Conclusões

Um dos objetivos dos cientistas em bionanociência é buscar alternativas para imobilizar biomoléculas em superfícies e montar biomoléculas em matrizes definidas (EVANS, 2010), assim a utilização de entidades biológicas como os vírus, proteínas como nanomotores moleculares são sofisticadas estruturas que possuem uma série promissora de aplicações, tais como na medicina, na indústria farmacêutica e também na agroindústria.

### Referências

ARRUDA, S. C. C. et al. Nanoparticles applied to plant science: a review. **Talanta**, New York, v. 131, p. 693-705, 2015

BEPARI, R. A.; BHARALI, P.; DAS, B. K. Controlled synthesis of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles via thermolysis of PVA gels and studies on  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> catalyzed styrene epoxidation. **Journal of Saudi Chemical Society**, Amsterdam, v. 21, p. S170-S178, 2014.

BUHR, E. et al. Characterization of nanoparticles by scanning electron microscopy in transmission mode. **Measurement Science and Technology**, United Kingdom, v. 20, no. 8, p. 084025, 2009.

COSTANZI-STRAUSS, E.; STRAUSS, B. E. Terapia gênica do câncer. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, DF, v. 28, p. 26-28, 2002.

EVANS, D. Exploitation of plant and archaeal viruses in bionanotechnology. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 37, no. 4, p. 665-670, 2009.

EVANS, D. Bionanoscience at the plant virus–inorganic chemistry interface. **Inorganica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 363, no. 6, p. 1070-1076, 2010.

FARIA, E. M. A. et al. Nanotecnologia e Meio Ambiente: Uma análise sobre os riscos e benefícios dessa tecnologia em um contexto atual. **Biofar, Revista de Biologia e Farmácia**, Campina Grande, v. 9, n. 1, p. 18-26, 2013.

FARR, R.; DONG, C. S.; LEE, S. W. Phage-based nanomaterials for biomedical applications. **Acta Biomaterialia**, Amsterdam, v. 10, no. 4, p. 1741-1750, 2014.

GADEGAARD, N. Atomic force microscopy in biology: technology and techniques. **Biotechnic & Histochemistry**, New Delhi, v. 81, no. 2-3, p. 87-97, 2006.

GAO, J.; GU, H.; XU, B. Multifunctional magnetic nanoparticles: design, synthesis, and biomedical applications. **Accounts of Chemical Research**, Washington, D.C., v. 42, no. 8, p. 1097-1107, 2009.

GOTTSCHALK, F.; SUN, T. Y.; NOWACK, B. Environmental concentrations of engineered nanomaterials: review of modeling and analytical studies. **Environmental Pollution**, Amsterdam, v. 181, p. 287-300, 2013.

HAMDI, M. et al. Prototyping bio-nanorobots using molecular dynamics simulation and virtual reality. **Microelectronics Journal**, Amsterdam, v. 39, no. 2, p. 190-201, 2008.

HAO, R. et al. Synthesis, functionalization, and biomedical applications of multifunctional magnetic nanoparticles. **Advanced Materials**, Weinheim Germany, v. 22, no. 25, p. 2729-2742, 2010.

KANU, I.; ACHI, O. K. Industrial effluents and their impact on water quality of receiving rivers in Nigeria. **Journal of Applied Technology in Environmental Sanitation**, Indonesia, v. 1, p. 75-86, 2011.

LIN, P. et al. Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. **Biotechnology advances**, Amsterdam, v. 32, no. 4, p. 711-726, 2014.

MA, Y.; NOLTE, R.; CORNELISSEN, J. Virus-based nanocarriers for drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 64, no. 9, p. 811-825, 2012.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International journal of pharmaceutics**, Amsterdam, v. 385, no. 1-2, p. 113-142, 2010.

PETER-VARBANETS, M. et al. Decentralized systems for potable water and the potential of membrane technology. **Water Research**, Amsterdam, v. 43, no. 2, p. 245- 265, 2009.

QU, X.; ALVAREZ, P.; LI, K. Applications of nanotechnology in water and wastewater treatment. **Water Research**, Amsterdam, v. 47, no. 12, p. 3931-3946, 2013.

QUINA, F. Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 6, p. 1028-1029, 2004.

RAO, P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**, Amsterdam, v. 36, no. 7, p. 887-913, 2011.

RAPER, S. E. Gene therapy: the good, the bad and the ugly. **Surgery**, Amsterdam, v. 137, no. 5, p. 487-492, 2005.

SAFARIK, I.; SAFARIKOVA, M. Magnetic nano- and microparticles in biotechnology. **Chemical Papers**, Bratislava, v. 63, no. 5, p. 497-505, 2009.

SAPSFORD, K. et al. Analyzing nanomaterial bioconjugates: a review of current and emerging purification and characterization techniques. **Analytical Chemistry**, Washington, D.C., v. 83, no. 12, p. 4453-4488, 2011.

TAMERLER, C.; SARIKAYA, M. Molecular biomimetics: utilizing nature's molecular ways in practical engineering. **Acta Biomaterialia**, Kidlington, v. 3, no. 3, p. 289-299, 2007.

VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the preparation and manufacture of molecular biomimetics: utilizing nature's molecular ways in practical engineering polymeric nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, Stuttgart, v. 26, no. 5, p. 1025-1058, 2009.

ZARBIN, A. J. Química de (nano) materiais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 6, p. 1469-1479, 2007.

Nome completo: João Alencar Pamphile  
Titulação: Mestre e Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas - ESALQ/USP; Pós-Doutorado ESALQ/USP  
Afiliação institucional: Universidade Estadual de Maringá  
Grupos de pesquisa: Biotecnologia Microbiana  
Orcid: 0000-0002-6139-5937  
E-mail: japamphile@uem.br; prof.pamphile@gmail.com

Nome completo: João Lúcio Azevedo  
Titulação: Professor titular sênior  
Afiliação institucional: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo (ESALQ/USP)  
Grupo de pesquisa: Biotecnologia Microbiana  
Orcid: 0000/0003/0503/3525  
E-mail: jlazevedo@usp.br

Nome completo: Maria Carolina Quecine-Verdi  
Titulação: Professora Doutora  
Afiliação institucional: Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”  
Grupos de pesquisa: Laboratório de Genética de Microrganismos “Prof. João Lúcio de Azevedo”  
Orcid: 0000-0002-9781-8479  
E-mail: mquecine@usp.br

Nome completo: Paulo Teixeira Lacava  
Titulação: Doutorado (Universidade de São Paulo – CENA/USP); Pós-Doutorado (University of California Riverside); Pós-Doutorado (Universidade de São Paulo – ESALQ/USP)  
Afiliação institucional: Universidade Federal de São Carlos - UFSCar  
Grupos de pesquisa:  
Orcid: [orcid.org/0000-0001-7166-606X](http://orcid.org/0000-0001-7166-606X)  
E-mail: <http://www2.ufscar.br/email:ptlacava@ufscar.br>

Os organizadores do presente livro agradecem as imprescindíveis contribuições dos autores convidados, pois sem os mesmos este trabalho não seria possível de ser realizado. Em ordem alfabética citamos:

Nome completo: Adriana Garcia  
Titulação: PhD  
Afiliação institucional: Instituto Federal Catarinense – IFC – Campus Araquari



Grupos de pesquisa: Biotecnologia Microbiana – João Alencar Pamphile - LBIOMIC/UEM; Grupo de Desenvolvimento de Dispositivos Multifuncionais GDDM/UEM  
Orcid: [orcid.org/0000-0003-2958-6554](https://orcid.org/0000-0003-2958-6554)  
E-mail: [adrianagarcia.biologa@gmail.com](mailto:adrianagarcia.biologa@gmail.com)

Nome completo: Alessandra Tenório Costa  
Titulação: PhD  
Afiliação institucional: Universidade Estadual de Maringá - UEM  
Grupos de pesquisa:  
Orcid: 0000-0002-7745-3257  
E-mail: [alebiologyt@hotmail.com](mailto:alebiologyt@hotmail.com)

Nome completo: André Bellin Mariano  
Titulação: Doutorado  
Afiliação institucional: Universidade Federal do Paraná  
Grupos de pesquisa: Grupo de Energia e Ciências Térmicas - UFPR; Microrganismos: caracterização, produtos e processos de interesse biotecnológico e agrícola - UFPR; Tecnologia e Ciências Ambientais- TCA - UFPR  
Orcid:  
E-mail: [andrebmariano@gmail.com](mailto:andrebmariano@gmail.com)

Nome completo: André Oliveira de Souza Lima  
Titulação: Biólogo, Mestre (Unesp) e Doutor em Agronomia (USP)  
Afiliação institucional: Universidade do Vale do Itajaí (Univali)  
Grupos de pesquisa: Genética Molecular Aplicada e Biotecnologia  
Orcid: 0000-0003-2261-2801  
E-mail: [andreolima@gmail.com](mailto:andreolima@gmail.com)

Nome completo: Bruna Durante Batista  
Departamento de Genética. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo (Esalq/USP)

Nome completo: Fábio Bueno dos Reis Junior  
*Empresa Brasileira* de Pesquisa Agropecuária (embrapa), Cerrado  
E-mail: [fabio.reis@embrapa.br](mailto:fabio.reis@embrapa.br)

Nome completo: Fernando Dini Andereote  
Titulação: Professor Associado/Livre Docente  
Afiliação institucional: Departamento de Ciência do Solo, ESALQ/USP  
Grupos de pesquisa: Laboratório de Microbiologia do Solo, BRazilian Microbiome Project  
Orcid: [orcid.org/0000-0002-9883-9968](https://orcid.org/0000-0002-9883-9968)  
E-mail: [fdandreo@usp.br](mailto:fdandreo@usp.br)

Nome completo: Iêda de Carvalho Mendes.  
Afiliação institucional: *Empresa Brasileira* de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Cerrado

Nome completo: Itamar Soares de Melo  
Titulação: Doutor  
Afiliação institucional: Laboratório de Microbiologia Ambiental. *Empresa Brasileira* de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Meio Ambiente  
E-mail: [Itamar.melo@embrapa.br](mailto:Itamar.melo@embrapa.br)

Nome completo: José Odair Pereira  
Titulação: Doutor  
Afiliação institucional: Universidade Federal do Amazonas - UFAM  
Grupos de pesquisa: Biodiversidade e Biotecnologia de Endófitos  
Orcid: [orcid.org/0000-0002-0441-381X](https://orcid.org/0000-0002-0441-381X)  
E-mail: [jodair@ufam.edu.br](mailto:jodair@ufam.edu.br)

Nome completo: José Viriato Coelho Vargas  
Titulação: PhD  
Afiliação institucional: UFPR  
Grupos de pesquisa: Grupo de Energia e Ciências Térmicas - UFPR; Microrganismos: caracterização, produtos e processos de interesse biotecnológico e agrícola - UFPR; NPDEAS - Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento em Energia Autossustentável da UFPR  
Orcid: [0000-0002-1458-2908](https://orcid.org/0000-0002-1458-2908)  
E-mail: [vargasjvcv@gmail.com](mailto:vargasjvcv@gmail.com)

Nome completo: Juliana Bernardi Wenzel  
Titulação: Doutora em Biologia das Interações Orgânicas  
Afiliação institucional: Universidade Federal do Paraná  
Grupos de pesquisa: Biotecnologia Microbiana - UEM  
Orcid: [0000.0002.1947.6434](https://orcid.org/0000.0002.1947.6434)  
E-mail: [julianawenzel@ufpr.br](mailto:julianawenzel@ufpr.br)

Nome completo: Juliano Marcon Baltazar  
Titulação: Doutor em Ciências Biológicas (Botânica)  
Afiliação institucional: Centro de Ciências da Natureza, Campus Lagoa do Sino Universidade Federal de São Carlos Buri, SP, Brasil  
Grupos de pesquisa: Ecologia, Genética e Conservação da Biodiversidade do Sudoeste Paulista ([link: dgp.cnpq.br/dgp/espelhogrupo/1938174289281595](http://link:dgp.cnpq.br/dgp/espelhogrupo/1938174289281595))  
Orcid: [orcid.org/0000-0002-9914-5108](https://orcid.org/0000-0002-9914-5108)  
E-mail: [baltazarjmb@gmail.com](mailto:baltazarjmb@gmail.com)

Nome completo: Letícia Nishi  
Titulação: Doutora  
Afiliação institucional: Universidade Estadual de Maringá  
Grupos de pesquisa: processos de separação e controle ambiental, Zoonoses de interesse em saúde, Epidemiologia e controle da toxoplasmose no noroeste do Paraná  
Orcid: [orcid.org/0000-0001-8796-5769](https://orcid.org/0000-0001-8796-5769)  
E-mail: [leticianishi12@gmail.com](mailto:leticianishi12@gmail.com)

Nome completo: Luiz Fernando Cótica  
Titulação: Doutor  
Afiliação institucional: Departamento de Física, Universidade Estadual de Maringá (UEM)  
E-mail: [lfcotica@dfi.uem.br](mailto:lfcotica@dfi.uem.br)

Nome completo: Márcia Regina Fagundes Klen  
Titulação: Dra. Engenharia Química  
Afiliação institucional: Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Grupos de pesquisa: Desenvolvimento e Simulação de Processos-Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Unioeste; Monitoramento e controle ambiental - Unioeste; Controle e Preservação Ambiental - Universidade Estadual de Maringá - UEM

Orcid: [orcid.org/0000-0001-7453-349X](https://orcid.org/0000-0001-7453-349X)

E-mail: [marcia.klen@unioeste.br](mailto:marcia.klen@unioeste.br) e [fagundes.klen@gmail.com](mailto:fagundes.klen@gmail.com)

Nome completo: Marcus Adonai Castro da Silva

Titulação: Oceanógrafo e Doutor em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente

Afiliação institucional: Universidade do Vale do Itajaí

Grupos de pesquisa: Bioprospecção Marinha; Genética Molecular; Microbiologia e Toxicologia Ambiental

Orcid: [orcid.org/0000-0002-7028-813X](https://orcid.org/0000-0002-7028-813X)

E-mail: [marcus.silva@univali.br](mailto:marcus.silva@univali.br)

Nome completo: Mariangela Hungria

Titulação: Doutora

Afiliação institucional: Embrapa Soja

Grupos de pesquisa: INCT Microrganismos Promotores do Crescimento de Plantas Visando à Sustentabilidade Agrícola e à Responsabilidade Ambiental

Orcid: [0000-0002-5132-8685](https://orcid.org/0000-0002-5132-8685)

E-mail: [mariangela.hungria@embrapa.br](mailto:mariangela.hungria@embrapa.br)

Nome completo: Michele de Cássia Pereira e Silva

Titulação: PhD Microbiologia e Ecologia Microbiana

Afiliação institucional: Universidade Federal de São Carlos - Campus Sorocaba - Departamento de Ciências Ambientais

Grupos de pesquisa:

Orcid: [orcid.org/0000-0002-6426-8474](https://orcid.org/0000-0002-6426-8474)

E-mail: [misilvafbq@gmail.com](mailto:misilvafbq@gmail.com)

Nome completo: Patricia do Rocio Dalzoto

Titulação: Doutorado

Afiliação institucional: Universidade Federal do Paraná

Grupos de pesquisa: LabMicro - UFPR

Orcid: [0000-0003-1041-4189](https://orcid.org/0000-0003-1041-4189)

E-mail: [pdalzoto@ufpr.br](mailto:pdalzoto@ufpr.br)

Nome completo: Paula Nunes de Oliveira

Titulação: Doutora em Química (título concedido pela UFSC)

Afiliação institucional: Université Claude Bernard Lyon 1 - FR

Grupos de pesquisa: IMP - Ingénierie des Matériaux Polymères

Orcid: [0000-0002-8262-4575](https://orcid.org/0000-0002-8262-4575)

E-mail: [paulaoliveiraqmc@gmail.com](mailto:paulaoliveiraqmc@gmail.com)

Nome completo: Rosângela Bergamasco

Titulação: Doutora

Afiliação institucional: Universidade Estadual de Maringá

Grupos de pesquisa: Tratamento Avançado e Reuso de Águas; processos de separação e controle ambiental; Zoonoses de interesse em saúde; Tratamento, purificação e monitoramento de águas de abastecimento; Ecologia Agroindustrial; Grupo de Pesquisa em Tratamentos Convencionais e Avançados para Potabilização de Água para Consumo

Orcid: [orcid.org/0000-0002-2934-6641](https://orcid.org/0000-0002-2934-6641)

E-mail: [rbergamasco@uem.br](mailto:rbergamasco@uem.br)

Nome completo: Sandro Augusto Rhoden

Titulação: Doutorado em Biologia das Interações Orgânicas

Afiliação institucional: IFC - Instituto Federal Catarinense – Campus São Francisco do Sul.

Grupos de pesquisa: Biotecnologia Microbiana - UEM; Grupo de Pesquisa Multidisciplinar em Ciências e Geotecnologias - IF-Catarinense; Tecnologia e Qualidade Ambiental – IF - Catarinense

Orcid: [orcid.org/0000-0003-4071-1432](https://orcid.org/0000-0003-4071-1432)

E-mail: [sandro.rhoden@ifc.edu.br](mailto:sandro.rhoden@ifc.edu.br)

Nome completo: Vanessa Kava

Titulação: Doutorado

Afiliação institucional: Universidade Federal do Paraná

Grupos de pesquisa: Microrganismos: caracterização, produtos e processos de interesse biotecnológico e agrícola - UFPR; Grupo de Energia e Ciências Térmicas - UFPR

Orcid: 0000-0001-8642-2236

E-mail: [vankava@ufpr.br](mailto:vankava@ufpr.br); [vanessagenetica@gmail.com](mailto:vanessagenetica@gmail.com)

Nome completo: Vânia Specian

Titulação: Doutora em Biologia Comparada

Afiliação institucional: Universidade Estadual de Maringá - UEM

Orcid: [orcid.org/0000-0002-4561-8686](https://orcid.org/0000-0002-4561-8686)

E-mail: [specian82@hotmail.com](mailto:specian82@hotmail.com)

Nome completo: Wanessa Algarte Ramsdorf

Titulação: Doutorado

Afiliação institucional: UTFPR - Universidade Tecnológica Federal do Paraná/ Campus Curitiba

Grupos de pesquisa: Grupo de Pesquisas em Ecotoxicologia; Toxicologia de Contaminantes Emergentes - GPTox

Orcid: 0000-0002-8341-1408

E-mail: [wanessar@utfpr.edu.br](mailto:wanessar@utfpr.edu.br)

Agradecemos ainda a Eduem, na pessoa da Editora-chefe, Luzmarina Hernandes, e da Diretora, Terezinha Oliveira. Agradecemos também à Reitoria da UEM, Prof. Dr. Mauro Baesso (Reitor), Prof. Dr. Julio César Damasceno (Vice-Reitor) e a Pró-Reitora de Pesquisa e Pós-Graduação da UEM, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Célia Regina Granhen Tavares, pelo apoio na publicação do livro.

ISBN 978-85-7628-734-6



9 788576 287346

