



**MATHEUS NICOLETTI MARASCALCHI**

**O EFEITO “*FUNGAL HIGHWAY*” MOBILIDADE BACTERIANA NAS HIFAS  
DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES**

**Lavras – MG**

**2022**

**MATHEUS NICOLETTI MARASCALCHI**

**O EFEITO “*FUNGAL HIGHWAY*”: MOBILIDADE BACTERIANA NAS HIFAS  
DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, área de concentração em Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo, para a obtenção do título de Mestre.

**Orientador**

Prof. Dr. Teotonio Soares de Carvalho

**Lavras – MG**

**2022**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Marascalchi, Matheus Nicoletti.

O efeito “Fungal Highway”: Mobilidade bacteriana nas hifas de  
fungos micorrízicos arbusculares / Matheus Nicoletti Marascalchi /  
Matheus Nicoletti Marascalchi. - 2022.

57 p.

Orientador(a): Teotônio Soares de Carvalho.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Fungal highways. 2. Fungos micorrízicos arbusculares. 3.  
rizobactérias. I. de Carvalho, Teotônio Soares. II. Título.

**MATHEUS NICOLETTI MARASCALCHI**

**O EFEITO “*FUNGAL HIGHWAY*”: MOBILIDADE BACTERIANA NAS HIFAS  
DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES**

**THE FUNGAL HIGHWAY EFFECT: BACTERIAL MOTILITY IN  
ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI HYPHAE**

**Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Lavras, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-graduação em Ciência do Solo,  
área de concentração Biologia,  
Microbiologia e Processos Biológicos  
do Solo, para obtenção do título de  
Mestre.**

**APROVADA em: 28 de fevereiro de 2022.**

**Dra. Fatima Maria de Souza Moreira - UFLA**

**PhD. Sidney Luiz Stürmer - FURB**

**Prof Dr. Teotonio Soares de Carvalho**

**Prof Dr. Teotonio Soares de Carvalho**

**Orientador(a)**

**LAVRAS-MG**

**2022**

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil (CNPq).

A Universidade Federal de Lavras (UFLA), ao Departamento de Ciência do Solo (DCS) e ao Programa de Pós Graduação em Ciência do Solo pela oportunidade concedida, a estrutura e a compreensão em meio a situação mundial, nacional e pessoal.

Ao meu orientador, Teotonio Soares de Carvalho, agradeço especialmente, por seu profissionalismo, apoio, amparo, paciência e total dedicação ao projeto que traçamos e executamos juntos, em meio a tantas dificuldades metodológicas. E especialmente por sua compaixão e humanidade perante às dificuldades pessoais que ocorreram durante a execução do projeto. Serei eternamente grato e levo você como um exemplo de profissional e ser humano.

Ao professor e amigo Sidney Luiz Stürmer, pelo auxílio, amizade e amparo durante toda a execução do projeto, por ceder os isolados de FMAs utilizados e o seu laboratório para execução das atividades.

Aos professores Ricardo Bittencourt e Hercílio Higino da Silva Filho, da Universidade Regional de Blumenau (FURB), por cederem seus laboratórios para a realização da pesquisa na presença das adversidades ocorridas.

Ao professor e amigo Jonathan Utzig, pela impressão 3D do molde de adaptador de microscópio utilizado para captura de imagens do trabalho.

Aos meus colegas graduandos, pós-graduandos, pós-doutorandos, professores e membros do meio acadêmico, que permitiram uma convivência agradável, feliz, e repleta de boas lembranças mesmo longe de casa. Agradeço em especial, ao *kameraden* Karl Kimmelmeier, parceiro de trabalho e peculiaridades, e ao amigo Thiago Zupa, companheiro de cozinha, panificação e conversas.

Aos meus pais, exemplos de dedicação, confiança e perseverança, que frente aos problemas pessoais e financeiros, estiveram sempre presentes em minha formação e foram fundamentais para formar minha identidade profissional durante o mestrado. E ao meu irmão, por me manter motivado e alegre durante estes anos de mestrado.

A Dona Consuelo e Seu Demetrius, companheiros de casa, amigos e parte da segunda família que formei em Lavras, agradeço pela estrutura de moradia, as noites de conversa e por aguentarem todas as ideias inusitadas propostas durante esses três anos.

Aos poucos amigos de Santa Catarina que se mantiveram presentes mesmo após meu distanciamento, agradeço por permanecerem em minha vida, mesmo quando eu estive ausente nas suas.

A minha namorada, Caroline Krug Vieira, exemplo de cientista, pessoa e chefe, que me auxiliou durante todo o projeto tanto de forma física quanto mental, permitindo que eu concluísse mais uma etapa de minha vida, atingindo o sucesso que ela sempre me fez acreditar que eu teria.

Aos meus sogros, Carmen Terezinha Krug e Djalma Vieira, hoje distantes do nosso plano mundano, porém eternizados em minha mente e coração, obrigado por todos os momentos de risada, brincadeira, silêncio, sarro e obrigado por terem me permitido fazer parte de suas vidas, irei amá-los até meu último suspiro, e à vocês dedico este trabalho.

## RESUMO GERAL

Bactérias e fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) são importantes componentes da biota do solo e prestam serviços fundamentais para as plantas e ao ecossistema. Entretanto, bactérias possuem limitações para se deslocar no solo, que podem ser parcialmente superadas pela locomoção através das hifas dos fungos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a motilidade de seis diferentes espécies de rizobactérias em hifas de *Gigaspora albida* em cultivo *in vitro*; e analisar a motilidade de quatro espécies de bactérias em hifas deste mesmo fungo simbioticamente associadas à plântulas de *Trifolium repens*. Dentre as seis estirpes analisadas, apenas células de *Pseudomonas* sp. e *Azorhizobium doebereinae* foram capazes de se deslocar nadando em hifas de FMAs, e apenas *Paenibacillus kribensis* não foi capaz de colonizar as hifas de *G. albida* ao longo da duração deste experimento. Entre as quatro espécies de bactérias analisadas em hifas de *G. albida* associadas com *T. repens*, novamente, apenas *Pseudomonas* sp. e *A. doebereinae* foram capazes de migrar nas hifas e não apresentaram distâncias significativamente maiores do que quando inoculadas apenas nas hifas do fungo. Também não foram constatadas diferenças significativas entre o avanço colonial entre hifas simbióticas e não simbióticas. Este é o terceiro estudo avaliando motilidade bacteriana em hifas de FMAs e os dados sugerem que a relação de transporte das bactérias por hifas independem da associação com um hospedeiro vegetal. Os resultados sugerem também que existem limitações no deslocamento bacteriano via *fungus highways* que não foram totalmente elucidados pelo trabalho. Estas limitações devem ser exploradas em futuros trabalhos incorporando fatores como motilidade em superfícies não fúngicas, diferentes espécies de FMAs e incorporação de fontes de nutrientes solúveis mediante ação bacteriana. Estas incorporações podem ser feitas através de adaptações nas metodologias desenvolvidas neste trabalho

**Palavras-chave:** • *fungus highway* • fungos micorrízicos arbusculares • rizobactérias • motilidade bacteriana

## GENERAL ABSTRACT

Bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are important components of soil biota and provide fundamental services for plants and the ecosystem; however, bacteria have limitations to move in the soil that can be solved by dislocating through fungal hyphae. The present work aimed to evaluate the bacterial cell's motility of 6 different species of soil bacteria in the hyphae of an AMF species in *in vitro* culture. And also to analyze the motility of 4 species of bacteria in hyphae of *G. albida* associated with seedlings of *Trifolium repens*. Among the 6 bacteria analyzed, only *Pseudomonas* sp. and *Azorhizobium doebereinae* were able to swim in AMF hyphae, and only *Paenibacillus kribensis* wasn't able to colonize *G. albida* hyphae. Among the 4 species of bacteria analyzed in hyphae of *G. albida* associated with *T. repens*, once again, only *Pseudomonas* sp. and *A. doebereinae* were able to migrate through AMF hyphae and did not show significantly greater distances than when inoculated only in fungal hyphae. There were also no significant differences between the colonial advance between symbiotic and non-symbiotic hyphae. This is the third study evaluating bacterial motility in AMF hyphae and the data suggest that the transport relationship of bacteria by hyphae is independent of association with a plant host. These limitations should be explored in future studies, incorporating factors such as motility on non-fungal surfaces, different AMF species and incorporation of soluble nutrient sources through bacterial activity. These incorporations can be made through adaptations in the methodologies developed in this work.

**Key-words:** • fungal highway • arbuscular mycorrhizal fungi • rhizobacteria • bacterial motility

## Sumário

1. Introdução.....	1
1.1. Dispersão de bactérias e sua importância para processos do solo.....	1
1.2. Implicações da água e da porosidade do solo na motilidade bacteriana.....	1
1.3. Tipos de movimentos bacterianos no solo.....	2
1.4. Interações entre fungos e bactérias do solo.....	4
1.5. Interações entre fungos micorrízicos arbusculares e bactérias do solo.....	7
2. Capítulo I - Elaboração das Metodologias testadas neste trabalho.....	10
3. Capítulo II.....	16
4. Estudo I: Avaliação da motilidade bacteriana de seis estirpes de rizobactérias pertencentes a diferentes gêneros em hifas de <i>Gigaspora albida</i> . ....	16
4.1. Introdução.....	16
4.2. Objetivos gerais.....	17
4.3. Hipóteses.....	18
4.4. Materiais e Métodos.....	18
FMA.....	18
Bactérias.....	18
Desinfestação e germinação dos esporos de FMAs.....	19
Desinfestação e germinação dos esporos de FMAs.....	19
4.5. <i>Geração e análises das imagens para mensurar a motilidade bacteriana</i> .....	19
4.6. Resultados.....	21
4.7. Discussão.....	25
5. Capítulo III.....	29
6. Estudo 2: Diferenças de motilidade bacteriana, em diferentes espécies de bactérias dos gêneros <i>Pseudomonas</i> e <i>Azorhizobium</i> (bactérias mais móveis) e <i>Bradyrhizobium</i> e <i>Rhizobium</i> (bactérias menos móveis) em hifas de <i>Gigaspora albida</i> simbióticas com <i>Trifolium repens</i> .....	29
6.1. Hipóteses.....	29
6.2. Objetivo geral.....	29
6.3. Materiais e métodos.....	29
Desinfestação e germinação de sementes.....	30
Análises estatísticas.....	30
6.4. Resultados.....	31
6.5. Discussão.....	34
6.6. Conclusões.....	36
7. Considerações finais.....	37

<b>8. Referências bibliográficas.....</b>	<b>38</b>
---	-----------

## **Introdução**

### **Dispersão de bactérias e sua importância para processos do solo**

O solo abriga uma enorme diversidade de organismos, entre eles bactérias, fungos, protozoários, nematóides, anelídeos e artrópodes (BARDGETT; VAN DER PUTTEN, 2014; BENDER et al., 2016). Desta vasta diversidade destacam-se as bactérias, tanto em riqueza/abundância quanto na diversidade de processos que medeiam; elas são organismos-chaves para os ciclos biogeoquímicos, como do carbono, nitrogênio e fósforo (LONG et al., 2016). Entretanto, devido ao seu tamanho diminuto, estes organismos possuem uma pequena área de influência individualmente, porém seu hábito colonial ameniza tal limitação, aumentando sua área de influência, (KUZYAKOV; BLAGODTSKAYA, 2015).

A dispersão das bactérias no solo pode ser mediada por fatores como dependência nutricional (BANITZ et al., 2012), predação (OTTO et al., 2017), atração por gradientes químicos oriundos de uma sinalização de outros organismos no solo (plantas, outros microrganismos e macrorganismos) ou também por condições químicas presentes no solo como alterações de pH, presença de metais tóxicos ou compostos antibióticos (WADHAMS; ARMITAGE, 2004). O escape dessas adversidades pode ser dar de formas diferentes (JARREL; MCBRIDE, 2008) como: i) natação (através do batimento flagelar), ii) motilidade condicional por “colonização” (multiplicação das bactérias ocasiona um deslocamento das demais bactérias sobre uma superfície) (FURUNO et al., 2010; HAQ et al., 2016), iii) contorções de pili tipo quatro (T4P, extensão e retração de proteínas T4), iv) deslize (presença de matrizes sólidas e relativamente secas que permitem que bactérias se fixem e deslizem) (NAN; ZUSMAN, 2011). Além das formas de locomoção ativas antes citadas, existem também as passivas, em que células bacterianas podem ser movidas através de superfícies pelo fluxo da água (HEKMAN et al., 1995), por ventos incidindo sobre a superfície do solo seco (KELLOGG; GRIFFIN, 2006), ou também sendo transportadas pela movimentação de outros organismos do solo, como protozoários, nematóides, anelídeos e raízes de plantas (DAANE et al., 1996; KOLHMEIER et al., 2005; WARMINK; VAN ELSAS, 2009; GLAESER et al., 2016).

### **Implicações da água e da porosidade do solo na motilidade bacteriana**

A umidade do solo é essencial para a motilidade de células bacterianas, de modo que solos mais úmidos facilitam a dispersão destes organismos. Por exemplo, conforme demonstrado por Griffin e Quail (1968), *Pseudomonas aeruginosa* é capaz de se deslocar

20 mm em 24h em solos úmidos (acima de 37% de conteúdo de água), porém não foi capaz de se deslocar em condições secas (abaixo de 17,5% de conteúdo de água). Como também demonstrado por Tecon e Or (2016), a capacidade de deslocamento de *P. protegens* caiu de aproximadamente 40 µm em 24h para zero em um meio com baixo teor de água (-2 kPa, resultando em filmes d'água finos e desconexos). Portanto, a baixa disponibilidade de poros preenchidos com água, ocasionada por condições de pouca umidade no solo, é um fator extremamente limitante a motilidade das bactérias no solo (YANG; VAN ELSAS, 2018).

A porosidade do solo é condicionada por múltiplos fatores como textura, mineralogia, estrutura, atividade biológica, entre outros. No caso da textura, por exemplo, solos com maior teor de areia tendem a ter maior macroporosidade do que solos mais argilosos. Desse modo, devido à sua influência na quantidade e nos tipos de poros presentes no solo, com conseqüente influência na infiltração e na retenção de água, a textura relaciona-se também com a motilidade das bactérias no solo, primariamente pelas características da rede de poros, mas também pelas forças de atração exercidas pelas superfícies às quais as bactérias são expostas (MACDONALD; DUNIWAY, 1978), que oferecem resistência à motilidade bacteriana (YANG; VAN HELSAS, 2018). Além disso, o grau de hidrofobicidade de um solo pode facilitar ou dificultar o deslocamento das bactérias. Solos hidrofóbicos dificultam a retenção de água nos poros e a formação de filmes d'água, enquanto solos hidrofílicos retêm mais água, promovendo uma maior formação de filmes d'água e uma maior conectividade entre os poros preenchidos por água, permitindo um maior deslocamento das bactérias através destes filmes, como demonstrado por Goebel et al. (2011).

## **Tipos de movimentos bacterianos no solo**

### *Movimento ativo*

Quando conectados por água, os poros do solo permitem que as bactérias se desloquem por motilidade flagelar ou por movimento Browniano (movimento aleatório de partículas suspensas num fluido, resultante da colisão com átomos ou moléculas) (GRIFFIN; QUAIL, 1968). Quando as bactérias possuem flagelo, o movimento proporcionado por ele supera a força estocástica do movimento Browniano (ABU-ASHOUR et al., 1994), permitindo que a bactéria se desloque em direções específicas

como, por exemplo, na direção de um gradiente químico (quimiotaxia). Bashan (1986), por exemplo, demonstrou o deslocamento preferencial de *Azospirillum brasilense* e *Pseudomonas fluorescens*, que migraram até 80 mm no solo num intervalo de 96 horas, em direção a plântulas de trigo.

#### *Movimento passivo*

O movimento passivo no solo pode ocorrer por fluxo de água, ação de ventos e até mesmo por carreamento através de outros organismos. Em sua revisão, Yang e Van Elsas (2018) apontam que estes movimentos passivos estão diretamente relacionados a algumas propriedades do solo como classe textural, tipo de argila, acidez, temperatura, composição química da solução do solo, entre outras. Esses autores também indicam que o fluxo de água, tanto natural (chuvas) quanto antrópico (irrigação), pode transportar passivamente organismos de tamanho diminuto no solo, como bactérias e archaeas, por até 400 mm. Através do ar, bactérias são capazes de serem translocadas por distâncias ainda maiores quando aderidas a partículas de solo, podendo atingir até 8000 m de altura e 5000 km de distância (KELLOGG; GRIFFIN, 2006; MELONI et al., 2007). Entretanto, apenas bactérias que resistam a esse tipo de ambiente se beneficiam deste tipo de movimento, uma vez que necessitam sobreviver à radiação UV, dessecação e congelamento, como é o caso de bactérias formadoras de esporos (*Bacillus* spp) (PROSPERO et al., 2005).

#### *Organismos mediando a motilidade bacteriana no solo*

Visto que a camada superficial do solo encontra-se predominantemente insaturada de água, a capacidade das bactérias do solo moverem-se por conta própria é bastante limitada devido à presença de espaços vazios (espaços ocupados por gases no solo) que interrompem os filmes d'água mais espessos, reduzindo assim a conectividade dos canais preenchidos por água no solo, e criando "ilhas" onde as bactérias podem ficar isoladas (YANG; VAN ELSAS, 2018). Entretanto, embora seja muito difícil para as bactérias moverem-se através desses bolsões de ar por conta própria, elas podem vencer essa limitação através de "caronas" em outros organismos como é o caso de minhocas, nematóides, protozoários, fungos e raízes que se deslocam ou crescem dentro do solo.

Bactérias são capazes de colonizar a drilosfera (região sob influência de minhocas) e de serem transportadas por anelídeos e nematóides, tanto na superfície de seus corpos como também em seus aparatos digestivos (HEKMAN et al., 1995; DAANE

et al., 1996). Essa forma de dispersão pode ser seletiva, a depender do hospedeiro (BYZOV et al., 2007; SINGH et al., 2015). Por fim, a morte destes organismos gera ainda novo sítio de crescimento para as bactérias transportadas, proporcionando um aumento em sua abundância.

Além do transporte ativo das bactérias realizado pela fauna do solo, o crescimento de hifas e raízes gera ainda uma movimentação passiva, carregando bactérias que estão fixadas na superfície destas estruturas, principalmente nas regiões apicais (YANG; VAN ELSAS, 2018), como o caso de cepas de *Klebsiella* sp, capazes de se fixar na zona de alongamento de raízes de *Poa pratensis*, assim migrando conforme as raízes crescem (HAAHTELA et al., 1986). Kamilova e colaboradores (2005), mostraram também que estirpes de *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *Pantoea agglomerans* e *Aeromonas hydrophila*, todas bactérias móveis, migraram pelas raízes de tomateiros.

### **Interações entre fungos e bactérias do solo**

Estudos relacionando o crescimento fúngico e a motilidade bacteriana no solo tem crescido nos últimos anos (KOHLMEIER et al., 2005; WARMINK; VAN ELSAS, 2009; FURUNO et al., 2012; WORRICH et al., 2016; YANG et al., 2016), entretanto, esta relação já havia sido sugerida muito antes (WONG; GRIFFIN, 1976). Esta interação pode ocorrer em diversos ascomicetos e basidiomicetos; estudos com o basidiomiceto *Lyophyllum* sp. estirpe Karsten demonstraram uma facilitação no transporte de células de *Paraburkholderia* (WARMINK; VAN ELSAS, 2009; NAZIR et al., 2012), e até mesmo uma mediação na dispersão de outra bactéria associada, *Dyella japonica* BS013 (organismo incapaz de migrar sozinho por hifas) (WARMINK et al., 2011). Foi demonstrado também que diversas estirpes do gênero *Fusarium*, foram capazes de facilitar a dispersão de *Stenotrophomonas maltophilia* e *Ochrobactrum pectoris*, até 40 mm de distância do ponto original de inoculação no solo (SIMON et al., 2015). Furuno e colaboradores (2012) demonstraram ainda que oomicetos da espécie *Pythium ultimum* transportaram células bacterianas através de poros preenchidos por ar. Por fim, o estudo de Bannitz e colaboradores (2016) demonstrou que hifas de ascomicetos permitiram que células bacterianas acessassem compostos naturais e antropogênicos no solo, acelerando a degradação dos mesmos.

Apesar dos diversos benefícios proporcionados pela migração bacteriana em hifas, o fenômeno pode ser limitado pela natureza do fungo. Hifas hidrofílicas facilitam a migração das bactérias, já as hidrofóbicas podem impedir a migração por não formarem

um filme d'água em sua superfície, por onde as bactérias se deslocariam (VILA et al., 2016; YANG; VAN ELSAS, 2018), entretanto, esta limitação estaria relacionada apenas ao movimento ativo por natação das bactérias. Para que a migração bacteriana ocorra pelas hifas, YANG; VAN ELSAS (2018) propuseram um modelo baseado em sete (7) etapas:

- 1) *Aproximação*: Bactérias do solo se aproximam de uma superfície fúngica, emergente ou existente, usando quimiotaxia. A aproximação pode ser resultado de um crescimento da hifa, que posiciona o fungo próximo o suficiente das células bacterianas. Outra forma seria pelo transporte das bactérias através de outros organismos (outras hifas, raízes ou minhocas) que levariam as bactérias até a proximidade da hifa a ser colonizada.
- 2) *Fixação*: Algumas bactérias são capazes de se fixar na superfície do fungo em regiões ricas em nutrientes (ápice da hifa). Nesta etapa estruturas como o sistema de secreção tipo 3 (T3SS) e a pili tipo-quatro podem auxiliar na fixação
- 3) *Crescimento*: Fixadas na hifa, as células bacterianas podem começar a utilizar os nutrientes e substrato (e.g. exopolissacarídeos) disponibilizados pelo fungo e crescer em sua superfície.
- 4) *Dispersão*: Algumas células especializadas (que possuem motilidade) podem se dispersar por quimiotaxia. Esta etapa é dinâmica e crucial para o sucesso da colonização da hifa, uma vez que conforme bactérias colonizam e se reproduzem em regiões do fungo, elas esgotam os nutrientes desse local, necessitando assim migrar para áreas que ainda sejam ricas em nutrientes. A competição entre diferentes espécies de bactérias e a presença de água na superfície da hifa (movimento de natação das bactérias) são fatores determinantes para esta etapa.
- 5) *Estabelecimento e formação de um novo nicho*: Seguindo a migração, células bacterianas especializadas alcançam novos microsítios na superfície fúngica e ali podem repetir os passos 1-4.

- 6) *Formação de biofilme*: Seguindo os passos anteriores, eventualmente, grandes populações de células bacterianas irão ocupar toda superfície fúngica, formando assim biofilmes.
- 7) *Descarregamento*: Bactérias são liberadas no solo pelo desprendimento das hifas ou pela morte das células fúngicas. Isto potencialmente resulta em novos *hotspots* microbianos no solo.

Além das interações discutidas acima, uma importante interação entre bactérias e fungos do solo é o fenômeno chamado de "*fungus highways*", no qual bactérias utilizam os filamentos de água envolvendo hifas fúngicas para se moverem no solo e cruzar bolsões de ar intransponíveis para as maiorias das bactérias quando por conta própria (KOHLMEIER et al., 2005). O uso destas hifas como "*highways*" para transportar bactérias no solo já fora hipotetizado como uma forma das bactérias atingirem micro-habitats mais interessantes para suas respectivas ecologias (WARMINK et al., 2010). Diversos estudos testaram o uso destas possíveis "*highways*" como formas de transporte de bactérias (KOHLMEIER et al., 2005; WARMINK et al., 2010; BANNITZ et al., 2013; SIMON et al., 2015).

## Interações entre fungos micorrízicos arbusculares e bactérias do solo

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) estão incluídos no Filo Glomeromycota, classe Glomeromycetes, formando um grupo monofilético com quatro ordens (Archaeosporales, Diversisporales, Glomerales e Paraglomerales), 12 famílias, divididas em 34 gêneros e cerca de 303 espécies descritas (WYJAYAWARDENE et al., 2018). Estes organismos datam de cerca de 400 milhões de anos e são reconhecidos como uma peça fundamental na conquista do ambiente terrestre pelas plantas (PIROZYNSKI, 1981; TABATABAI et al., 1995; FITTER, 2005; PARNISKE, 2008). Caracterizados por estabelecer uma relação simbiótica mutualista obrigatória com raízes de cerca de 72% das espécies vegetais descritas, (BRUNDETT; TEDERSOO, 2018) estes organismos são classificados como simbiotróficos obrigatórios, ou seja, necessitam de um hospedeiro metabolicamente ativo para completar seu ciclo de vida (FITTER, 2005).

Chagnon et al. (2013) sugerem que os FMAs podem apresentar diferentes interações com o ambiente/fenótipos de acordo com sua filogenia, ou seja seus comportamentos acerca de captação de recursos, investimento em crescimento e reprodução de acordo com suas respectivas famílias (Tabela 1).

**Quadro 1** - Diferenças observadas na aquisição de recursos, investimento no crescimento e reprodução de três famílias de FMAs.

<b>Comportamento fúngico</b>	<b>Gigasporaceae</b>	<b>Acaulosporaceae</b>	<b>Glomeraceae</b>
<b>Absorção de fósforo</b>	Alta	Baixa	Baixa
<b>Proteção contra patógenos</b>	Alta	Baixa	Alta
<b>Produção de esporos</b>	Baixa	Alta	Alta
<b>Esporos</b>	Se desenvolvem a partir de uma célula bulbo formada no final de uma hifa fértil conectada com as raízes micorrizadas. Pode ocorrer dentro da raiz	Se desenvolvem lateralmente a partir de um sáculo esporífero.	Desenvolvem-se no final de uma hifa esporogênica e na maioria das espécies, se desenvolve a partir de hifas extraradiculares. Pode ocorrer dentro da raiz, podem produzir esporos isolados ou esporocarpos

<b>Célula auxiliar</b>	forma aglomerados	-	-
<b>Micorriza</b>	Consiste apenas em arbúsculos e hifas	Arbúsculos, vesículas irregulares e hifas intrarradiculares	Arbúsculos, vesículas (nem sempre formadas) e hifas intra e extrarradiculares.
<b>Tempo para esporulação</b>	Eleva em sistemas temperados	Decai em sistemas temperados	Cedo e constante
<b>Produção de hifas</b>	Alta	Baixa	Baixa
<b>Taxa de crescimento</b>	Baixa	-	Alta/intermediária
<b>Habilidade de recuperação</b>	Eficiente/moderado	-	Eficiente/rápido

Adaptado de ABBOTT; ROBSON (1981); HART; READER (2002); MAHERALI; KLIRONOMOS (2007) e CHAGNON et al. (2013).

Desta forma, os efeitos morfológicos oriundos das diferenças filogenéticas de uma comunidade de FMAs são passíveis de induzir diferenças na composição de outros organismos no solo, como as comunidades bacterianas (ANDRADE et al., 1997; RILLIG et al., 2006). No experimento de Rillig et al. (2006) as famílias Acaulosporaceae, Gigasporaceae e Glomeraceae quando associadas às comunidades microbianas apresentaram diferenças significativas nos seus comprimentos de hifas, sendo que Gigasporaceae teve o maior comprimento. Em contrapartida, as plantas colonizadas por esta família apresentaram valores inferiores de biomassa fúngica na raiz comparado às outras duas famílias.

A microbiota no solo pode também responder de diferentes formas quando associadas aos FMAs. Membros da família Glomeraceae, por exemplo, promovem o desenvolvimento de alguns grupos bacterianos, como Firmicutes, Streptomyces e membros da família Oxalobacteraceae (Proteobacteria), de modo que tais organismos se desenvolvem associados às hifas dos FMAs (ANDRADE et al, 1997; SCHEUBLIN et al., 2010). Já no estudo de Ferreira (2016), a interação entre *Rhizophagus clarus* e maiores diversidades microbianas refletiu em maiores taxas de colonização micorrízica das raízes, demonstrando uma correlação direta na capacidade de colonização do FMA com a riqueza e diversidade filogenética bacteriana do solo. Outros parâmetros benéficos também foram observados para a associação de FMAs e comunidades bacterianas do solo,

como foi constatado por Rillig et al. (2006), que observou uma dependência de bactérias rizosféricas em relação aos FMAs para obtenção de carbono.

É sabido também que bactérias são de suma importância para a ecologia dos FMAs, atuando no favorecimento da germinação de esporos e na colonização de raízes graças à síntese de alguns compostos orgânicos, subprodutos de seus metabolismos (TYLKA; HUSSEY; RONCADORI; 1991; BONFANTE; ANCA, 2009; SCHERLACH; GRAUPNER; HERTWECK, 2013; SALVIOLI et al., 2016). Por outro lado, nem todas as interações entre bactérias e FMAs são benéficas para estes fungos. Estudos apontaram que certas bactérias são capazes de inibir a germinação de esporos e a produção de hifas (XIAO et al., 2008; LARSEN; CORNEJO; BAREA, 2009; LI et al., 2008). Parâmetros ambientais como o pH ácido podem suprimir a atividades dos FMAs, entretanto, Svenningsen et al. (2018) demonstraram que tal inibição pode estar relacionada à abundância de alguns grupos bacterianos, como os pertencentes às famílias *Acidobacteriaceae* Gp1, *Chitinophagaceae*, *Xanthomonadaceae*, e os gêneros *Nocardioides*, *Acidothermus*, *Arthrobacter*, *Lactobacillus*, *Pullanibacillus*, *Weissella*, *Dyella*, *Rhizomicrobium* e *Rhodanobacter*.

### **FMAs e as implicações do efeito “*Fungal-highway*”**

FMAs são organismos ubíquos nos solos globais, presentes em todos os ecossistemas terrestres (Redecker et al., 2013) e até mesmo em alguns semi-aquáticos (SUDOVÁ et al., 2015). Devido a sua ecologia única, associando-se diretamente às raízes de plantas biologicamente ativas, estes fungos possuem um enorme potencial para melhorar a saúde e desenvolvimento de plantas (Redecker et al., 2013). Analisando a ecologia dos organismos envolvidos nesta simbiose, torna-se claro a complementaridade de ambos para a exploração dos benefícios promovidos pelas *fungus highways*, uma vez que plantas por serem produtores primários, podem abastecer o fungo com exsudatos radiculares, e por consequência, fornecer energia química diretamente para as bactérias associadas às hifas do fungo. Além de possivelmente atuar como um fator de quimiotaxia para as bactérias do solo, uma vez que estes exsudatos radiculares servem como um atrativo para as bactérias do solo.

Estando diretamente conectados às raízes das plantas, é possível que estes fungos facilitem o recrutamento de bactérias do solo para compor o microbioma radicular. O aumento da motilidade bacteriana do solo, especialmente o movimento direcionado às

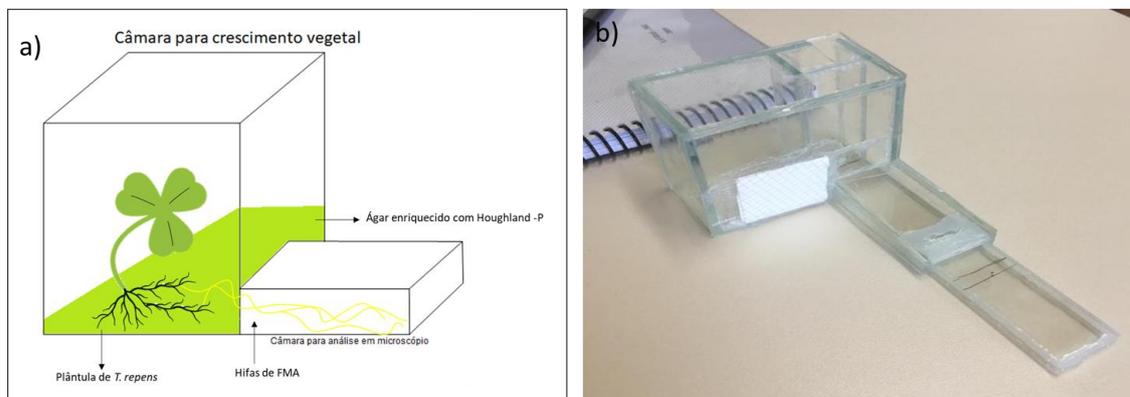
plantas, pode promover um acréscimo na diversidade e abundância de microrganismos na região da rizosfera, que por consequência aumenta a atividade das mesmas nos seus respectivos ciclos biogeoquímicos, favorecendo estes processos e acentuando seus respectivos resultados. Apesar disso, o fenômeno de fungal highways em hifas de FMAs permaneceu negligenciado até bem recentemente, quando Novais et al. (2020) reportaram a dispersão de *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110 através de hifas de *Glomus formosanum* entre *Urochloa decumbens* e *Glycine max*. Jiang et al. (2021), observaram uma maior mineralização de fósforo através do deslocamento de bactérias até o substrato através das hifas de *Rhizophagus irregularis* MUCL 43194. Entretanto, os autores relataram que as bactérias são incapazes de migrar até o substrato desejado se não forem abastecidas energeticamente através dos exsudatos hifais. Até o presente momento, estes são os dois únicos trabalhos que avaliaram o potencial das *fungus highways* associadas à FMAs, e ambos foram publicados durante a vigência do presente trabalho. Isso indica uma escassez de informação acerca deste assunto, apesar da importância ambiental e agrônômica dos FMAs.

## **Capítulo I - Elaboração das Metodologias testadas neste trabalho**

A utilização da metodologia de microcosmos em placas de Petri neste trabalho foi fruto do desenvolvimento e teste de diversas outras metodologias que ao decorrer do projeto foram se provando menos eficientes quando comparadas com a definitiva. Estas metodologias foram inicialmente necessárias devido à falta de equipamento especializado que permitisse trabalhar com as hifas e bactérias dentro de placas de Petri (microscópio confocal ou microscópio óptico invertido). Desde o início do projeto, buscou-se uma metodologia simples, que não envolvesse hormônios vegetais e nutrientes, que pudessem alterar o comportamento das bactérias e das hifas de FMA. Evitou-se também a utilização de cultura de tecido vegetal, como raízes transformadas (metodologia popularmente empregada em estudos com cultivo *in vitro* de micorrizas arbusculares) pelo difícil acesso ao material necessário e também pelos múltiplos hormônios vegetais necessários para sustentar o tecido vegetal. Para evitar tais problemas, um primeiro sistema de microcosmos foi elaborado, consistindo de múltiplas placas de vidro cortadas manualmente e fixadas com silicone, criando câmaras de crescimento compartimentalizadas para o crescimento da planta e do fungo (Figura 2.1). Entretanto, esta metodologia foi abandonada devido à dificuldade de produzir uma quantidade

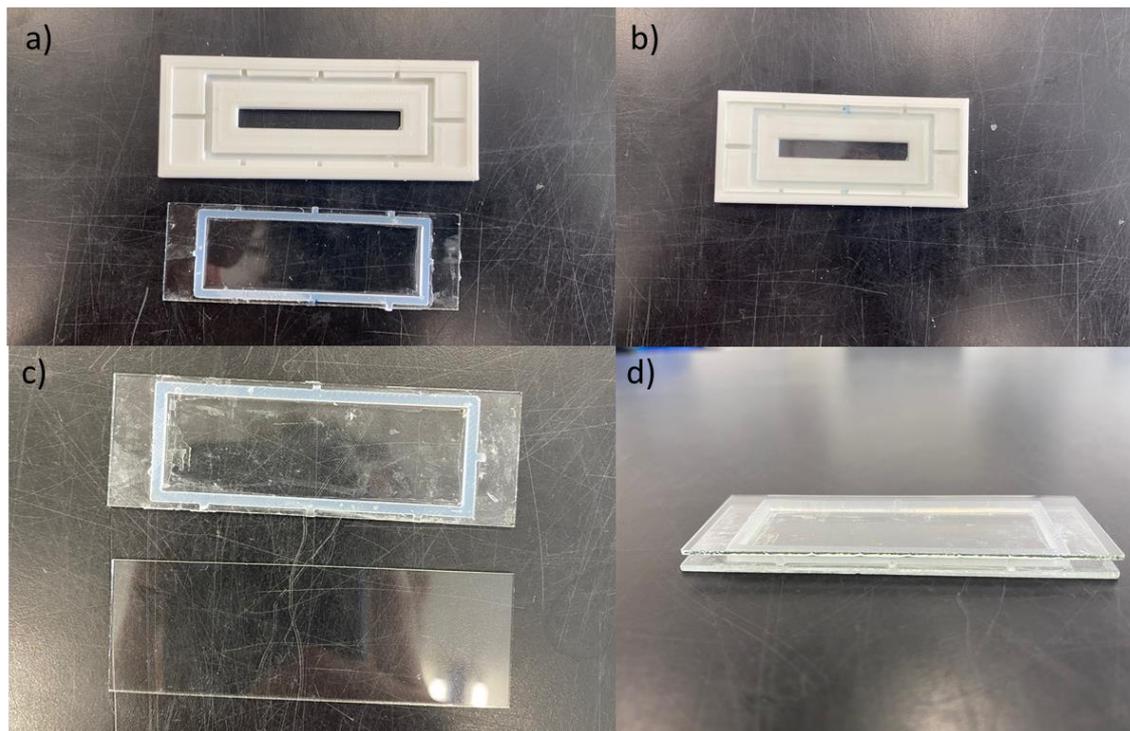
suficiente destes mesocosmos para conduzir um experimento com grande número de parcelas.

**Figura 2.1** - a) Esquema ilustrativo do estabelecimento do primeiro mesocosmo formulado. b) Modelo rudimentar do primeiro microcosmo.



Após as dificuldades encontradas com o primeiro sistema de mesocosmos, uma abordagem mais simples foi pensada. A utilização de duas lâminas de microscópio com filamentos de silicone entre elas, criando uma micro-câmara isolada e asséptica. Uma impressora 3D comercial (Ender 3 Pro) foi utilizada para facilitar a confecção desses microcosmos através de moldes impressos em filamento de ABS. As instruções para a produção deste microcosmo podem ser vistas na figura 2.2, e o *link* para os arquivos necessários para imprimir o molde encontram-se disponíveis numa plataforma digital, acessível pelo link <https://social.thangs.com/m/52224>.

**Figura 2.2** - Esquema de montagem do microcosmo. a) Molde feito em impressora 3D e utilizado para produzir os microcosmos. b) Inserir a lâmina de microscopia no molde, pressionar e fixar a lâmina no molde e introduzir o silicone pelos orifícios laterais do molde. Deixar secar por 24h. c) Com o auxílio de uma espátula, remover o microcosmo do molde. d) O microcosmo está pronto para receber uma lâmina com *agar pad* e ser fixado através de uma pressão contínua aplicada nas duas lâminas de microscopia.

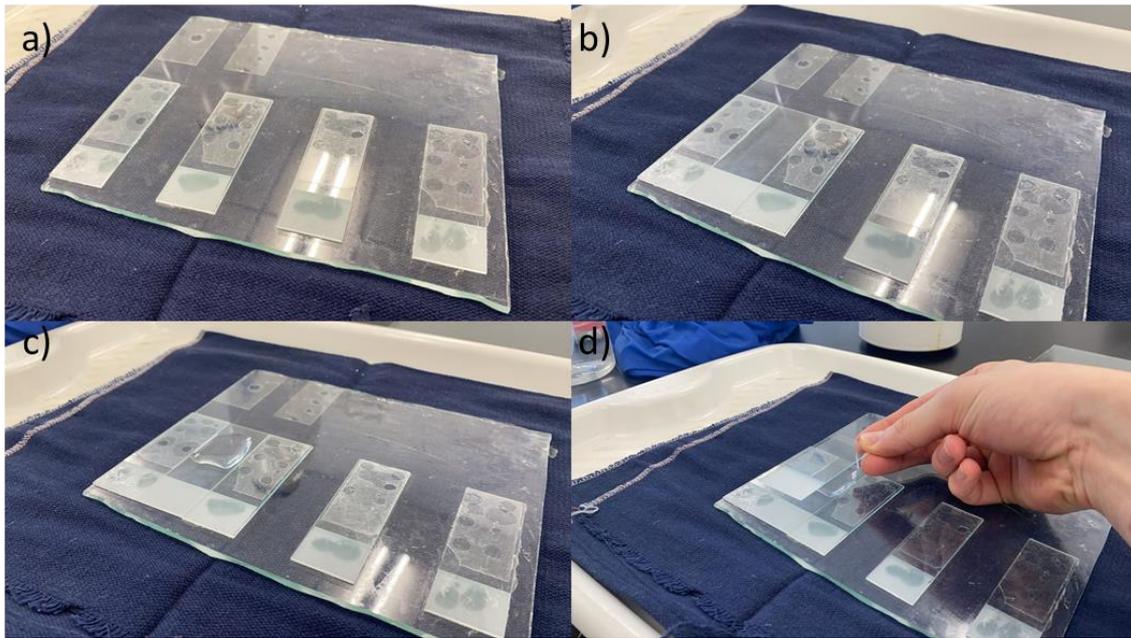


O último microcosmo descrito foi definido como a metodologia final e mais eficiente para a análise de *fungai highways* em microscópios ópticos de luz comuns. Entretanto, existia ainda a necessidade de desenvolver uma metodologia capaz de produzir filmes de ágar finos o suficiente para utilizar nesses microcosmos, uma vez que apenas verter o meio de cultura (ágar/água 2%) dentro dos mesmos não se provou eficaz. Para resolver tal problema, uma adaptação da metodologia de *agarose pads* (SKINNER et al., 2013) foi utilizada. As instruções para a produção destas lâminas de ágar estão descritas na imagem abaixo (Figura 2.3), e podem ser ajustadas para confeccionar lâminas com qualquer espessura desejada.

**Figura 2.3** - Passo-a-passo para a confecção de lâminas de microscópio com *agar pads*.

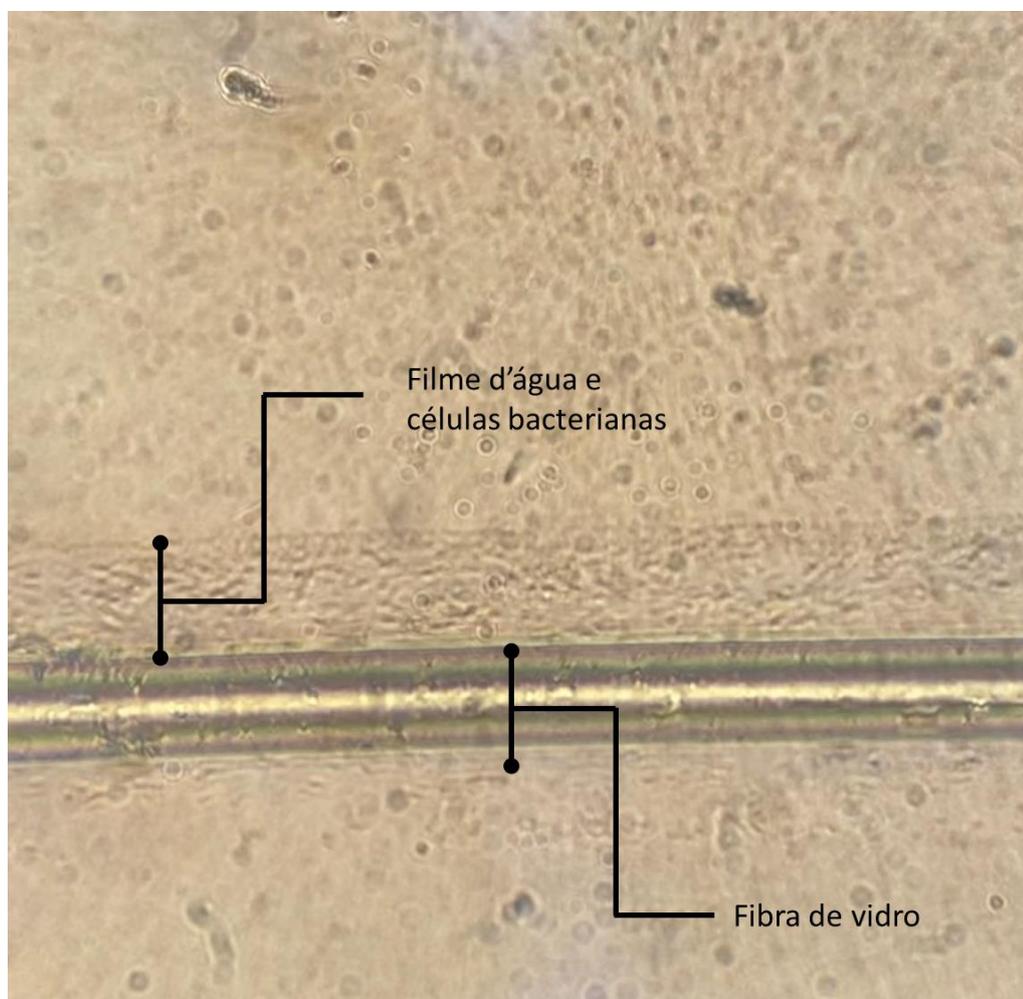
a) Usando silicone, colar lamínulas em lâminas de microscopia e colar essa nova lâmina em uma superfície de vidro, aos pares. b) entre as lâmina coladas no vidro, inserir uma lâmina nova de microscopia. c) adicionar o volume desejado de ágar sobre a lâmina posicionada. d) com uma segunda lâmina, pressionar o ágar sobre a outra lâmina e deixar repousar por cerca de 5 minutos. Remover a lâmina superior com cuidado para evitar defeitos no *agar pad*. Remover a lâmina debaixo onde o *agar pad* estará aderido. Todos

os passos devem ser realizados em câmara de fluxo laminar.



Essas câmaras mostraram-se bastante úteis para o estudo das interações entre FMA e bactérias, permitindo a produção de imagens bastante nítidas das células bacterianas mesmo em um microscópio comum (Figura 2.4), devido à baixa altura dessas câmaras.

**Figura 2.4** - Imagens obtidas com os microcosmos desenvolvidos no projeto. Imagens realizadas em microscópio óptico, na objetiva de 40x.



Entretanto, devido à disponibilidade de um microscópio de objetiva invertida, a metodologia final utilizada neste trabalho dispensou a confecção dessas câmaras e baseou-se em placas de Petri, já que a altura da amostra não é tão limitante nestes microscópios em comparação aos microscópios comuns, possibilitando realizar os experimentos em placas de Petri comuns (Figura 2.5).

**Figura 2.5** - Microscópio invertido utilizado para avaliação do experimento em placas de Petri.



## Capítulo II

### **Estudo I: Avaliação da motilidade bacteriana de seis estirpes de rizobactérias pertencentes a diferentes gêneros em hifas de *Gigaspora albida*.**

#### **Introdução**

O solo é um ambiente amplamente estruturado e de condições mutáveis, o que leva a uma grande heterogeneidade, tanto espacial como temporal em suas condições (STANDING; KILLHAM, 2007). A porção viva do solo não é apenas passivamente influenciada pelas condições abióticas, mas está continuamente alterando o solo, criando diversos novos nichos para outros organismos (MARSCHNER et al., 2001; WATERFIELD et al., 2004). Assim, novos microhabitats no solo são formados constantemente, através da movimentação, crescimento e morte dos organismos, como os fungos (DE BOER et al., 2005; FREY-KLETT et al., 2007), bactérias, invertebrados e raízes de plantas (MARSCHNER et al., 2001). Bactérias que colonizam esses novos microhabitats são essenciais para o funcionamento do solo, atuando em processos como a degradação de matéria orgânica (TORSVIK et al., 2002; WARMINK et al., 2010) e de poluentes no solo (HARMS; WICK, 2006) e também a conversão de compostos em sua forma orgânica para as formas inorgânicas para posterior utilização pelos demais organismos do solo (BONFANTE; ANCA, 2009), entre outros.

Bactérias e fungos possuem uma longa história de coevolução, relacionando-se de formas íntimas, que garantiram o sucesso de ambos os grupos (BOER et al., 2005). Sabe-se que estas interações podem diferir amplamente, variando entre relações benéficas ou não, e também interações físicas e químicas. As interações entre estes dois grupos de microrganismos podem variar desde processos meramente físicos, como o caso de *Pseudomonas fluorescens* que é capaz de se ancorar na superfície de micélios utilizando seu flagelo (SEN et al., 1996), ou também colonizar diferentes tipos de micélio (vital e não-vital) na micorrizosfera (TOLJANDER et al., 2006). Mas também podem ser mais complexos, envolvendo uma vasta rede de comunicação química e metabólica, como observado em bactérias endossimbiontes de fungos, ou que necessitam exclusivamente dos exsudados hifais para sobreviver (de BOER et al., 2005).

Bactérias são organismos aquáticos com uma motilidade extremamente limitada, dependendo da presença de meios aquosos ou de outros organismos para se deslocar. A dinâmica hídrica de um solo nem sempre possibilita a dispersão destes organismos de

uma forma constante, uma vez que o preenchimento dos poros por água se faz necessário para que bactérias possam migrar através da matriz do solo (TECON; OR, 2017). Entretanto, poros preenchidos por ar podem ser transpassados por bactérias, desde que exista alguma conexão entre eles, como hifas (SCHAFER et al., 1998). O uso destas hifas como “*highways*” por onde bactérias do solo consegue se deslocar através de nado nos filmes d’água formados na superfície do micélio já foi demonstrado como uma estratégia adotada por bactérias para atingirem microsítios ideais para seu desenvolvimento no solo (WARMINK et al., 2010). Diversos estudos testaram o uso destas possíveis “*highways*” como meios para o deslocamento de bactérias (KOHLMEIER et al., 2005; WARMINK et al., 2010; BANITZ et al., 2013; SIMON et al., 2015). Dado o fato de que o movimento das bactérias no solo pode ser severamente restringido por condições abióticas (regime hídrico, textura do solo, relação de macro e microagregados) (TECON; OR, 2017), chegar em novos microhabitats através da migração por hifas de fungos do solo pode ser uma estratégia determinante para o sucesso de algumas bactérias no solo (WARMINK; VAN ELSAS, 2009) .

Fungos micorrízicos arbusculares são organismos ubíquos e compõem grande parte das redes de hifas nos solos, podendo conectar poros e romper barreiras intransponíveis às bactérias. Apesar de sua enorme importância ecológica, esses fungos ainda foram pouco estudados quanto à sua capacidade de facilitar o deslocamento de bactérias do solo, havendo até agora apenas dois trabalhos abordando o tema (DE NOVAIS et al., 2020; JIANG et al., 2021). O fato de esses fungos estarem diretamente conectados às raízes de plantas torna o fenômeno de *fungus highway* especialmente relevante uma vez que as hifas desses fungos poderiam servir como meio para as bactérias do solo se deslocarem em direção às raízes das plantas para compor o microbioma vegetal.

### **Objetivos gerais**

- Avaliar a capacidade de diferentes rizobactérias se deslocarem ao longo de hifas de um fungo micorrízico arbuscular.
- Avaliar as diferenças na migração de espécies de rizobactérias nas hifas de FMA.

## Hipóteses

H1: Na presença de hifas de fungos micorrízicos arbusculares, as rizobactérias estudadas foram capazes de colonizar uma área superior àquela de colônias não associadas às hifas fúngicas;

H2: A capacidade de utilizar hifas de fungos micorrízicos arbusculares para se deslocar foi variável entre as bactérias testadas.

## Materiais e Métodos

### FMA

A princípio, 9 espécies de FMAs foram escolhidas para o estudo, entretanto, apenas o isolado de *Gigaspora albida* N.C. Schenck & G.S. Sm. (isolado SCT238B) se demonstrou eficiente em produzir hifas após o processo de desinfecção superficial dos esporos, portanto foi utilizado no trabalho, este é oriundo da Coleção Internacional de Cultura de Glomeromycota (CICG), da Universidade Regional de Blumenau – FURB, descrito no Quadro 2.

**Quadro 2** – Espécie de FMA utilizada nos ensaios e seu respectivo código de depósito na CICG.

Família	Espécie	Código
Gigasporaceae	<i>Gigaspora albida</i>	SCT238B

### Bactérias

As bactérias utilizadas foram obtidas na coleção de bactérias do Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Ciência do Solo (UFLA), descritas no Quadro 3.

**Quadro 3** - Relação de bactérias e seus códigos de depósito na coleção de bactérias do laboratório de bacteriologia - UFLA.

Espécie	Código
<i>Rhizobium tropici</i>	BR322
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	UFLA 04-571
<i>Paenibacillus kribbensis</i>	UFLA03-10
<i>Paraburkholderia fungorum</i>	UFLA04-155
<i>Azorhizobium doebereineriae</i>	BR5401
<i>Pseudomonas</i> sp.	UFPI B5-8A

### **Desinfestação e germinação dos esporos de FMAs**

Os esporos de FMAs foram extraídos via peneiragem úmida e gradiente de sacarose e submetidos a uma desinfestação superficial adaptada do protocolo proposto por Nair e colaboradores (1991), composto de imersão dos esporos em solução Tween 20 (2%) por 5 minutos, cloramina-T 2% por 5 minutos, e por fim, solução de sulfato de estreptomicina 200 mg L<sup>-1</sup> e Gentamicina 200 mg L<sup>-1</sup> por 5 minutos, seguida de uma lavagem em água destilada autoclavada por 5 minutos. Por fim, os esporos foram mantidos em uma câmara de crescimento vegetal (28 °C, sem presença de luz) para germinação em meio de cultura ágar-água (2%).

### **Microrganismos utilizados**

Os microcosmos utilizados consistiram de placas de Petri de 100 mm de diâmetro, preenchidas com 10 ml de meio de cultura ágar-água (2%), inoculadas com 1-3 esporos de *G. albida* previamente desinfestados e germinados (conforme metodologias descritas abaixo), e inoculados a partir de colônias bacterianas crescidas em meio de cultura 79 sólido (FRED; WAKSMAN, 1928). A inoculação foi feita utilizando agulhas de insulina. Para tal, a ponta da agulha foi utilizada para captar as colônias mais novas e individualizadas da placa que apresentassem características morfológicas similares entre si.

### **Desinfestação e germinação dos esporos de FMAs**

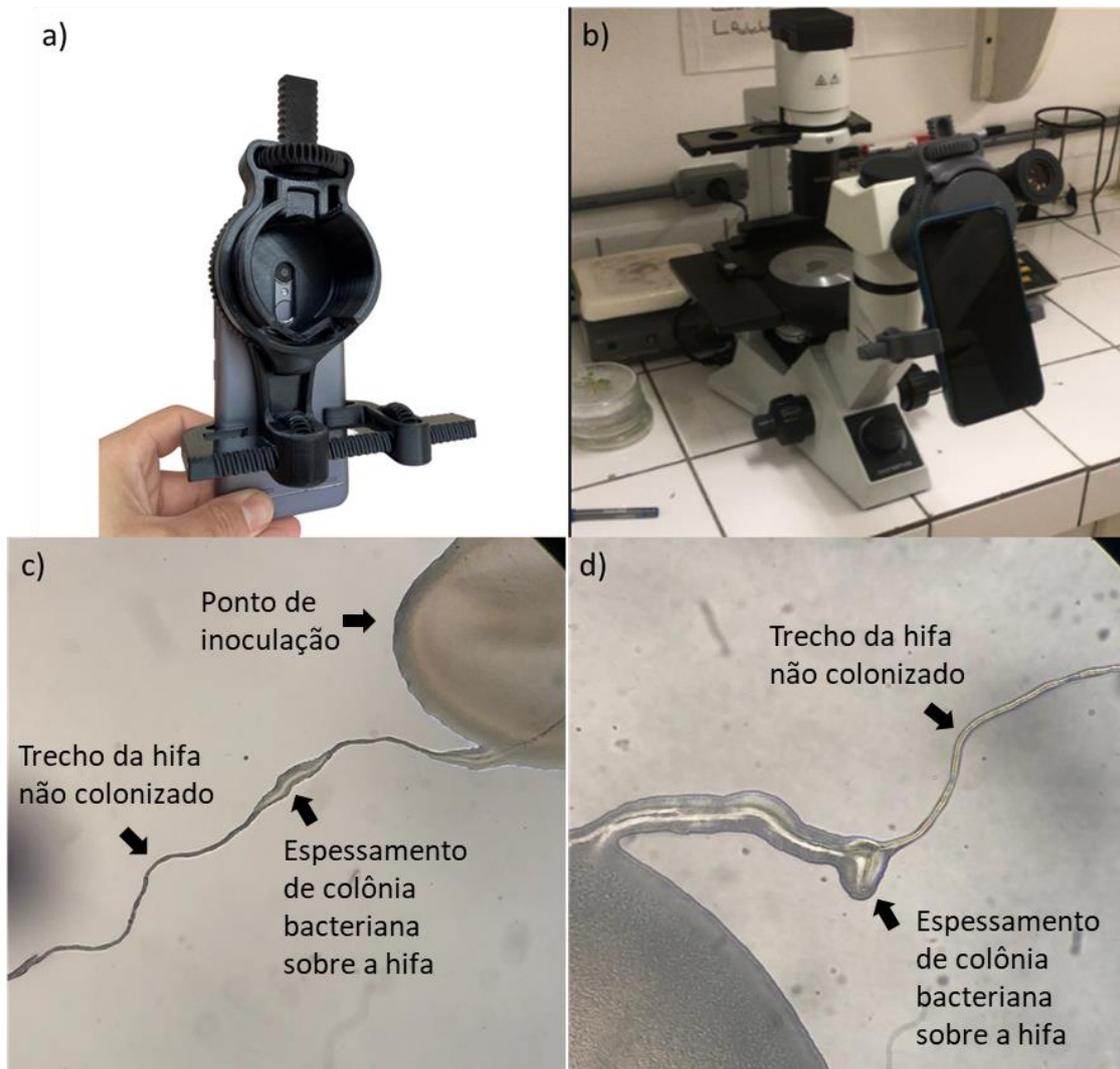
Os esporos de FMAs foram extraídos via peneiragem úmida e gradiente de sacarose e submetidos a uma desinfestação superficial adaptada do protocolo proposto por Nair e colaboradores (1991), composto de imersão dos esporos em solução Tween 20 (2%) por 5 minutos, cloramina-T 2% por 5 minutos, e por fim, solução de sulfato de estreptomicina 200 mg L<sup>-1</sup> e Gentamicina 200 mg L<sup>-1</sup> por 5 minutos, seguida de uma lavagem em água destilada autoclavada por 5 minutos. Por fim, os esporos foram mantidos em uma câmara de crescimento vegetal (28 °C, sem presença de luz) para germinação em meio de cultura ágar-água (2%).

### *Geração e análises das imagens para mensurar a motilidade bacteriana*

As imagens foram captadas através da câmera de celular (12 megapixels), com uma ampliação fixa. O celular foi acoplado no microscópio usando um suporte impresso em impressora 3D (Figura 3.1). A mensuração da distância percorrida pelas bactérias através da motilidade celular e o avanço colonial foram feitas através da função NeuronJ

no software ImageJ (MEIJERING et al., 2004). Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguido de teste de Tukey no ambiente R 3.5.3 (CRAN, 2022)..

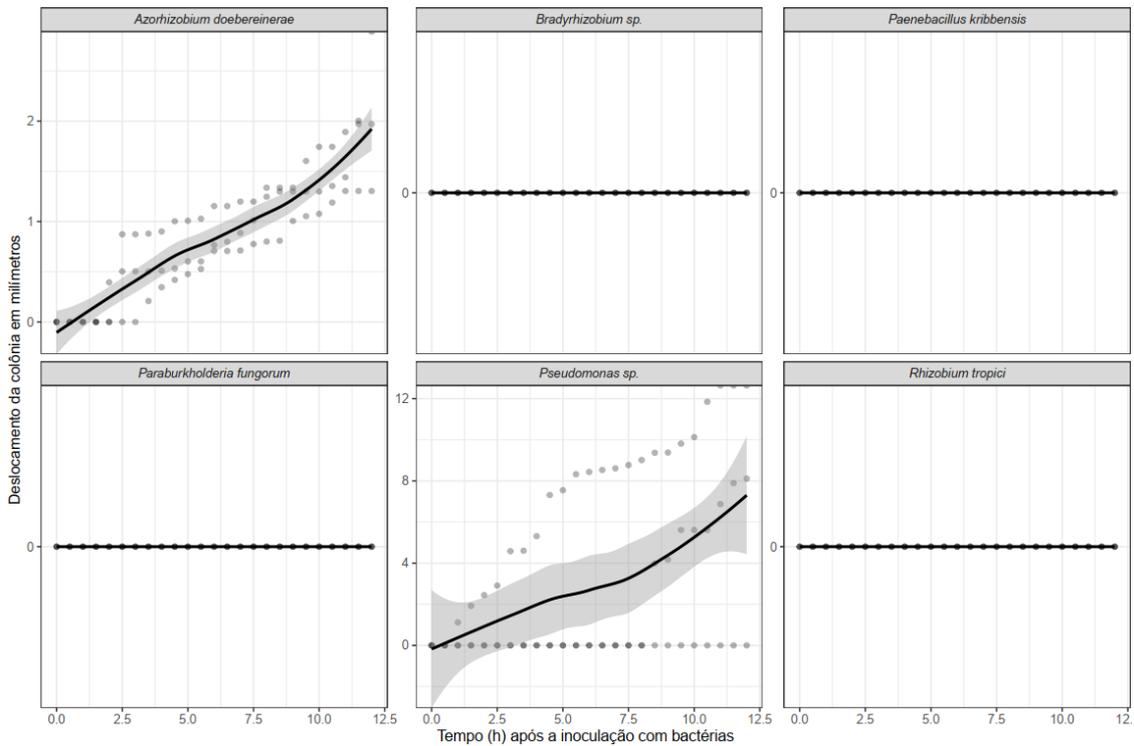
**Figura 3.1** - Suporte para acoplar celular na ocular de microscópio óptico, produzido em impressora 3D, a) suporte desacoplado do microscópio, b) suporte acoplado no microscópio, c) e d) imagens obtidas utilizando celular (câmera 12 megapixels) e suporte impresso, imagens capturadas nas objetivas de 200x e 400x, respectivamente.



## Resultados

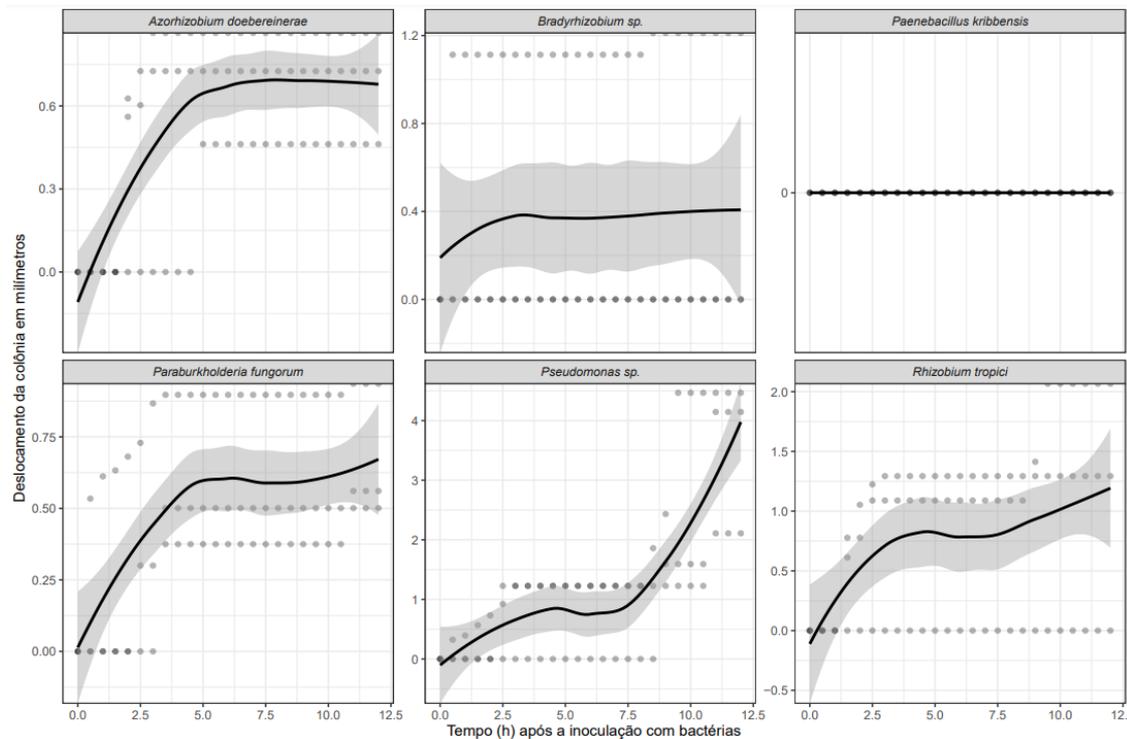
Entre as seis bactérias avaliadas, apenas 2 apresentaram motilidade sobre as hifas de FMAs (Figura 3.2), enquanto, 5 foram capazes de formar biofilmes expressivos sobre as hifas (Figura 3.3). Dentre aquelas que apresentaram motilidade sobre as hifas, *Pseudomonas* sp. foi a mais móvel, com uma distância máxima de migração celular de 12,6 mm, percorrendo em média 6,92 mm ao longo de 12 horas de avaliação; seguida por *Azorhizobium doebereinae*, que teve um deslocamento máximo de 2,89 mm e um deslocamento médio de 2,05 mm. As demais estirpes bacterianas não apresentaram movimentação celular, caracterizando-as como as menos móveis do experimento.

**Figura 3.2** - Distância percorrida (em mm) pelas estirpes bacterianas sobre hifas de FMA. Pontos representam os valores observados, linhas representam a média móvel das observações e as áreas sombreadas representam o desvio padrão da média móvel.



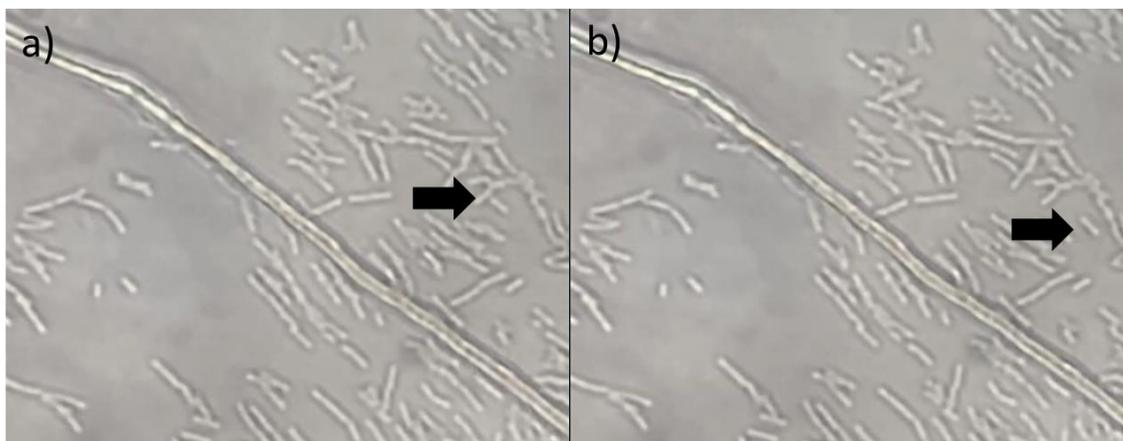
Analisando a distância percorrida pelas colônias bacterianas, foi possível constatar que *Pseudomonas* sp. apresentou o maior avanço colonial, percorrendo em média 4 mm em 12 horas, entretanto, é válido notar que este valor foi significativamente diminuído devido à presença de uma repetição que não apresentou motilidade bacteriana), já *Paenibacillus kribbensis* não apresentou avanço pela hifa (Figura 3.3). *P. kribbensis* também foi caracterizada como a única bactéria a não colonizar as hifas de FMAs, este fenômeno pode ser observado na figura 3.4.

**Figura 3.3** - Avanço colonial das diferentes estirpes bacterianas sob as hifas de *G. albida*. As escalas dos eixos verticais são variáveis entre painéis para facilitar a visualização. Pontos representam os valores observados, linhas representam a média móvel das observações e as áreas sombreadas representam o desvio padrão da média móvel



Tratando-se de seis gêneros distintos de bactérias, esperava-se encontrar padrões diferentes em suas respectivas motilidades, como exemplo: bactérias que migrassem logo nas primeiras horas de avaliação, ou bactérias que levassem muito tempo para se deslocar. Diferenças nestes comportamentos foram encontrados para todas as bactérias e estão representados na figura 3.2. Enquanto, *Azorhizobium doebereinae* e *Paraburkholderia fungorum* apresentaram comportamentos similares, com um avanço rápido nas 3 primeiras horas e estabilizando-se no decorrer do tempo remanescente. Já *Pseudomonas sp.* apresentou um avanço lento nas primeiras horas, seguido de uma rápida colonização da hifa ao longo das horas finais de avaliação. Baseado nos comportamentos observados, as bactérias foram classificadas em diferentes grupos, considerando o padrão de deslocamento apresentado. (Tabela 1).

**Figura 3.4** - Células de *P. kribensis* incapazes de se associar com a hifa de *G. albida*, não apresentando colonização nem natação sobre as mesmas. Figuras 3.4 a) e b) mostram *frames* diferentes da gravação da motilidade dessas células não associadas à hifa, indicando o deslocamento da célula apontada pela seta preta.



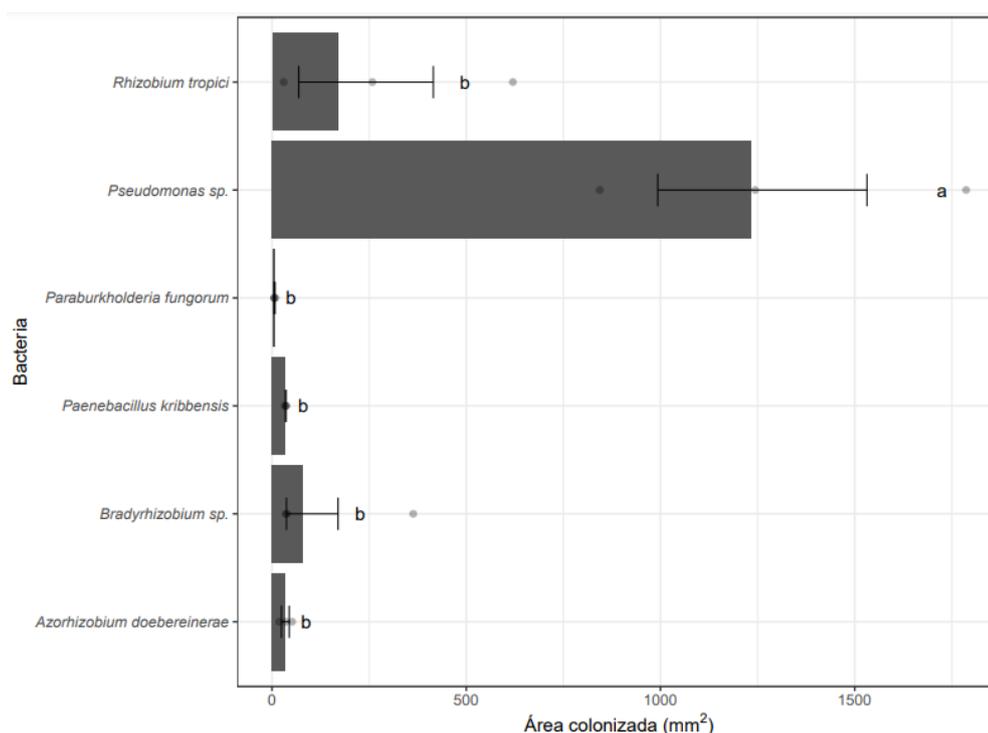
**Tabela 1** - Classificação proposta para as bactérias avaliadas no experimento, baseada no comportamento de avanço colonial ao longo do tempo.

<b>Classificação</b>	<b>Espécie bacteriana</b>	<b>Característica de colonização do grupo</b>
Não coloniza hifa	<i>Paenibacillus kribbensis</i>	Não apresenta nenhum tipo de colonização da hifa micorrízica
Colonização tardia	<i>Pseudomonas</i> sp.	Inicia com um colonização lenta que se atenua nas últimas horas de avaliação
Colonização gradual	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Apresenta uma colonização gradual ao longo do tempo que tende a se estabilizar no decorrer das horas
Colonização rápida	<i>Azorhizobium doebereineriae</i> <i>Paraburkholderia fungorum</i>	Rapidamente coloniza a hifa nas primeiras horas e depois cessa o avanço colonial

Ao colonizar a superfície das hifas de FMAs, as bactérias são capazes de apresentar espessamento das colônias sobre a superfície fúngica. Dentre as estirpes avaliadas, *Pseudomonas* sp. apresentou as maiores médias de área de colonização das

hifas no intervalo de 12 horas diferindo significativamente das demais estirpes, com uma média de 1291 mm<sup>2</sup> de superfície colonizada; seguida por *Rhizobium tropici* (292,9 mm<sup>2</sup>), *Azorhizobium doebereinae* (35,54 mm<sup>2</sup>), *Bradyrhizobium* sp. (12,2 mm<sup>2</sup>), e *Paraburkholderia fungorum* (6,66 mm<sup>2</sup>) e *Paenibacillus kribensis* que não apresentou colonização das hifas. (Figura 3.5).

**Figura 3.5** - Área total colonizada pelas diferentes estirpes de bactérias ao final de 12 horas. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre as médias .



## Discussão

Os resultados obtidos no experimento corroboram diretamente com ambas hipóteses H1 e H2, uma vez que múltiplas estirpes bacterianas foram capazes de migrar sobre as hifas de *G. albida*, tanto de forma passiva como ativa e houveram diferenças nestas taxas de migração. Este foi o primeiro trabalho avaliando o fenômeno de *fungus highways* em hifas de FMAs de forma descritiva utilizando microscopia.

Dentre as bactérias avaliadas neste trabalho, *Pseudomonas* sp. e *Azorhizobium doebereinae* foram caracterizadas como capazes de migrar nas hifas de FMAs. Bactérias do gênero *Pseudomonas* já foram amplamente registradas migrando em hifas de outros fungos não pertencentes ao grupo dos FMAs (WARMINK et al., 2010; BRAVO et al., 2013; SIMON et al., 2015; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ et al., 2021). Entretanto,

este é o primeiro relato de migração celular de *Azorhizobium doebereineriae*, não apenas em hifas de FMAs, mas em hifas como um todo. Este é o terceiro trabalho avaliando este fenômeno em FMAs, mas é o primeiro que focou diretamente na comparação da motilidade das bactérias nas hifas de FMA e as possíveis diferenças existentes entre gêneros de bactérias (DE NOVAES., 2020; JIANG et al., 2021).

Estudos investigando as comunidades bacterianas associadas à hifas de FMAs datam desde os anos 90, revelando uma vasta gama de microrganismos associados a estes fungos, incluindo múltiplas *taxa* de bactérias, entre eles o gênero *Pseudomonas* (DE BOER et al., 2005). Entre os estudos deste gênero bacteriano, temos registros de fixação celular em hifas não vivas de *Glomus* spp (TOLJANDER et al., 2006) e também na parede externa de esporos, entretanto, não existe ainda um consenso se todos os casos são caracterizados como interações benéficas para o fungo (ROESTI et al., 2005), uma vez que poucos trabalhos utilizaram metodologias que permitiram elucidar tal interação (BONFANTE e ANCA, 2009). Entre tais trabalhos, Bianciotto e colaboradores (2002), constataram aderência de células de 3 diferentes estirpes de *Pseudomonas fluorescens* (CHA0, CHA211, CHA213M) em hifas de *Gigaspora margarita*, enquanto Bianciotto e colaboradores (2006) demonstraram a importância da composição da parede de esporos de FMAs para a adesão da estirpe CHA0 de *P. fluorescens*. O estudo desenvolvido por Gamerlaro et al. (2008) correlacionou a inoculação conjunta de *P. putida* e *Gigaspora rosea* com um aumento da micorrização em plantas de pepino. Desta forma, as múltiplas interações entre espécies do gênero *Pseudomonas* indicam uma profunda associação entre este gênero e FMAs, sugerindo assim a possibilidade de também existir uma interação entre ambos tratando-se de *fungal highways*. O que foi comprovado pelos dados de motilidade bacteriana apresentados neste trabalho, servindo como suporte para a argumentação de que a movimentação de *Pseudomonas* através de *fungal highways* mediadas por FMAs pode ter uma base mais complexa do que apenas uma interação física entre os dois microrganismos.

As maiores taxas de migração e de avanço colonial nas hifas de *G. albida*, por *Pseudomonas* sp., já eram esperadas e corroboram com os resultados obtidos em trabalhos que avaliaram o efeito *fungal highway* em diversos filos de fungos não pertencentes ao grupo dos FMAs; como os dados de Pion e colaboradores (2013), que relataram uma extensa migração de *Pseudomonas putida* em hifas de *Morchella crassipes*, um fungo do filo Ascomycota. Neste mesmo sentido Simon et al. (2015) constataram migração de

*Pseudomonas frederiksbergensis* e também *Pseudomonas putida*, transportadas tanto em condições *in vitro*; inoculadas junto de hifas de *M. crassipes* e *Trichoderma* sp; como em campo, tendo *P. frederiksbergensis* transportada pelo fungo *Fusarium chlamyosporum*. Mais recentemente, González-González et al. (2021) constataram a dispersão de múltiplos gêneros bacterianos migrando em hifas de fungos dos gêneros *Mucor*, *Ulocladium*, *Rhizopus* e *Syncephalastrum*, entre eles, *Pseudomonas*. Uma análise conjunta destes múltiplos trabalhos e dos dados encontrados no experimento 1 pode sugerir que a motilidade do gênero *Pseudomonas* em hifas fúngicas tenha uma relação direta com fatores bacterianos e que resultem numa atração por fungos, não exclusivamente com alguma característica do fungo usado como *highway*, uma vez existem relatos para a migração deste gênero em espécies de fungos de múltiplos filos.

As distâncias percorridas pelas bactérias sobre hifas de fungos podem ser extremamente variáveis; de acordo com Kohlmeier et al. (2005), fatores como a saturação do ambiente, as propriedades físicas das hifas de determinadas espécies de fungos e até mesmo a salinização ou não das estruturas por onde as bactérias migram (hifas e fibras de vidro), podem influenciar estas variações. Entretanto, outro fator que deve ser levado em conta para avaliar a migração bacteriana em hifas é a faixa de tempo de avaliação. No presente trabalho, a migração bacteriana via *fungal highways* em FMA se deu nas primeiras horas após a inoculação das bactérias, diferente dos resultados apresentados por Kohlmeier e colaboradores (2005), que registraram a motilidade bacteriana entre 4 a 5 semanas. Entretanto, trabalhos passados como os de Warmink et al. (2010), observaram o avanço gradual das colônias bacterianas em hifas de ascomicetos durante 15 dias, que se caracterizava por apresentar motilidade apenas a partir do terceiro dia de avaliação. Por outro lado, de Novais e colaboradores (2020) avaliaram a motilidade das bactérias em hifas de FMAs, constatando-a em uma única observação, após 1 mês da inoculação bacteriana. Notam-se diferenças significativas nos tempos necessários para avaliar a migração das bactérias em hifas. Por esta razão, a comparação entre os trabalhos não pode ser realizada, visto que metodologias e tempos de avaliação diferentes foram empregados para a avaliação da motilidade bacteriana.

Os exsudados fúngicos presentes nas hifas de *G. albida* podem ter sido fundamentais para a migração das bactérias via *highway*, uma vez que o meio de cultura utilizado no experimento não foi enriquecido com nenhum tipo de carbono disponível para as bactérias, resultando nestes exsudados serem a única alternativa nutricional para

as estirpes bacterianas (JIANG et al., 2021). Outro fator que pode ter influenciado na motilidade das bactérias é a espessura do filme d'água na superfície das hifas, uma vez que o mesmo é essencial para o deslocamento das células bacterianas (JIANG et al., 2021). Apesar das respostas obtidas neste trabalho, algumas lacunas de conhecimento mantiveram-se. Por esta razão, sugere-se o desenvolvimento de um experimento comparando a motilidade das bactérias sem a presença de uma fonte de carbono, e também experimentos com diferentes espécies de FMAs atuando como *fungus highways*, uma vez que diferenças filogenéticas expressas pelas diferentes famílias deste filo, como variabilidade na estrutura da parede do esporo, comprimento de micélio extrarradicular, quantidade de micélio extrarradicular produzido e diferenças na quantidade de exsudados hifais, podem trazer influenciar esse fenômeno.

### **Conclusões**

O fungo *Gigaspora albida* foi capaz de estimular a motilidade bacteriana e serviu como um sítio para a motilidade ativa de rizobactérias em condições *in vitro*. Na presença de hifas deste fungo, as bactérias *Pseudomonas* sp. e *Azorhizobium doebereineriae* foram capazes de mover-se 12,6 mm e 6,92 mm respectivamente em 12 horas, ao passo que apresentaram motilidade nula na ausência das hifas ao longo do tempo de condução desse trabalho.

Da mesma forma, as hifas de *G. albida* serviram como pontos de fixação e colonização para as bactérias, uma vez que, com exceção de *P. kribensis*, as 5 demais estirpes bacterianas foram capazes de formar filmes bacterianos sobre as hifas deste FMA. Dentre as bactérias que formaram colônias sobre as hifas, *Pseudomonas* sp. apresentou as maiores médias, totalizando aproximadamente 12 mm<sup>2</sup> de área ocupada sobre as hifas de *G. albida*.

## Capítulo III

**Estudo 2: Diferenças de motilidade bacteriana, em diferentes espécies de bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Azorhizobium* (bactérias mais móveis) e *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* (bactérias menos móveis) em hifas de *Gigaspora albida* simbióticas com *Trifolium repens*.**

### Hipóteses

H1: Não haverá diferenças nas taxas de migração das bactérias quando comparadas com os resultados do experimento 1;

H2: As taxas de área colonizada por bactérias serão maiores que do experimento 1, devido à maior disponibilidade de hifas oriunda da simbiose com a planta.

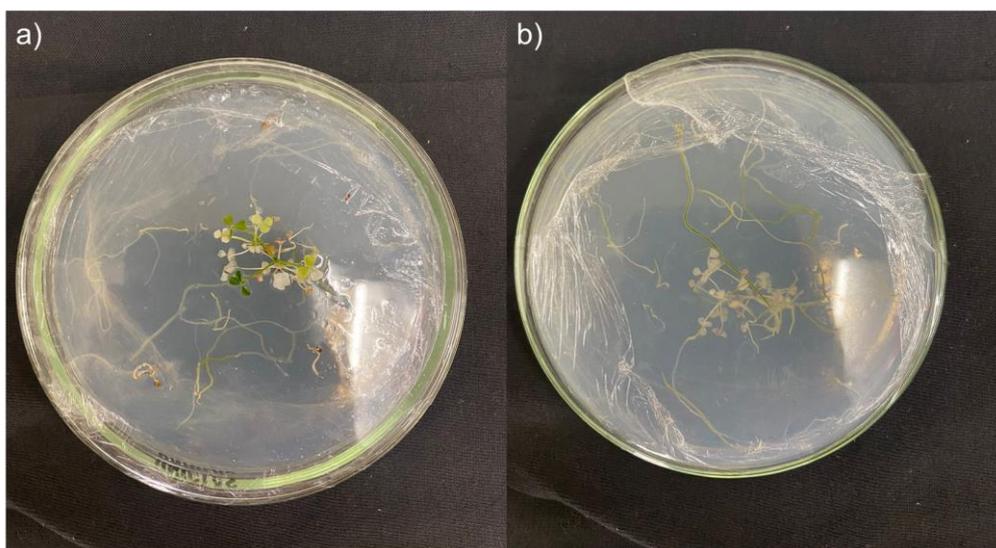
### Objetivo geral

- Avaliar a motilidade de quatro rizobactérias ao longo das hifas do FMA *G. albida* quando associadas a um hospedeiro vegetal.
- Validar os dados gerados através do experimento utilizando apenas esporos assimbióticos.

### Materiais e métodos

Para avaliar diferenças na motilidade bacteriana em hifas associadas com plantas fisiologicamente ativas, 4 espécies de bactérias de gêneros distintos foram testadas em esporos pré-germinados de *G. albida* simbioticamente associadas com plântulas de *Trifolium repens*. O método para avaliar a motilidade das bactérias será o mesmo descrito anteriormente, entretanto os esporos serão mantidos durante um mês em cultivo simbiótico com plântulas desinfestadas de *T. repens* para o desenvolvimento de hifas (Figura 4.1). A desinfestação das sementes será feita de acordo com o protocolo descrito abaixo. Os tratamentos foram realizados em cinco repetições.

**Figura 4.1** - Microcosmos para avaliação da motilidade bacteriana em hifas de FMA associadas a plantas fisiologicamente ativas. a) Vista da superfície de cima da placa de Petri. b) Vista da superfície de baixo da placa de Petri. Dentro da placa, encontra-se uma plântula desinfestada de *T. repens* associada com hifas de *G. albida*. A confirmação da colonização se deu por meio da observação das estruturas em microscópio estereoscópico.



### **Desinfestação e germinação de sementes**

Sementes de *Trifolium repens* foram imersas em álcool 70% por um minuto, transferidas para água estéril por 3 horas sob agitação, para remoção do tegumento superficial que recobre a semente. Em seguida as sementes foram imersas em água sanitária pura por 30 minutos e lavadas em água destilada estéril 10 vezes. Após a desinfestação, as sementes foram germinadas em placas de Petri revestidas de algodão, papel filtro e água destilada estéril. Em seguida, foram crescidas por 1 mês em meio sólido (ágar:água 2%) e observadas para assegurar esterilidade. Quando constatada, foram utilizadas nos ensaios.

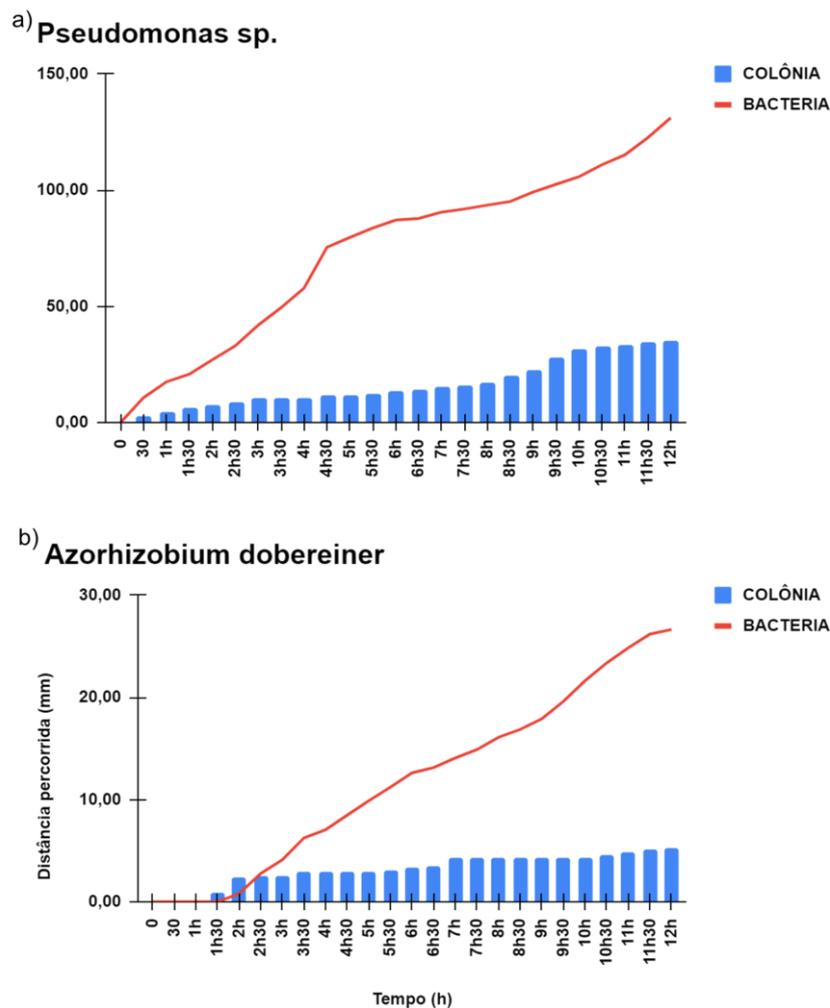
### **Análises estatísticas**

Os resultados de área total de colonização das hifas pelas estirpes bacterianas foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguido de teste de Tukey, análises foram realizadas no software RStudio (versão 1.2.1335) utilizando o pacote *vegan*.

## Resultados

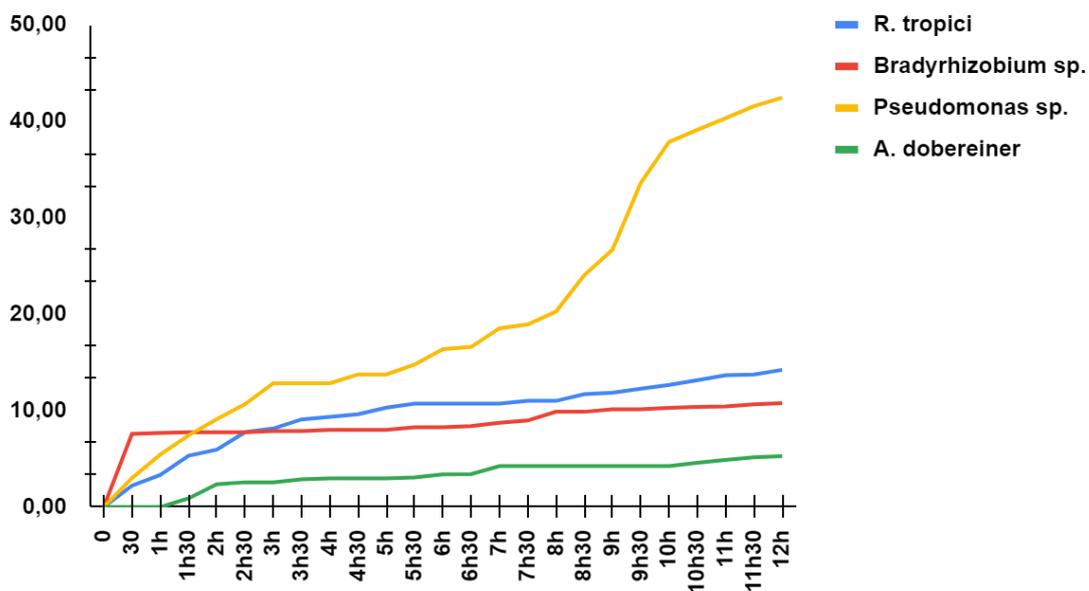
Não foram observados padrões de migração celular diferentes daqueles presentes no experimento 1 em nenhuma estirpe bacteriana. Dentre as bactérias que migraram via *funga highway*, *Pseudomonas* sp. apresentou as maiores médias de motilidade bacteriana, com um deslocamento máximo de 13 mm, e uma média de deslocamento de 10,92 mm (cerca de 4 mm a mais do que no experimento sem plantas) nas hifas de *G. albida* (Figura 4.2a), seguida de *A. doebereineriae* que foi capaz de migrar uma distância máxima de 2,7 mm, com uma média de 2,66 mm ao longo das 12 horas de avaliação (Figura 4.2b). Novamente, *R. tropici* e *Bradyrhizobium* sp. não foram capazes de migrar nas hifas de FMA.

**Figura 4.2** - Médias do deslocamento colonial e celular de *Pseudomonas* sp. e *Azorhizobium dobereineriae*.

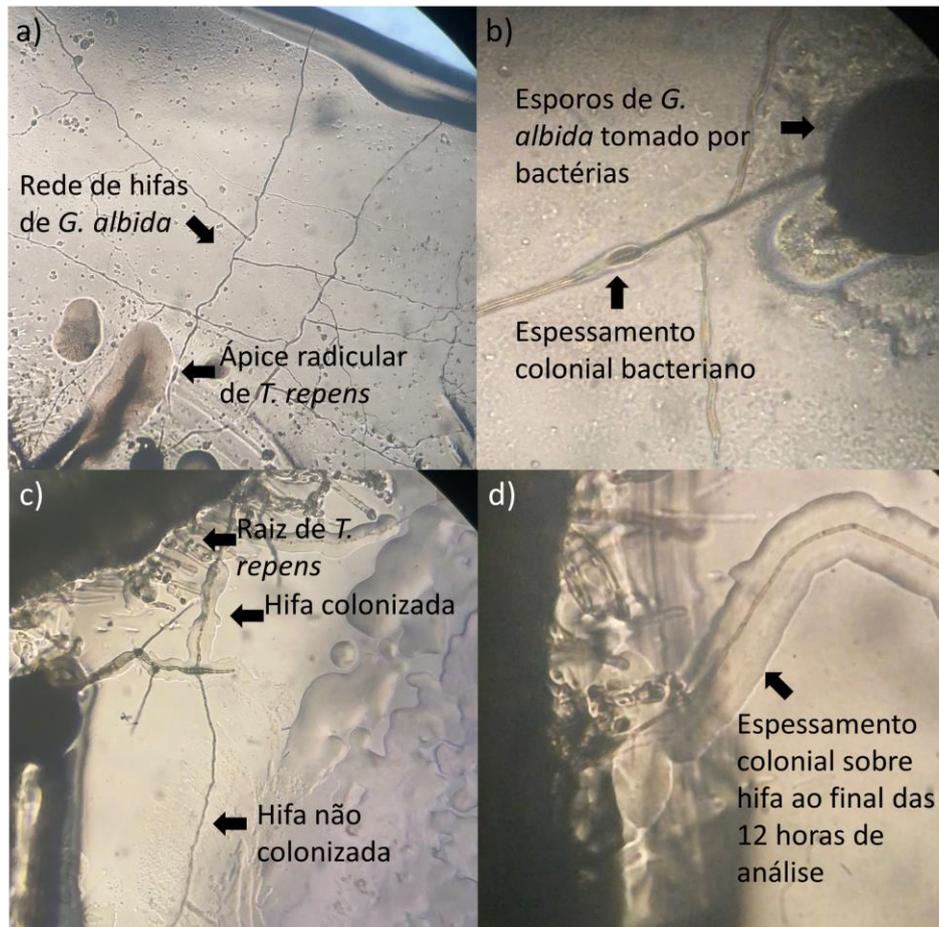


Todas as bactérias avaliadas foram capazes de formar colônias nas hifas de FMAs e percorrer distâncias significativas entre o ponto de inoculação e o ponto de avaliação final após 12 horas (Figura 4.4). Todavia, houveram alterações nos padrões de distância do avanço colonial sobre as hifas quando comparados com os dados do Experimento 1. Entre elas, *Pseudomonas* sp. apresentou as maiores taxas, totalizando um avanço médio de 35,36 mm de distância, *Rhizobium tropici* foi a bactéria com o segundo maior avanço colonial (13,74 mm), seguida de *Bradyrhizobium* sp. (10,78 mm) e *Azorhizobium doebereineriae* (5,27 mm) (Figura 4.3). As diferenças nesses avanços refletiram diretamente nos valores de área total colonizada ao final de 12 horas, sendo que *Pseudomonas* sp. apresentou as maiores médias de área colonizada, com um total de 129,13mm<sup>2</sup>, enquanto *Rhizobium tropici*, *Bradyrhizobium* sp. e *Azorhizobium doebereineriae* apresentaram, 37,93 mm<sup>2</sup>, 28,23 mm<sup>2</sup> e 2,37 mm<sup>2</sup>, respectivamente (Figura 4.5).

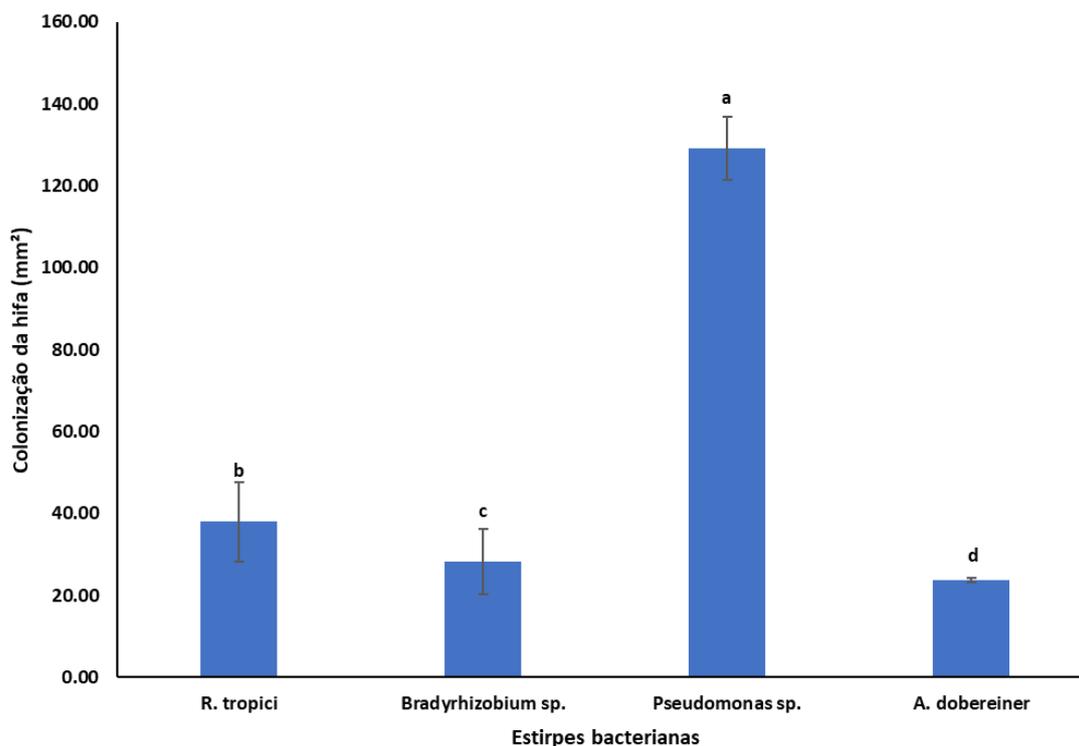
**Figura 4.3** - Distância total colonizada pelas estirpes bacterianas ao longo de 12 horas de avaliação.



**Figura 4.4** - Hifas de *G. albida* colonizadas por bactérias por bactérias das quatro estirpes avaliadas em diferentes estágios de avaliação. a) Hifas inoculadas com *Bradyrhizobium* sp., b) Hifas próximas do esporo colonizadas por *R. tropici*, c) hifas colonizadas por *A. doebereinae*, d) Hifas colonizadas por *Pseudomonas* sp. ao final das 12 horas de avaliação.



**Figura 4.4** - Área total colonizada pelas estirpes bacterianas ao longo de 12 horas de avaliação. Letras diferentes indicam diferenças de médias.



## Discussão

Comparado com os dados do experimento 1, *Pseudomonas* sp. e *A. dobereiner* apresentaram deslocamentos similares em hifas simbióticas e como antes mencionado, este é o primeiro relato de migração ativa de *A. dobereiner* em hifas FMA. As taxas de migração de *Pseudomonas* sp. corroboram com a literatura (WARMINK et al., 2010; BRAVO et al., 2013; SIMON et al., 2015; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ et al., 2021), e mais uma vez sugerem que a relação entre as bactérias deste gênero e hifas de fungos (incluindo os FMAs) pode ser ter fundamentos ainda não elucidados pela ciência, necessitando assim de estudos mais aprofundados que associem fungos do filo Glomeromycota e bactérias do gênero *Pseudomonas*. Contrário ao esperado na hipótese 2, as taxas de área de colonização (mm<sup>2</sup>) não apresentaram aumento significativo quando comparadas com os dados observados no experimento 1, isto pode ter ocorrido devido a faixa de tempo analisada, uma vez que em 12 horas as bactérias não foram capazes de atingir as demais hifas disponíveis no microcosmo.

As metodologias aplicadas nos experimentos 1 e 2 apresentaram resultados similares para a migração bacteriana, todavia, por envolver o uso de plantas desinfestadas

associadas simbioticamente com hifas de FMAs, a metodologia do experimento 2 se mostrou mais complexa de implementar e mais demorada. Desta forma, a metodologia do experimento 1 se demonstra mais prática para avaliar o fenômeno *fungus highways* em FMAs e deve ser considerada como uma alternativa viável em futuros experimentos em que parâmetros influenciados pela planta simbiote não sejam relevantes.

Apesar da comprovada eficiência dos microcosmos elaborados para investigar a associação entre FMAs, bactérias e plântulas de *T. repens*, mantêm-se ainda múltiplas facetas de conhecimento a serem exploradas. Principalmente se considerarmos a inclusão de um quarto fator à esta equação, o solo. Sabemos que o solo, devido a sua heterogeneidade e ampla variedade de características físicas e químicas resulta em alterações no comportamento das bactérias quando inoculadas em solos de características distintas (DEMOLING et al., 2007). Assim como realizado no trabalho de Jiang et al., (2021), sugere-se a necessidade de comprovar as motilidade constatadas neste trabalho incorporando o fator solo, desta forma teremos mensurações mais aproximadas da realidade do fenômeno *fungus highway*. Todavia, o uso de microcosmos para análises *in vitro* desta interações devem ser continuados, incorporando maiores graus de complexidade, como nos microcosmos desenvolvidos por Mafla-Endara e colaboradores (2021), capazes de analisar interações entre microrganismos (bactéria, fungos e protistas) e também invertebrados (nematóides e micro-artrópodes). Estes microcosmos podem ser o passo intermediário antes de um estudo avaliando diretamente o solo, uma vez que neles é possível simular características como, porosidade do solo, umidade relativa, teores de CO<sub>2</sub> e até mesmo incorporar minerais insolúveis para posterior colonização pelas bactérias transportadas.

## Conclusões

Não houveram diferenças significativas na migração das bactérias em hifas de *G. albida* associadas com plântulas de *T. repens* quando comparadas à hifas não associadas (Experimento 1). Assim como no experimento 1, *Pseudomonas* sp. apresentou as maiores médias de motilidade bacteriana, com células percorrendo cerca de 10,92 mm de distância, enquanto *A. doebereineriae* apresentou um deslocamento médio de 2,6 mm, ambos num intervalo de 12 horas. Estas foram as únicas bactérias que apresentaram motilidade celular neste experimento. Os dados corroboram com a hipótese 1.

Todas as quatro estirpes bacterianas avaliadas foram capazes de colonizar e avançar sobre as hifas do FMA testado, entre elas, *Pseudomonas* sp. apresentou as maiores taxas de deslocamento colonial (35,36 mm) e também a maior média de área colonizada totalizando 129,13 mm<sup>2</sup>.

## Considerações finais

Os resultados encontrados nos experimentos 1 e 2, nos levam a compreender que o fenômeno de *funga highways* em FMAs ainda precisa ser melhor elucidado, uma vez que existem diferenças significativas entre a motilidade de bactérias na hifas desses fungos. Considerando as diferenças fisiológicas, morfológicas e ecológicas dos FMAs apresentadas no quadro 1, é factível considerar que este fenômeno pode sofrer variações dentro dos diferentes grupos funcionais destes fungos, com ênfase nas famílias Glomeraceae, Acaulosporaceae e Gigasporaceae, devido às diferenças entre elas descritas no Quadro 1.

Dentre as análises realizadas durante este projeto, *Pseudomonas* sp. se destacou em todos os parâmetros, apresentando sempre os maiores valores de motilidade microbiana (celular e colonial), por esta razão, sugere-se um estudo mais aprofundado deste gênero associando espécies de FMAs dos gêneros mais representativos nos solos globais e as espécies do gênero *Pseudomonas* comumente encontradas e de importância ecológica comprovada.

As metodologias descritas no capítulo I se provaram fundamentais para o desenvolvimento do projeto e foram disponibilizadas permitindo uma democratização da ciência, as quais são extremamente necessárias visto o cenário científico atual caracterizado por frequentes cortes em orçamentos de pesquisa, encarecimento de materiais e indisponibilidade de equipamentos. Entretanto, quando possível, sugere-se a utilização de microscópios confocais, permitindo simplificar o trabalho e utilizar recursos como microscopia de fluorescência e monitoramento em tempo real de todas as faces da hifa.

## **Referências bibliográficas**

ABU-ASHOUR, J., JOY, D. M., LEE, H., et al. "Transport of microorganisms through soil", *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 75, n. 1–2, p. 141–158, 1994. DOI: 10.1007/BF01100406.

ALLEN, M. F. "Mycorrhizal Fungi: Highways for Water and Nutrients in Arid Soils", *Vadose Zone Journal*, v. 6, n. 2, p. 291–297, 2007. DOI: 10.2136/vzj2006.0068.

ANDRADE, G., MIHARA, K. L., LINDERMAN, R. G., et al. "Bacteria from rhizosphere and hyphosphere soils of different arbuscular-mycorrhizal fungi", *Plant and Soil*, v. 192, n. 1, p. 71–79, 1997. DOI: 10.1023/A:1004249629643.

BACTERIUM, T. "MOVEMENT OF BACTERIA IN MOIST, PARTICULATE SYSTEMS\* By D. M. GRIFFIN and GWEN", p. 579–582, 2006.

BANITZ, T., FRANK, K., WICK, L. Y., et al. "Spatial metrics as indicators of biodegradation benefits from bacterial dispersal networks", *Ecological Indicators*, v. 60, p. 54–63, 2016. DOI: 10.1016/j.ecolind.2015.06.021.

BANITZ, T., JOHST, K., WICK, L. Y., et al. "Corrigendum to Highways versus pipelines: Contributions of two fungal transport mechanisms to efficient bioremediation", *Environmental Microbiology Reports*, v. 6, n. 4, p. 414, 2014. DOI: 10.1111/1758-2229.12177.

BANITZ, T., JOHST, K., WICK, L. Y., et al. "Highways versus pipelines: Contributions of two fungal transport mechanisms to efficient bioremediation", *Environmental Microbiology Reports*, v. 5, n. 2, p. 211–218, 2013. DOI: 10.1111/1758-2229.12002.

BARDGETT, R. D., VAN DER PUTTEN, W. H. "Belowground biodiversity and ecosystem functioning", *Nature*, v. 515, n. 7528, p. 505–511, 2014. DOI: 10.1038/nature13855.

BARTO, E. K., HILKER, M., MÜLLER, F., et al. "The fungal fast lane: Common mycorrhizal networks extend bioactive zones of allelochemicals in soils", *PLoS ONE*, v. 6, n. 11, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0027195.

BARTO, E. K., WEIDENHAMER, J. D., CIPOLLINI, D., et al. "Fungal superhighways: Do common mycorrhizal networks enhance below ground communication?", *Trends in Plant Science*, v. 17, n. 11, p. 633–637, 2012. DOI: 10.1016/j.tplants.2012.06.007.

BENDER, S. F., WAGG, C., VAN DER HEIJDEN, M. G. A. "An Underground Revolution: Biodiversity and Soil Ecological Engineering for Agricultural Sustainability", *Trends in Ecology and Evolution*, v. 31, n. 6, p. 440–452, 2016. DOI: 10.1016/j.tree.2016.02.016.

BIANCIOTTO, V., BONFANTE, P. "Arbuscular mycorrhizal fungi: A specialised niche for rhizospheric and endocellular bacteria", *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, v. 81, n. 1–4, p. 365–371, 2002. DOI: 10.1023/A:1020544919072. .

BONFANTE, P., ANCA, I.-A. "Plants, Mycorrhizal Fungi, and Bacteria: A Network of Interactions", *Annual Review of Microbiology*, v. 63, n. 1, p. 363–383, 2009. DOI: 10.1146/annurev.micro.091208.073504.

BYZOV, B. A., KHOMYAKOV, N. V., KHARIN, S. A., et al. "Fate of soil bacteria and fungi in the gut of earthworms", *European Journal of Soil Biology*, v. 43, n. SUPPL. 1, p. 149–156, 2007. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2007.08.012.

CHAGNON, P. L., BRADLEY, R. L., MAHERALI, H., et al. "A trait-based framework to understand life history of mycorrhizal fungi", *Trends in Plant Science*, v. 18, n. 9, p. 484–491, 2013. DOI: 10.1016/j.tplants.2013.05.001.

CRUZ-PAREDES, C., SVENNINGSSEN, N. B., NYBROE, O., et al. "Suppression of arbuscular mycorrhizal fungal activity in a diverse collection of non-cultivated soils", *FEMS Microbiology Ecology*, v. 95, n. 3, p. 1–10, 2019. DOI: 10.1093/femsec/fiz020.

DAANE, L. L., MOLINA, J. A. E., BERRY, E. C., et al. "Influence of earthworm activity on gene transfer from *Pseudomonas fluorescens* to indigenous soil bacteria", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, n. 2, p. 515–521, 1996. DOI: 10.1128/aem.62.2.515-521.1996.

DEMOLING, F., FIGUEROA, D., BÅÅTH, E. "Comparison of factors limiting bacterial growth in different soils", *Soil Biology and Biochemistry*, v. 39, n. 10, p. 2485–2495, 2007. DOI: 10.1016/j.soilbio.2007.05.002. .

DE BOER, W., FOLMAN, L. B., SUMMERBELL, R. C., et al. "Living in a fungal world: Impact of fungi on soil bacterial niche development", *FEMS Microbiology Reviews*, v. 29, n. 4, p. 795–811, 2005. DOI: 10.1016/j.femsre.2004.11.005. .

DUCRET, A., MAISONNEUVE, E., NOTARESCHI, P., et al. "A microscope automated fluidic system to study bacterial processes in real time", *PLoS ONE*, v. 4, n. 9, 2009. DOI: 10.1371/journal.pone.0007282. .

DUPUY, D., PEDREIRA, D., VERBEKE, D., et al. "A Magnetodynamic Error Criterion and an Adaptive Meshing Strategy for Eddy Current Evaluation", *IEEE Transactions on Magnetics*, v. 52, n. 3, p. 8–11, 2016. DOI: 10.1109/TMAG.2015.2497262.

FILIPPIDOU, S., WAFA, M. "Exploiting the fungal highway: Development of a novel tool for the", p. 1–26, 2015.

FRED, E. B.; WAKSMAN, S. A. *Laboratory manual of general microbiology*, p 33. 366 New York. 1928.

FURUNO, S., PÄZOLT, K., RABE, K., et al. "Fungal mycelia allow chemotactic dispersal of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria in water-unsaturated systems", *Environmental Microbiology*, v. 12, n. 6, p. 1391–1398, 2010. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2009.02022.x.

FURUNO, S., REMER, R., CHATZINOTAS, A., et al. "Use of mycelia as paths for the isolation of contaminant-degrading bacteria from soil", *Microbial Biotechnology*, v. 5, n. 1, p. 142–148, 2012. DOI: 10.1111/j.1751-7915.2011.00309.x.

GENETICS, P. "Migration of the Rhizosphere Bacteria", *Terra*, v. 132, n. 12, p. 3407–3414, 1986. DOI: 10.1099/00221287-132-12-3407.

GLAESER, S. P., IMANI, J., ALABID, I., et al. "Non-pathogenic *Rhizobium radiobacter* F4 deploys plant beneficial activity independent of its host *Piriformospora indica*", *ISME Journal*, v. 10, n. 4, p. 871–884, 2016. DOI: 10.1038/ismej.2015.163.

GOEBEL, M. O., BACHMANN, J., REICHSTEIN, M., et al. "Soil water repellency and its implications for organic matter decomposition - is there a link to extreme climatic events?", *Global Change Biology*, v. 17, n. 8, p. 2640–2656, 2011. DOI: 10.1111/j.1365-2486.2011.02414.x.

HAAHTELA, K., LAAKSO, T., KORHONEN, T. K. "Associative Nitrogen Fixation by *Klebsiella* spp.: Adhesion Sites and Inoculation Effects on Grass Roots", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 52, n. 5, p. 1074–1079, 1986. DOI: 10.1128/aem.52.5.1074-1079.1986.

HALLAM, S. J., MCCUTCHEON, J. P. "Microbes don't play solitaire: How cooperation trumps isolation in the microbial world", *Environmental Microbiology Reports*, v. 7, n. 1, p. 26–28, 2015. DOI: 10.1111/1758-2229.12248.

HAQ, I. U., CALIXTO, R. O. da R., YANG, P., et al. " Chemotaxis and adherence to fungal surfaces are key components of the behavioral response of *Burkholderia terrae* BS001 to two selected soil fungi ", *FEMS Microbiology Ecology*, v. 92, n. 11, p. fiw164, 2016. DOI: 10.1093/femsec/fiw164.

HEKMAN, W. E., HEIJNEN, C. E., BURGERS, S. L. G. E., et al. "Transport of bacterial inoculants through intact cores of two different soils as affected by water percolation and the presence of wheat plants", *FEMS Microbiology Ecology*, v. 16, n. 2, p. 143–157, 1995. DOI: 10.1016/0168-6496(94)00078-B.

JANSA, J., BUKOVSKÁ, P., GRYNDLER, M. "Mycorrhizal hyphae as ecological niche for highly specialized hypersymbionts - Or just soil free-riders?", *Frontiers in Plant Science*, v. 4, n. MAY, p. 1–9, 2013. DOI: 10.3389/fpls.2013.00134.

JARRELL, K. F., MCBRIDE, M. J. "The surprisingly diverse ways that prokaryotes move", *Nature Reviews Microbiology*, v. 6, n. 6, p. 466–476, 2008. DOI: 10.1038/nrmicro1900.

KAMILOVA, F., VALIDOV, S., AZAROVA, T., et al. "Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria", *Environmental Microbiology*, v. 7, n. 11, p. 1809–1817, 2005. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2005.00889.x.

KELLOGG, C. A., GRIFFIN, D. W. "Aerobiology and the global transport of desert dust", *Trends in Ecology and Evolution*, v. 21, n. 11, p. 638–644, 2006. DOI: 10.1016/j.tree.2006.07.004.

KOHLMEIER, S., SMITS, T. H. M., FORD, R. M., et al. "Taking the fungal highway: Mobilization of pollutant-degrading bacteria by fungi", *Environmental Science and Technology*, v. 39, n. 12, p. 4640–4646, 2005. DOI: 10.1021/es047979z.

KUZYAKOV, Y., BLAGODATSKAYA, E. "Microbial hotspots and hot moments in soil: Concept & review", *Soil Biology and Biochemistry*, v. 83, n. February, p. 184–199, 2015. DOI: 10.1016/j.soilbio.2015.01.025.

LARSEN, J., CORNEJO, P., BAREA, J. M. "Interactions between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and the plant growth promoting rhizobacteria *Paenibacillus polymyxa* and *P. macerans* in the mycorrhizosphere of *Cucumis sativus*", *Soil Biology and Biochemistry*, v. 41, n. 2, p. 286–292, 2009. DOI: 10.1016/j.soilbio.2008.10.029.

LI, B., RAVNSKOV, S., XIE, G., et al. "Differential effects of *Paenibacillus* spp. on cucumber mycorrhizas", *Mycological Progress*, v. 7, n. 4, p. 277–284, 2008. DOI: 10.1007/s11557-008-0570-4.

LONG, P. E., WILLIAMS, K. H., HUBBARD, S. S., et al. "Microbial Metagenomics Reveals Climate-Relevant Subsurface Biogeochemical Processes", *Trends in Microbiology*, v. 24, n. 8, p. 600–610, 2016. DOI: 10.1016/j.tim.2016.04.006.

LSO\_400 LIVRO - MICROBIOLOGIA DO SOLO-annotated.pdf. [S.l: s.n.], [S.d.]

MAFLA-ENDARA, P. M., ARELLANO-CAICEDO, C., ALEKLETT, K., et al. "Microfluidic chips provide visual access to in situ soil ecology", *Communications Biology*, v. 4, n. 1, p. 1–12, 2021. DOI: 10.1038/s42003-021-02379-5. .

MARSCHNER, P., YANG, C. H., LIEBEREI, R., et al. "Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere", *Soil Biology and Biochemistry*, v. 33, n. 11, p. 1437–1445, 2001. DOI: 10.1016/S0038-0717(01)00052-9.

MELONI, D., DI SARRA, A., BIAVATI, G., et al. "Seasonal behavior of Saharan dust events at the Mediterranean island of Lampedusa in the period 1999-2005", *Atmospheric Environment*, v. 41, n. 14, p. 3041–3056, 2007. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2006.12.001.

NAN, B., ZUSMAN, D. R. "Uncovering the Mystery of Gliding Motility in the Myxobacteria", *Annual Review of Genetics*, v. 45, n. 1, p. 21–39, 2011. DOI: 10.1146/annurev-genet-110410-132547.

NAUTIYAL, C. S. "An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms", *FEMS Microbiology Letters*, v. 170, n. 1, p. 265–270, 1999. DOI: 10.1016/S0378-1097(98)00555-2.

NAZIR, R., WARMINK, J. A., BOERSMA, H., et al. "Mechanisms that promote bacterial fitness in fungal-affected soil microhabitats", *FEMS Microbiology Ecology*, v. 71, n. 2, p. 169–185, 2010. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2009.00807.x.

NAZIR, R., ZHANG, M., DE BOER, W., et al. "The capacity to comigrate with *Lyophyllum* sp. strain Karsten through different soils is spread among several phylogenetic groups within the genus *Burkholderia*", *Soil Biology and Biochemistry*, v. 50, p. 221–233, 2012. DOI: 10.1016/j.soilbio.2012.03.015.

OLIVER, J., *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2013. DOI: 10.1017/CBO9781107415324.004.

OTTO, S., HARMS, H., WICK, L. Y. "Effects of predation and dispersal on bacterial abundance and contaminant biodegradation", *FEMS microbiology ecology*, v. 93, n. 2, p. 1–7, 2017. DOI: 10.1093/femsec/fiw241.

PARNISKE, M. "Arbuscular mycorrhiza: The mother of plant root endosymbioses", *Nature Reviews Microbiology*, v. 6, n. 10, p. 763–775, 2008. DOI: 10.1038/nrmicro1987.Phyto81n07\_754-annotated.pdf.

PIROZYNSKI, K. A. "Interactions between fungi and plants through the ages", *Canadian Journal of Botany*, v. 59, n. 10, p. 1824–1827, 1981. DOI: 10.1139/b81-243.

PROSPERO, J. M., BLADES, E., MATHISON, G., et al. "Interhemispheric transport of viable fungi and bacteria from Africa to the Caribbean with soil dust", *Aerobiologia*, v. 21, n. 1, p. 1–19, 2005. DOI: 10.1007/s10453-004-5872-7.

RILLIG, M. C., MUMMEY, D. L., RAMSEY, P. W., et al. "Phylogeny of arbuscular mycorrhizal fungi predicts community composition of symbiosis-associated bacteria", *FEMS Microbiology Ecology*, v. 57, n. 3, p. 389–395, 2006. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2006.00129.x.

ROESTI, D., INEICHEN, K., BRAISSANT, O., et al. "Bacteria associated with spores of the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus geosporum* and *Glomus constrictum*", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 11, p. 6673–6679, 2005. DOI: 10.1128/AEM.71.11.6673-6679.2005..

R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2022. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria..

SCHÄFER, A., USTOHAL, P., HARMS, H., et al. "Transport of bacteria in unsaturated porous media", *Journal of Contaminant Hydrology*, v. 33, n. 1–2, p. 149–169, 1998. DOI: 10.1016/S0169-7722(98)00069-2.

SCHERLACH, K., GRAUPNER, K., HERTWECK, C. "Molecular Bacteria-Fungi Interactions: Effects on Environment, Food, and Medicine", *Annual Review of Microbiology*, v. 67, n. 1, p. 375–397, 2013. DOI: 10.1146/annurev-micro-092412-155702.

SCHEUBLIN, T. R., SANDERS, I. R., KEEL, C., et al. "Characterisation of microbial communities colonising the hyphal surfaces of arbuscular mycorrhizal fungi", *ISME Journal*, v. 4, n. 6, p. 752–763, 2010. DOI: 10.1038/ismej.2010.5.

SHEN, Q., KIRSCHBAUM, M. U. F., HEDLEY, M. J., et al. "Testing an alternative method for estimating the length of fungal hyphae using photomicrography and image processing", *PLoS ONE*, v. 11, n. 6, p. 1–12, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0157017.

SIMON, A., BINDSCHEDLER, S., JOB, D., et al. "Exploiting the fungal highway: Development of a novel tool for the in situ isolation of bacteria migrating along fungal mycelium", *FEMS Microbiology Ecology*, v. 91, n. 11, p. 1–13, 2015. DOI: 10.1093/femsec/fiv116.

SINGH, A., SINGH, D. P., TIWARI, R., et al. "Taxonomic and functional annotation of gut bacterial communities of *Eisenia foetida* and *Perionyx excavatus*", *Microbiological Research*, v. 175, p. 48–56, 2015. DOI: 10.1016/j.micres.2015.03.003.

SKINNER, S. O., SEPÚLVEDA, L. A., XU, H., et al. "Measuring mRNA copy number in individual *Escherichia coli* cells using single-molecule fluorescent in situ hybridization", *Nature Protocols*, v. 8, n. 6, p. 1100–1113, 2013. DOI: 10.1038/nprot.2013.066.

SUDOVÁ, R., SÝKOROVÁ, Z., RYDLOVÁ, J., et al. "Rhizoglosum melanum, a new arbuscular mycorrhizal fungal species associated with submerged plants in freshwater lake Avsjøen in Norway", *Mycological Progress*, v. 14, n. 3, 2015. DOI: 10.1007/s11557-015-1031-5. .

SVENNINGSSEN, N. B., WATTS-WILLIAMS, S. J., JONER, E. J., et al. "Suppression of the activity of arbuscular mycorrhizal fungi by the soil microbiota", *ISME Journal*, v. 12, n. 5, p. 1296–1307, 2018. DOI: 10.1038/s41396-018-0059-3.

TAYLOR, T. N., REMY, W., HASS, H., et al. "Fossil Arbuscular Mycorrhizae from the Early Devonian Author ( s ): T . N . Taylor , W . Remy , H . Hass and H . Kerp Stable

URL : <http://www.jstor.org/stable/3760776> REFERENCES Linked references are available on JSTOR for this article : You may need to log in, v. 87, n. 4, p. 560–573, 2017.

TECON, R., OR, D. "Bacterial flagellar motility on hydrated rough surfaces controlled by aqueous film thickness and connectedness", *Scientific Reports*, v. 6, n. December 2016, p. 1–11, 2016. DOI: 10.1038/srep19409. .

TECON, R., OR, D. "Biophysical processes supporting the diversity of microbial life in soil", *FEMS Microbiology Reviews*, v. 41, n. 5, p. 599–623, 2017. DOI: 10.1093/femsre/fux039. .

TOJU, H., PEAY, K. G., YAMAMICHI, M., et al. "Core microbiomes for sustainable agroecosystems", *Nature Plants*, v. 4, n. 5, p. 247–257, 2018. DOI: 10.1038/s41477-018-0139-4.

TOLJANDER, J. F., ARTURSSON, V., PAUL, L. R., et al. "Attachment of different soil bacteria to arbuscular mycorrhizal fungal extraradical hyphae is determined by hyphal vitality and fungal species", *FEMS Microbiology Letters*, v. 254, n. 1, p. 34–40, 2006. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2005.00003.x.

TORSVIK, V., ØVREÅS, L. "Microbial diversity and function in soil: From genes to ecosystems", *Current Opinion in Microbiology*, v. 5, n. 3, p. 240–245, 2002. DOI: 10.1016/S1369-5274(02)00324-7.

WANG, B., QIU, Y. L. "Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants", *Mycorrhiza*, v. 16, n. 5, p. 299–363, 2006. DOI: 10.1007/s00572-005-0033-6.

WARMINK, J. A., NAZIR, R., CORTEN, B., et al. "Hitchhikers on the fungal highway: The helper effect for bacterial migration via fungal hyphae", *Soil Biology and Biochemistry*, v. 43, n. 4, p. 760–765, 2011. DOI: 10.1016/j.soilbio.2010.12.009.

WARMINK, J. A., VAN ELSAS, J. D. "Migratory response of soil bacteria to *Lyophyllum* sp. strain Karsten In soil microcosms", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, n. 9, p. 2820–2830, 2009. DOI: 10.1128/AEM.02110-08.

WADHAMS, G. H., ARMITAGE, J. P. "Making sense of it all: Bacterial chemotaxis", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 5, n. 12, p. 1024–1037, 2004. DOI: 10.1038/nrm1524. .

WATERFIELD, N. R., WREN, B. W., FRENCH-CONSTANT, R. H. "Invertebrates as a source of emerging human pathogens", *Nature Reviews Microbiology*, v. 2, n. 10, p. 833–841, 2004. DOI: 10.1038/nrmicro1008.

WIJAYAWARDENE, N. N., PAWŁOWSKA, J., LETCHER, P. M., et al. Notes for genera: basal clades of Fungi (including Aphelidiomycota, Basidiobolomycota, Blastocladiomycota, Calcarisporiellomycota, Caulochytriomycota, Chytridiomycota, Entomophthoromycota, Glomeromycota, Kickxellomycota, Monoblepharomycota, Mortierellomycota, Mucoromycota, Neocallimastigomycota, Olpidiomycota, Rozellomycota and Zoopagomycota). [S.l: s.n.], 2018. v. 92.

WORRICH, A., KÖNIG, S., MILTNER, A., et al. "Mycelium-like networks increase bacterial dispersal, growth, and biodegradation in a model ecosystem at various water potentials", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 82, n. 10, p. 2902–2908, 2016. DOI: 10.1128/AEM.03901-15.

XIAO, X., CHEN, H., CHEN, H., et al. "Impact of *Bacillus subtilis* JA, a biocontrol strain of fungal plant pathogens, on arbuscular mycorrhiza formation in *Zea mays*", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 24, n. 7, p. 1133–1137, 2008. DOI: 10.1007/s11274-007-9584-3.

YANG, P., OLIVEIRA DA ROCHA CALIXTO, R., VAN ELSAS, J. D. "Migration of *Paraburkholderia terrae* BS001 Along Old Fungal Hyphae in Soil at Various pH Levels", *Microbial Ecology*, v. 76, n. 2, p. 443–452, 2018. DOI: 10.1007/s00248-017-1137-1.

YANG, P., VAN ELSAS, J. D. "Mechanisms and ecological implications of the movement of bacteria in soil", *Applied Soil Ecology*, v. 129, n. May, p. 112–120, 2018. DOI: 10.1016/j.apsoil.2018.04.014.

YANG, P., ZHANG, M., VAN ELSAS, J. D. "Role of flagella and type four pili in the co-migration of *Burkholderia terrae* BS001 with fungal hyphae through soil", *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-02959-8.

YANG, P., ZHANG, M., WARMINK, J. A., et al. "The type three secretion system facilitates migration of *Burkholderia terrae* BS001 in the mycosphere of two soil-borne fungi", *Biology and Fertility of Soils*, v. 52, n. 7, p. 1037–1046, 2016. DOI: 10.1007/s00374-016-1140-6.

YO, Y. "Darkness visible : reflections on underground ecology", *Journal of Ecology*, p. 231–243, 2005. DOI: 10.1111/j.1365-2745.2005.00990.x.

ZHANG, Y., KASTMAN, E. K., GUAUTO, J. S., et al. "Fungal networks shape dynamics of bacterial dispersal and community assembly in cheese rind microbiomes", *Nature Communications*, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2018. DOI: 10.1038/s41467-017-02522-z.

ZHOU, J., CHAI, X., ZHANG, L., et al. "Different Arbuscular Mycorrhizal Fungi Co-colonizing on a Single Plant Root System Recruit Distinct Microbiomes", *mSystems*, v. 5, n. 6, p. 1–15, 2020. DOI: 10.1128/msystems.00929-20. .