



MARIANA DIAS

**DIVERSIDADE E PRODUÇÃO DE CELULASES
POR BACTÉRIAS EPIFÍTICAS DE FRUTOS
TÍPICOS DO CERRADO MINEIRO**

**LAVRAS – MG
2012**

MARIANA DIAS

**DIVERSIDADE E PRODUÇÃO DE CELULASES POR BACTÉRIAS
EPIFÍTICAS DE FRUTOS TÍPICOS DO CERRADO MINEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração Ecologia, Genética e Fisiologia de microrganismos, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista

**LAVRAS – MG
2012**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Dias, Mariana.

Diversidade e produção de celulasas por bactérias epifíticas de
frutos típicos do Cerrado mineiro / Mariana Dias. – Lavras : UFLA,
2012.

110 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Cristina Ferreira Silva e Batista.

Bibliografia.

1. Isolamento bacteriano. 2. Microbiota epifítica. 3. Enzimas. 4.
DDGE. 5. Superfície de resposta. 6. Microbiologia industrial. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 660.62

MARIANA DIAS

**DIVERSIDADE E PRODUÇÃO DE CELULASES POR BACTÉRIAS
EPIFÍTICAS DE FRUTOS TÍPICOS DO CERRADO MINEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração Ecologia, Genética e Fisiologia de microrganismos, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 23 de fevereiro de 2012.

Dra. Rosane Freitas Schwan	UFLA
Dr. Whasley Ferreira Duarte	UFLA
Dra. Lílian de Araújo Pantoja	UFVJM

Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista
Orientadora

**LAVRAS – MG
2012**

Aos meus queridos pais, Eriberto e Iêda;

Aos meus irmãos, Ana Maria e Gabriel;

Ao meu grande amor e companheiro, Igor,

que são minha Fortaleza e Refúgio...

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus e à virgem Maria, pela vida e saúde e por toda a força espiritual concedida para superar todos os desafios.

À professora Cristina, pela orientação, ensinamentos e confiança.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Biologia.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e professores.

À FAPEMIG e CNPq, pelo financiamento do projeto e concessão de bolsa.

Ao Igor, pelo carinho, paciência e incentivo para cumprir esta etapa.

A Marcelinha e Tati, minhas estagiárias, pela ajuda e acompanhamento durante todo o experimento.

A Gabi e Angélica, por terem sido tão prestativas e dispostas a ensinar e ajudar.

A Karina, pela amizade e apoio.

Ao professor Whasley, pela ajuda na interpretação dos dados estatísticos.

A Carolina Mariane Moreira, minha grande amiga, pela força e conselhos.

A todos meus colegas de laboratório, pelo companheirismo e momentos de descontração, em especial a Andréia e Monique, pela amizade conquistada e pelo convívio diário.

As funcionárias Ivani, Cidinha e Rose, pelos serviços prestados.

Aos meus familiares, que sempre torceram por mim.

Aos amigos de Lavras, em especial às Repúblicas Poucas e Boas e Arapuça e às amigas Ana Karla, Helena, Maiara e Vivi.

E a todas as pessoas que estiveram presentes na minha vida durante essa conquista.

Muito Obrigada!

“Louvai ao Senhor porque ele é bom, eterna é a sua misericórdia”

(Salmos 106)

RESUMO

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, mas pouco é conhecido da fauna, flora e microbiota associada a ele. É importante o conhecimento da diversidade visando à conservação e à aplicação biotecnológica destes seres vivos. Este trabalho foi realizado com os principais objetivos de caracterizar e identificar a comunidade bacteriana presente em frutos nativos do Cerrado mineiro e selecionar bactérias produtoras de celulase e otimizar o processo de produção enzimática. O isolamento bacteriano foi realizado utilizando os meios ágar nutriente (AN), Eosina Azul de Metileno (EMB) e Man, Rogosa e Sharpe (MRS). A seleção de bactérias produtoras de celulase foi por meio do teste qualitativo em meio sintético (ágar CMC). Dois isolados foram selecionados para avaliação da melhor atividade enzimática de endoglucanase, exoglucanase e β -glucosidase, utilizando-se o delineamento experimental composto central rotacional (DCCR). Das 33 amostras de frutos das regiões mineiras, obtiveram-se 1.560 isolados agrupados em 717 morfotipos diferentes. Foram identificados 21 gêneros e 29 espécies bacterianas associadas aos frutos de Passos e 28 espécies e 18 gêneros tanto para os frutos de Arcos como os de Luminárias. Dentre os gêneros comuns para as três regiões, estão *Streptomyces*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Curtobacterium*, *Microbacterium*, *Methylobacterium* e *Curtobacterium*. As espécies *Methylobacterium* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Clostridium* sp., *Pantoea* sp., *Enterobacter* sp. e bactérias gram-negativas do grupo das proteobactérias foram detectadas tanto por isolamento como por DGGE; oito espécies de bactérias não cultiváveis foram detectadas pelo DGGE. As espécies *Lactobacillus fermentum*, *Acinetobacter* sp. e *Methylobacterium methanica* foram detectadas somente pelo método independente de cultivo. Dos 600 isolados avaliados no teste qualitativo, 178 cepas (30%) foram capazes de produzir celulase. A partir do DCCR foi possível observar que somente o pH teve efeito sobre a atividade de endoglucanase do isolado UFLA BCEF1130.

Palavras-chave: Isolamento bacteriano. Microbiota epifítica. DGGE. Enzimas. Superfície de resposta.

ABSTRACT

The Cerrado is the second largest Brazilian biome, little is known about its wild fauna, flora and microbiota. It is important to be aware of its diversity for conservation and biotechnological application of these living beings. This work aimed to: characterize and identify the bacterial community present in fruits native from Minas Gerais Cerrado, select cellulase-producing bacteria and optimize the process of enzyme production. The bacterial isolation was done using the nutrient agar media (AN), eosin blue methylene (EMB) and Man, Rogosa and sharpe (MRS). The selection of cellulose-producing bacteria was done by means of qualitative test on synthetic medium (Agar CMC). Two isolates were selected to evaluate the best enzyme activity of endoglucanase, exoglucanase and β -glucosidase, using the central composite rotational experimental design (DCCR). From 33 fruit samples, were obtained 1560 isolates grouped into 717 different morphotypes. 21 genera and 29 bacterial species were identified in association with the fruits from the city of Passos and 28 species and 18 genera for both cities, Arcos and Luminarias. Among the genera common to the three regions are *Streptomyces*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Burkholderia*, *Curtobacterium*, *Microbacterium*, *Methylobacterium* and *Curtobacterium*; The species *Methylobacterium sp.*, *Stenotrophomonas sp.*, *Clostridium sp.*, *Pantoea sp.*, *Enterobacter sp.* and Gram-negative bacteria belonging to the Proteobacteria group detected by both isolation and DGGE and eight species of non culturable bacteria detected by DGGE. The species (*Lactobacillus fermentum*, *Acinetobacter sp.* and *Methylomonas methanica*) were detected only by independent method of cultivation. From the 600 isolates evaluated in the qualitative test, 178 strains (30%) were able to produce cellulase. From DCCR it was possible to observe that only pH had effect on the endoglucanase activity of UFLA BCEF1130 isolate.

Keywords: Bacterial isolation. Epiphytic microbiota. DGGE. Enzymes. Response surface.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fitofisionomias do Cerrado.....	18
Figura 2	Frutos típicos do Cerrado: A) ananás, B) cagaita, C) pequi, D) araçá, E) umbu, F) marolo, G) gabirola, H) lobeira e I) buriti	27
Figura 3	Atuação das enzimas celulasas sobre a estrutura da celulose. (Fonte BON et al., 2008)	33
Figura 4	Mapa com a localização aproximada dos municípios de Passos, Arcos e Luminárias, MG, pontos de coletas dos frutos utilizados no isolamento bacteriano	40
Figura 5	Dendograma correspondente aos isolados representativos obtidos das quinze amostras de frutos da região de Passos, MG	62
Figura 6	Dendograma correspondente aos isolados representativos obtidos das oito amostras de frutos da região de Arcos, MG	63
Figura 7	Dendograma correspondente aos isolados representativos obtidos das dez amostras de frutos da região de Luminárias, MG	64
Figura 8	Perfis de PCR-DGGE de 33 amostras de frutos das regiões de Passos, Arcos e Luminárias, com gradiente desnaturante de 20% a 50%. Os números se referem às diferentes amostras de frutos coletadas: coluna de 1 a 15 frutos de Passos (erva-de-rato, pimentinha-do-mato, cabelo-de-negro, cafezinho-do-mato, pixirica, muxiba, murici, araçá, aroeirinha, pau-amargo, erva-de-passarinho - <i>Psittacanthus robustus</i> , jacatirão, fruta-de-pomba, erva-de-passarinho - <i>Psittacanthus acinarius</i> , bejuco-colorado, respectivamente); coluna 16 a 23 frutos de Arcos, (jatobá, arrebenta-boi, ananás, marolo, goiaba, pequi, marolinho e midigrilo, respectivamente) e coluna 24 a 33, frutos coletados em Luminárias (pau-santo, muxiba, murici-do-cerrado, pixirica - <i>Miconia pseudonervosa</i> , erva-de-jabutí, azeitona-do-mato, capororoca, pixirica - <i>Miconia chamissois</i> , jacatirão, pixirica - <i>Miconia pepericarpa</i> , respectivamente). As letras correspondem às espécies correspondentes às diferentes bandas: a- bactéria não cultivável FJ406571.1; b - bactéria de solo não cultivável GQ351443.1; c - <i>Methylobacterium gregans</i> HM803941.1; d- bactéria não cultivável FJ403001.1; e- <i>Stenotrophomonas sp.</i> FJ609992.1; f- <i>Methylobacterium sp.</i> JN590732.1; g - bactéria não cultivável FN421647.1; h - bactéria não cultivável JF681620.1; i - bactéria não cultivável EF990686; j - bactéria não cultivável GU764869.1; k - <i>Lactobacillus fermentum</i> JQ083644.1; l - não identificada; m - <i>Enterobacter aerogenes</i> CP002824.1 ; n - α -	

Proteobacterium não cultivável FJ938135.1; o - *Clostridium* sp. FJ609997.1; p - *Pantoea* sp. FJ611805.1; q - não identificada; r - *Acinetobacter* sp. CR543861.1; s - *Methylomonas methanica* CP002738.1.....77

Figura 9 Halo ao redor das cepas de bactérias produtoras de celulase. a) UFLA BCEF 1130 e b) UFLA BCEF 1615..... 82

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Gráfico da curva analítica de glicose – absorvância x concentração de glicose.....	51
Gráfico 2	Gráfico da curva analítica de ρ -nitrofenol – absorvância x concentração de ρ -nitrofenol.....	53
Gráfico 3	Gráfico da curva analítica de albumina de soro bovino (BSA) – absorvância x concentração de reagente de Bradford.....	54
Gráfico 4	Superfície resposta para a variável dependente Y_3 (atividade endoglucanase no tempo 3). (A) efeito da concentração de $(NH_4)_2SO_4$ e inóculo; (B) efeito do pH e inóculo; (C) efeito do pH e $(NH_4)_2SO_4$	87
Gráfico 5	Superfície resposta para a variável dependente Y_5 (atividade endoglucanase no tempo 5). (D) efeito da concentração de $(NH_4)_2SO_4$ e inóculo; (E) efeito do pH e inóculo; (F) efeito do pH e $(NH_4)_2SO_4$	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Espécies de frutíferas do cerrado coletados nas regiões de Passos, Arcos e Luminárias (MG), utilizadas para o isolamento de bactérias epifíticas	41
Tabela 2	Valores utilizados no DCCR para as três variáveis testadas para avaliação da atividade celulolítica dos isolados bacterianos	48
Tabela 3	Delineamento experimental composto central rotacional para as três variáveis independentes pH, inóculo e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	49
Tabela 4	Contagem média da população bacteriana crescida nos quatro meios utilizados para o isolamento, a partir das 15 amostras de frutos coletados em Passos, MG	57
Tabela 5	Contagem média da população bacteriana crescida nos quatro meios utilizados para o isolamento, a partir das oito amostras de frutos coletados em Arcos, MG	58
Tabela 6	Contagem média da população bacteriana crescida nos quatro meios utilizados para o isolamento, a partir das dez amostras de frutos coletados em Luminárias, MG	59
Tabela 7	Identificação dos isolados bacterianos procedentes da região de Passos, MG, o número de acesso (NA) correspondente no GeneBank, a respectiva porcentagem de similaridade (S%) e a estimativa populacional ($\log\text{UFC.g}^{-1}$)	67
Tabela 8	Identificação dos isolados bacterianos procedentes da região de Arcos, o número de acesso (NA) correspondente no GeneBank, a respectiva porcentagem de similaridade (S%) e a estimativa populacional ($\log\text{UFC.g}^{-1}$)	70
Tabela 9	Identificação dos isolados bacterianos procedentes da região de Luminárias, o número de acesso (NA) correspondente no GeneBank, a respectiva porcentagem de similaridade (S%) e a estimativa populacional ($\log\text{UFC.g}^{-1}$)	71
Tabela 10	Atividade enzimática específica (U/mg de proteína $\times 10^3$) para endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase, obtida nos 17 ensaios avaliados por DCCR, durante o 3° (Y_3) e o 5° (Y_5) dia de produção	84
Tabela 11	Atividade enzimática específica (U/mg de proteína $\times 10^3$) para endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase, obtida nos 17 ensaios avaliados por DCCR durante o 3° (Y_3) e no 5° (Y_5) dia de produção	85
Tabela 12	Análise de variância dos resultados experimentais do DCCR, para as variáveis respostas (Y_3 e Y_5) do isolado UFLA BCEF1130	86

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	Bioma cerrado	17
2.1.1	Biodiversidade em Minas Gerais	23
2.1.2	Frutos nativos do cerrado	25
2.1.3	Microbiota presente no cerrado	28
2.2	Enzimas	31
2.2.1	Celulases	32
2.2.2	Microrganismos produtores de celulases.....	34
2.3	Avaliação de comunidades microbianas por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)	36
3	MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1	Local de coleta e amostragem dos frutos	39
3.2	Isolamento dos microrganismos	42
3.3	Caracterização morfológica, bioquímica e agrupamento	43
3.4	Extração de dna dos isolados obtidos dos frutos.....	44
3.6	Amplificação e sequenciamento do gene 16S RRNA	44
3.7	Extração de dna e análises por pcr-dgge da comunidade bacteriana presente nas amostras de frutos	45
3.7.1	Extração de DNA	45
3.7.2	Amplificação por reação da polimerase em cadeia (PCR) para bactérias.....	45
3.7.3	Eletroforese de gel com gradiente desnaturante (DGGE).....	46
3.7.3.1	Identificação e análise das bandas de DGGE	46
3.8	Avaliação enzimática qualitativa	47
3.9	Avaliação enzimática quantitativa	47
3.9.1	Delineamento experimental	48
3.9.2	Microrganismos e condições de cultivo	49
3.9.3	Condições da fermentação	50
3.9.4	Determinação da atividade de exo B-1,4 glucanase (EC 3.2.1.91) ..	50
3.9.5	Determinação da atividade de endo B-1,4 glucanase (EC 3.2.1.4) ..	52
3.9.6	Determinação da atividade de B-glicosidase (EC 3.2.1.21)	52
3.9.7	Dosagem de proteínas totais.....	53
3.10	Análise estatística	54
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1	Enumeração e isolamento dos grupos bacterianos	55
5.2	Caracterização morfológica, bioquímica e agrupamento	60
5.3	Identificação das bactérias por análise do gene 16S RDNA e sequenciamento	65

5.4	Espécies de bactérias detectadas por PCR-DGGE	75
5.5	Avaliação enzimática qualitativa	80
5.6	Avaliação enzimática quantitativa	83
6	CONCLUSÕES	91
	REFERÊNCIAS	92

1 INTRODUÇÃO

O Cerrado, bioma típico da zona tropical brasileira, é uma formação savânica que ocupa, aproximadamente, 2,0 milhões de km² e corresponde a 23,1% do território nacional. É considerado o segundo maior bioma brasileiro, sendo superado em área apenas pela floresta Amazônia.

A grande diversidade de espécies de animais e plantas está associada com a diversidade de ambientes, determinando uma grande riqueza florística, que coloca a flora do cerrado como a mais rica entre as savanas do mundo. O bioma cerrado é muito rico em espécies frutíferas cujos frutos se destacam, principalmente, por suas agradáveis e, até mesmo, exóticas peculiaridades sensoriais, como cor, sabor e aroma, embora ainda sejam pouco explorados comercialmente ou cientificamente.

Estima-se que, até 2030, o Cerrado seja totalmente destruído, caso continue a perda anual de 2,2 milhões de hectares de áreas nativas. Pouco é conhecido da fauna e flora deste bioma e, conseqüentemente, da microbiota associada a eles e aos solos.

A diversidade dos microrganismos no bioma Cerrado está diretamente relacionada com suas características morfofisiológicas e produtos do metabolismo primário e secundário, como produção de enzimas extracelulares, antibióticos, ácidos orgânicos e álcoois. Muitas vezes, esses compostos são possíveis de aplicação biotecnológica, o que desperta o interesse para uso industrial.

Atualmente, as enzimas são amplamente utilizadas em diversos segmentos da indústria. Entre os produtos microbianos com ampla aplicação biotecnológica destacam-se as celulasas. A colonização dos frutos por microrganismos deve-se à sua capacidade de produção de celulasas.

Para se obter uma avaliação mais completa da diversidade microbiana de amostras ambientais, é necessário o uso de métodos polifásicos e moleculares, como, por exemplo, *repetitive extragenic palindromic*, ou REP-PCR e eletroforese em gel com gradiente desnaturante, ou DGGE, em conjunto com as técnicas tradicionais bioquímicas e morfológicas de identificação.

Este trabalho foi realizado com os principais objetivos de caracterizar e identificar a comunidade bacteriana presente em frutos nativos do Cerrado mineiro, selecionar bactérias produtoras de celulase e otimizar o processo de produção enzimática.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Bioma Cerrado

O Cerrado, bioma típico da zona tropical brasileira, é uma formação savânica que ocupa, aproximadamente, 2,0 milhões de km² e corresponde a 24% do território nacional. É considerado o segundo maior bioma brasileiro, sendo superado em área apenas pela Amazônia (KLINK; MACHADO, 2005).

Situa-se no Planalto Central, com pequena inclusão no Paraguai e na Bolívia, estendendo-se pelos estados de Goiás, Tocantins, Distrito Federal e porções dos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, parte do Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Bahia, Piauí, Pará e Rondônia (BUSCHBACHER, 2000). É composto por diversas fitofisionomias, que variam desde campos abertos até florestas densas, que podem atingir 30 m de altura. Contudo, a fitofisionomia mais comum do Cerrado é aquela que apresenta árvores e arbustos tortuosos, porte baixo e a casca grossa (com muita cortiça), o que é conhecido como o Cerrado Típico. Além dessa fitofisionomia, existem também Matas de Galerias, Matas Secas, o Cerradão, as Veredas, os Campos Rupestres, os Campos Úmidos e outros que, junto com o Cerrado Típico, formam o Bioma Cerrado (AQUINO; OLIVEIRA, 2006) (Figura 1).

O Cerrado abriga, em seus limites, três das maiores bacias hidrográficas da América do Sul e oito das grandes bacias hidrográficas brasileiras (OLIVEIRA-FILHO; RATTER, 2002). Devido à sua constituição em zonas de planalto, possui diversas nascentes de rios, o que, conseqüentemente, o coloca em uma posição importante, do ponto de vista da recarga hídrica (LIMA; SILVA, 2005).

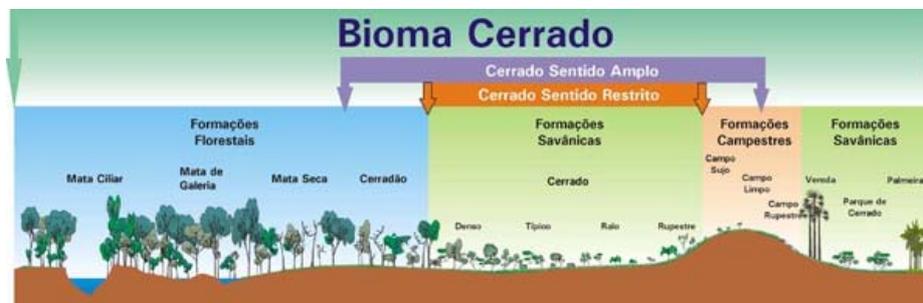


Figura 1 Fitofisionomias encontradas no Bioma Cerrado.

O clima dessa região é estacional, em que um período chuvoso, que dura de outubro a março, é seguido por um período seco, de abril a setembro. A precipitação média anual é de 1.500 mm e as temperaturas são, geralmente, amenas ao longo do ano, entre 22 °C e 27 °C, em média (KLINK; MACHADO, 2005).

A principal classe de solos presente na região do Cerrado é composta por *Latossolos* que ocupam as vastas chapadas de relevo plano a suave-ondulado, o que corresponde a, aproximadamente, 46% da área total deste bioma (REATTO; MARTINS, 2005). A maior parte dos solos do Cerrado apresenta baixa fertilidade, principalmente em solos antigos e lixiviados, como é o caso dos *Latossolos*, nos quais há deficiências em fósforo e cálcio e outros micronutrientes essenciais ao desenvolvimento das plantas (MOTTA; CURI; FRANZMEIER, 2002). Estas propriedades físicas tornam esses solos adequados para a produção agrícola, embora apresentem limitações quanto à fertilidade natural. Com a aplicação de corretivos para a acidez e de fertilizantes, e com o auxílio da mecanização nos solos do Cerrado, esse bioma tem sido palco de grande avanço no cenário agropecuário, nas últimas décadas (KLINK; MOREIRA, 2002).

Avalia-se que cerca de 10% da biodiversidade mundial encontra-se no Cerrado (MITTERMEIER et al., 2005). A flora do bioma é tão rica quanto a sua

variação de ambientes; a listagem das espécies da flora fanerógama nele existente já ultrapassa a marca das 11.000 espécies nativas (WALTER, 2006), o que o coloca entre os ambientes terrestres mais ricos em biodiversidade. No entanto, a imponência de sua riqueza não foi suficiente para conter o avanço da degradação neste bioma. Atualmente, o Cerrado integra a lista dos 34 ambientes mundiais mais ricos em biodiversidade, com elevado grau de endemismo e altamente ameaçados de extinção (*hot spots*) (MITTERMEIER et al., 2005).

Apesar da importância desse bioma, suas áreas nativas vêm diminuindo em decorrência da falta de planejamento no uso da terra. A retirada da vegetação pode causar erosão do solo e poluição dos rios (AQUINO; OLIVEIRA, 2006). Estima-se que cerca de 70% das áreas do Cerrado já tenham sido alteradas e que, atualmente, apenas 1,5% de sua extensão original estejam protegidos em unidades de conservação (KLINK; MOREIRA, 2002; HENRIQUES, 2003). O acelerado processo de degradação motivado principalmente pelo crescimento populacional e pela expansão das fronteiras agrícolas vem convertendo áreas naturais em grandes pastagens e cidades (KLINK; MACHADO, 2005).

Segundo relatório produzido pela Conservation International (CI), abordando as estimativas de perda de áreas do Cerrado, se a atual taxa de desmatamento no bioma for mantida, cerca de 2,2 milhões de hectares por ano, em meados de 2030, a vegetação do Cerrado poderá ter sido completamente modificada. Restarão apenas as áreas nativas preservadas em unidades de conservação, nas reservas indígenas e em algumas poucas áreas impróprias à instalação e ao desenvolvimento da agroindústria e ocupação antrópica (MACHADO et al., 2004).

As transformações ocorridas no Cerrado também trouxeram grandes danos ambientais, como fragmentação de habitats, extinção da biodiversidade, invasão de espécies exóticas, erosão dos solos, poluição de aquíferos, degradação de ecossistemas, alterações nos regimes de queimadas,

desequilíbrios no ciclo do carbono e, possivelmente, modificações climáticas regionais (KLINK; MOREIRA, 2002).

Com a extinção do cerrado, há também a dizimação de inúmeras espécies vegetais e animais, uma vez que há espécies que são endêmicas. Porém, mesmo com o desaparecimento destas espécies, a biodiversidade do Cerrado ainda é bastante expressiva e deve ser preservada. A grande diversidade é justificada pela variação horizontal do cerrado, possibilitando encontrar, na mesma região, áreas campestres, capões de mata, florestas e áreas brejosas (MACHADO et al., 2004). Assim, é importante manter o mosaico de vegetação natural como estratégia de se manter a biodiversidade desse bioma, bem como suas intra e inter-relações espécie-espécie.

Há poucos estudos sobre a flora e a fauna do bioma Cerrado e poucos relatos sobre a diversidade microbiana associada à flora e à fauna naturalmente presentes no solo. Devido ao constante avanço das fronteiras agrícolas, os estudos da microbiota referem-se aos impactos que diferentes culturas e sistemas de cultivo promovem sobre a diversidade e a função dos microrganismos no solo (CARVALHO, 2008).

Vários são os aspectos que justificam a preservação do Cerrado, das quais as principais são: i) a manutenção da estrutura física e química do solo; ii) fertilidade do solo; iii) manutenção do clima da região; iv) preservação da macro, meso e microfauna; v) preservação da flora; vi) preservação da microbiota nativa; vii) preservação de espécies vegetais com potencial medicinal e viii) manutenção de plantas utilizadas para consumo humano (ROCHA et al., 2008; QUIRINO et al., 2009; RODRIGUES; CARVALHO, 2001; GUIMARÃES; SILVA, 2008).

Os microrganismos desempenham papel fundamental da manutenção da diversidade da fauna e flora, uma vez que estão diretamente relacionados a eles, seja na manutenção da estrutura e da fertilidade do solo, bem como nas

associações simbióticas com plantas (micorrizas e rizóbios) e animais. Os microrganismos também podem ser utilizados como indicadores biológicos da sustentabilidade de um local (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

As bactérias estão diretamente envolvidas na decomposição da matéria orgânica e na ciclagem de nutrientes, em transformações bioquímicas específicas, como nitrificação e desnitrificação, na fixação biológica de nitrogênio, na ação antagônica sobre patógenos e na produção de substâncias de crescimento (BERNARDES; SANTOS, 2006). Os fungos filamentosos estão, geralmente, associados aos processos de micorrização (DETMANN et al., 2008) e a degradação de material ligno-celulolítico, promovendo a ciclagem de nutrientes (BERNARDES; SANTOS, 2006), além de poderem produzir metabólitos bioativos (PFENNING; ABREU, 2006).

Pouco se conhece sobre a microbiota presente nos frutos e solos de Cerrado preservados. Em vários trabalhos enfatiza-se a quantificação da biomassa microbiana em solos de Cerrado que estão sob cultivo agrícola, especialmente soja, e pastagens (MENDES et al., 1999; MENDES et al., 2003).

A diversidade biológica do Cerrado é bastante expressiva e muito associada à composição vegetal e à variação dos ecossistemas. Enquanto a estratificação vertical (existência de várias 'camadas' de ambientes) da Amazônia ou a Mata Atlântica proporcionam oportunidades diversas para o estabelecimento das espécies, no Cerrado a heterogeneidade espacial (a variação dos ecossistemas ao longo do espaço) seria um fator determinante para a ocorrência de um variado número de espécies. Os ambientes do Cerrado variam significativamente no sentido horizontal, e áreas campestres, capões de mata, florestas e áreas brejosas podem existir em uma mesma região (MACHADO et al., 2004).

Com toda essa variação de ambientes, as espécies de animais e plantas apresentam grande associação com os ecossistemas locais, podendo ser

encontrados exemplos de espécies muito ligadas aos ambientes naturais. Assim, aves, como o soldadinho (*Antilophia galeata*) ou o pula-pula-de-sobrancelha (*Basileuterus leucophrys*), somente podem ser encontradas em matas de galeria (MACHADO et al., 2004); mamíferos, como o ratinho *Kunsia fronto*, só existem em formações de cerrado mais denso (MARINHO-FILHO; RODRIGUEZ; JUAREZ, 2002); lagartos, como o *Cnemidophorus ocellifer*, só ocorrem em cerrados de terrenos arenosos; palmeiras, como o buriti (*Mauritia flexuosa*), estão muito associadas com as formações de veredas e orquídeas, como a *Constancia cipoense*, só ocorrem em campos rupestres. Vivemos, na atualidade, uma permanente tensão entre a sustentabilidade dos biomas mais vulneráveis pelas modificações antrópicas e a sobrevivência futura de grupos taxonômicos que têm estreita relação com os mesmos (SIQUEIRA, 2006).

Estes biomas são os habitats naturais da maioria das espécies, constituindo verdadeiros centros de diversidade. Ainda que os cerrados representem um espaço considerável do território brasileiro, constituído por um complexo de biomas com diferentes fitofisionomias (COUTINHO, 2006), não se pode ignorar que as opções políticas e econômicas dos últimos anos, sobretudo com a expansão da agricultura e do agronegócio, têm levado a um processo irrefreável de destruição dos cerrados.

Relatórios mostraram que o Cerrado é uma das 25 áreas do mundo consideradas críticas para a conservação, devido à riqueza biológica e à alta pressão antrópica (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2002a). O que preocupa é que este processo está na contramão da história geobiológica deste bioma, que levou milhões de anos de sucessivos processos evolutivos e adaptativos e que está sendo destruído numa escala cronológica muito pequena. Somente nos últimos 30 anos já se perdeu uma faixa considerável deste bioma no território brasileiro (SIQUEIRA, 2006).

Alternativa razoável e mais fácil de ser concretizada diz respeito à ampliação de unidades de conservação do bioma cerrado, sobretudo nos estados brasileiros nos quais ele ocupa uma área considerável do território. Embora esta ampliação venha acontecendo nos últimos anos, não se pode negar que a mesma ainda é bastante tímida e acompanhada de alguns problemas (SIQUEIRA, 2006). O próprio Ministério do Meio Ambiente, no relatório sobre a Biodiversidade Brasileira, reconhece que “as unidades de conservação do cerrado são mal distribuídas quanto às categorias de manejo, à representação geográfica das regiões e dos estados, quanto ao tamanho das unidades e à representatividade da enorme heterogeneidade regional do bioma” (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2002).

Um dos principais desafios na conservação do Cerrado será demonstrar a importância da biodiversidade no funcionamento desse ecossistema (KLINK; MACHADO, 2005). Considerando a rápida taxa de transformação do uso do solo do cerrado, estudos visando o melhor entendimento dos processos que regulam as comunidades microbianas em ambientes naturais e em função de alterações no uso do solo são fundamentais para compreender a ecologia desse ecossistema (CARVALHO, 2008).

2.1.1 Biodiversidade em Minas Gerais

Minas Gerais apresenta grande diversidade física em uma área de 586.528 km² dividida entre seus 853 municípios (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2007). Com suas diferentes formas de relevo, somadas às características específicas de seus solos, retrata uma infinidade de paisagens com ambientes únicos a serem preservados.

A ampla superfície, o clima, o relevo e os recursos hídricos do território mineiro propiciaram o desenvolvimento de uma cobertura vegetal extremamente

rica e diversa, agrupada em três grandes biomas: a Mata Atlântica, o Cerrado e a Caatinga, responsáveis pela grande diversidade de paisagens. Essa variedade resulta em riqueza extraordinária de flora e, por conseguinte, de fauna. Entretanto, toda essa diversidade de paisagens e formas biológicas encontra-se fortemente ameaçada em Minas Gerais, devido a processos históricos de uma ocupação territorial desordenada (DRUMMOND et al., 2005).

As listas vermelhas vigentes da flora e da fauna de Minas Gerais servem para retratar a situação de ameaça desse patrimônio, na medida em que relacionam 1.127 e 273 espécies ameaçadas, respectivamente. No que diz respeito à fauna, mais de 50% das espécies ameaçadas ocorrem nos remanescentes da Mata Atlântica no estado. Essa situação é facilmente compreendida ao considerar que esse bioma, que cobria originalmente 41% da superfície estadual, hoje se restringe a apenas 4% dessa área (DRUMMOND et al., 2008).

O Cerrado, que já ocupou aproximadamente 57% da extensão territorial do estado, também se encontra em rápido processo de transformação, cedendo espaço para culturas/monoculturas agrícolas e florestais ou para a implantação de atividades agropecuárias. Estes efeitos são mais graves quando se sabe que 60% das espécies da flora ameaçadas de Minas Gerais têm sua distribuição geográfica no Cerrado. O bioma Caatinga, embora apresente expressividade menor no estado (2% do território), abriga 5% das espécies da flora e aproximadamente 4% das espécies da fauna ameaçadas de extinção de Minas Gerais (DRUMMOND et al., 2008).

Com base nessas premissas, a Secretaria de Estado de Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (SECTES) e a Fundação Biodiversitas desenvolveram, com financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), o Projeto “Diagnóstico do Conhecimento sobre a Biodiversidade no Estado de Minas Gerais: Conservação, Uso e

Biotecnologia - Subsídio ao Projeto Biota Minas”. Esse projeto foi responsável pela elaboração de um diagnóstico sobre o estado atual do conhecimento da biodiversidade do estado de Minas Gerais, que incluiu: o mapeamento da capacidade técnica do estado, a distribuição espacial das pesquisas no estado, a situação das coleções biológicas, a identificação das lacunas no conhecimento e respectivas pesquisas prioritárias, as demandas e as carências de financiamento das distintas áreas temáticas ligadas ao uso e à conservação da biodiversidade (DRUMMOND et al., 2009).

Neste contexto se insere o Projeto **Diversidade microbiana associada a frutos e solo do Cerrado Brasileiro**, cujos principais objetivos são o isolamento e a identificação de microrganismos naturalmente presentes em frutos e solos do Cerrado mineiro, especialmente nas regiões de Arcos, Passos e Luminárias, a fim de se propor métodos de conservação destas áreas, bem como avaliar o potencial biotecnológico desses microrganismos.

2.1.2 Frutos nativos do cerrado

O Cerrado destaca-se pela riqueza de sua biodiversidade, que pode ser interpretada pela vasta extensão territorial, pela posição geográfica privilegiada, pela heterogeneidade vegetal e por ser cortado pelas três maiores bacias hidrográficas da América do Sul. Os frutos das espécies nativas do Cerrado oferecem elevado valor nutricional, além de atrativos sensoriais, como, cor, sabor e aroma peculiares e intensos, ainda pouco explorados comercialmente (SILVA et al., 2008).

Apesar das limitações impostas ao crescimento e ao desenvolvimento das plantas pelo regime de chuvas e pelas características do solo, o Cerrado apresenta surpreendente variabilidade de espécies. Segundo Silva et al. (2008), algumas destas espécies podem constituir potenciais fontes de exploração

econômica, desde que a pesquisa e o desenvolvimento de tecnologias viabilizem seu aproveitamento.

A flora do cerrado tem diversas espécies frutíferas, com grande potencial de utilização agrícola, que são tradicionalmente utilizadas pela população local. Os frutos do cerrado, em geral, são consumidos *in natura* ou na forma de sucos, licores, sorvetes, geleias e doces diversos (ALMEIDA, 1998; SILVA et al., 2001). Apresentam sabores *sui generis* (único, peculiar) e elevados teores de açúcares, proteínas, sais minerais, ácidos graxos (SILVA et al., 2001), vitaminas do complexo B e carotenoides (AGOSTINI-COSTA; VIEIRA, 2000).

A biodiversidade microbiana presente em frutos depende de fatores ambientais da região onde se encontram como umidade, temperatura e população do solo, além das propriedades físico-químicas particulares de cada espécie de fruto (THOMAS; SOLY, 2009).

Algumas frutas nativas do cerrado, como o araticum, o buriti, a cagaita e o pequi, apresentam teores de vitaminas do complexo B, tais como as vitaminas B₁, B₂ e PP, equivalentes ou superiores aos encontrados em frutas como o abacate, a banana e a goiaba, tradicionalmente consideradas como boas fontes destas vitaminas. Entretanto, grande parte das frutas nativas em regiões típicas de clima tropical é, especialmente, rica em carotenoides. Os frutos de palmeiras, como o buriti, o tucumã, o dendê, a macaúba e a pupunha são fontes potenciais de carotenoides pró-vitamina A (SOARES et al., 2009).

Além das palmeiras, outras frutas nativas do cerrado brasileiro, de consumo regional bastante difundido, como o araticum e o pequi, também, são importantes fontes de carotenoides. Frutos de araticum ou marolo (*Annona crassiflora* Mart.), procedentes de populações nativas do sul de Minas Gerais, apresentaram teores de pró-vitamina A que variaram entre 70 e 105 retinol, equivalente por 100 g de polpa (AGOSTINI-COSTA; VIEIRA, 2000).

Existe, um mercado potencial e emergente para as frutas nativas do Cerrado, a ser mais bem explorado pelos agricultores, já que todo o aproveitamento desses frutos tem sido feito de forma extrativista e predatória. Neste cenário, o Cerrado tem sido agredido e depredado, colocando em risco várias espécies de plantas, entre elas algumas frutíferas nativas. Dentre as principais espécies frutíferas do cerrado que são de importância econômica e científica, destacam-se o marolo, o pequi, o ananás, a cagaita, o araçá, a gabirola, a lobeira, o umbu e o buriti (SOARES et al., 2009) (Figura 2).



Figura 2 Frutos típicos do Cerrado: A) ananás, B) cagaita, C) pequi, D) araçá, E) umbu, F) marolo, G) gabirola, H) lobeira e I) buriti

2.1.3 Microbiota presente no Cerrado

Apesar da grande ênfase dada à preservação dos biomas da Amazônia e da floresta Atlântica, o Cerrado brasileiro é o bioma mais ameaçado da América do Sul (QUIRINO et al., 2009). A falta de preservação dos biomas acarreta em perda de biodiversidade que se inicia com a diminuição da variabilidade genética e de interações ecológicas e termina com a extinção local de populações inteiras (FAORO, 2006).

O Brasil apresenta grande diversidade de frutos e muitos deles, utilizados para alimentação, são de grande importância econômica, vendidos nos mercados ou congelados para posterior utilização na produção de sucos e alimentos processados. Devido à falta de conhecimento dos agricultores sobre os alimentos processados, as perdas na produção de frutos ocorrem frequentemente, especialmente pela ação de microrganismos deterioradores (TRINDADE et al., 2002). As frutas são importantes micro-habitats para uma variedade de espécies de leveduras na natureza, devido à alta concentração de açúcares simples, baixo pH e intensa visitação por insetos vetores (LACHANCE et al., 2001).

Poucos estudos relatam a microbiota epifítica de frutos do cerrado. Devido à grande dispersão dos microrganismos há aqueles que naturalmente compõem a microbiota da superfície de frutos. A diversidade microbiana de frutos já foi relatada em acerola, pitanga, umbu e mangaba (TRINDADE et al., 2002) e pequi (FERREIRA; JUNQUEIRA, 2007) e frutos secos de cabacinha (AMARAL; COUTINHO; RIBEIRO, 2001).

A microbiota epifítica é formada por bactérias, leveduras e fungos filamentosos que podem apresentar atividade pectinolítica, celulolítica, proteolítica, micocinogênica, antimicrobiana e patogenicidade a humanos (TRINDADE et al., 2002; FERREIRA; JUNQUEIRA, 2007).

Os microrganismos do Cerrado podem ter importância biotecnológica e industrial. A planta e os frutos do pequi de algumas espécies apresentam atividade antimicótica atribuída a diversas propriedades medicinais, como a atividade antifúngica encontrada na folha, no óleo essencial da semente, além da ação dos óleos fixos da amêndoa e da semente de *C. brasiliense* Camb. sobre diversos microrganismos (*Cryptococcus neofarmans* var. *neofarmans* e *Cryptococcus neofarmans* var. *gatti*) (PASSOS et al., 2002).

A incidência de leveduras proteolíticas, pectinolíticas e micocinogênicas foi avaliada em frutos maduros e polpas congeladas de pitanga (*Eugenia uniflora* L.), mangaba (*Hancornia speciosa* Gom.), umbu (*Spondias tuberosa* Avr. Cam.) e acerola (*Malpighia glabra* L.), por Trindade et al. (2002). Neste trabalho, *Candida sorbosivorans*, *Pseudozyma antarctica*, *C. spandovensis* como *C. spandovensis*, *Kloeckera apis*, *C. parapsilosis*, *Rhodotorula graminis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Cryptococcus laurentii*, *Metchnikowia* sp. (isolados somente de frutos maduros de pitanga), *Issatchenkia occidentalis* e *C. krusei* (isolados somente de polpa congelada de mangaba) foram as espécies mais frequentes. As comunidades de leveduras de frutos maduros de pitanga exibiram a maior frequência de espécies, seguidas pela comunidade de acerola madura e polpa congelada de mangaba. Leveduras de polpas congeladas e frutos maduros de umbu tiveram o menor número de espécies.

Lucas et al. (2008) observaram o potencial antibacteriano e antifúngico de *Penicillium sclerotiorum* isolado de solo de Cerrado do Parque Nacional da Serra do Cipó (MG), devido à produção de pencolide, esclerotiorina e isocromofilona, sendo eficaz contra *Streptomyces pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*. A espécie *Streptomyces* sp. isolada de solos de Cerrado nativo foi produtora de xilanases, tendo como substrato resíduos agroindustriais apresentando potencial em aplicações biotecnológicas (NASCIMENTO et al., 2002).

A biomassa microbiana do solo é composta de bactérias, fungos, actinomicetos, protozoários e algas que atuam nos processos de decomposição natural, interagindo na dinâmica dos nutrientes e na regeneração da estabilidade dos agregados (PEREZ; RAMOS; MCMANUS, 2004), bem como na mineralização de compostos, especialmente o fósforo (CARNEIRO et al., 2004).

Entre as leveduras, podem-se citar como as mais comumente encontradas, as pertencentes aos gêneros *Kluyveromyces*, *Lipomyces*, *Schwanniomyces*, *Hansenula* e *Cryptococcus*, entre outras (SCHWAN; CAMPOS; DIAS, 2008). Entre as bactérias, podem-se citar *Rhizobium*, solubilizadoras de fósforo, *Bacillus* e actinomicetos e, entre os fungos filamentosos pertencentes à Zigomicota, Basidiomicota e Ascomicota (PEREZ; RAMOS; MCMANUS, 2004; CARVALHO, 2008).

Quirino et al. (2009), em estudo sobre a diversidade microbiana de solos do Cerrado nativo, avaliaram a diversidade molecular filogenética de bactérias em amostras de solos de cerrado nativo e de solos sob pastagens. Os autores observaram que a riqueza de espécies presentes em solos do cerrado era maior que em solos sob pastagens, uma vez que a redução da complexidade do ambiente interfere nas condições em que as espécies podem se adaptar. Foi observado que em solos nativos havia predominância de α *Proteobacteria* e em solos sob pastagens havia a predominância de espécies de Actinobactérias.

Fungos filamentosos também foram estudados por Carvalho (2008), que observou que *Gongronela butreli*, *Clonostachys rogersoniana* e *Penicillium jankewskii* foram isolados unicamente em solos nativos de cerrado, não sendo observados em solos sob cultivo de algodão e soja. Dentre todas as espécies identificadas neste trabalho, foi observado que as pertencentes ao gênero *Penicillium* caracterizavam e distinguem os solos nativos dos solos sob cultivo.

No entanto, com exceção dos trabalhos de microbiologia de solo para fins agrícolas, o conhecimento da biodiversidade bacteriana nos diferentes ecossistemas brasileiros ainda é bastante incipiente (DRUMMOND et al., 2009).

Apesar destes trabalhos com microrganismos em algumas regiões, ainda há carência de pesquisas relacionadas com a inventariação das espécies que ocorrem nos diferentes ecossistemas mineiros. A partir do conhecimento das espécies, seria possível realizar estudos ecológicos e biotecnológicos com estes microrganismos (DRUMMOND et al., 2009).

2.2 Enzimas

As enzimas têm sido utilizadas pelo homem há vários séculos. O uso do malte na preparação da cerveja, do esterco para amolecimento dos couros e do coalho na preparação do queijo são exemplos típicos da utilização de enzimas desde tempos antigos. O emprego das enzimas começou bem antes de se conhecer a sua natureza e propriedades (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008).

Atualmente, a tecnologia enzimática tem relevância internacional crescente, na academia e na indústria. Este interesse é motivado pela necessidade do desenvolvimento autossustentável, que pressupõe o uso de matérias-primas renováveis por processos que gerem produtos de qualidade por tecnologias limpas. O desenvolvimento da tecnologia enzimática reveste-se, no Brasil, de importância singular, devido à sua disponibilidade única de recursos renováveis em quantidade e variedade, e à necessidade vital da preservação ambiental e da qualidade da água. No entanto, o uso de enzimas industriais no País é ainda pequeno. Estima-se que o mercado mundial de biocatalisadores seja superior a 4 bilhões de dólares, enquanto o mercado externo brasileiro está em

torno de 200 milhões, prevalecendo as importações (AGÊNCIA DE NOTÍCIAS DA FUNDAÇÃO DO AMPARO À PESQUISA DE SÃO PAULO, 2010).

2.2.1 Celulases

As celulases são enzimas que constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais a glicose é o principal interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol (TOLAN, 2002; LYND et al., 2002).

Na natureza, a celulose, polissacarídeo mais abundante, é degradada pela hidrólise enzimática das celulases, um complexo celulolítico composto por endo- β -1,4-glicanases (EC 3.2.1.4), celobio-hidrolases (EC 3.2.1.91) e β -glicosidases (EC 3.2.1.21), que atuam em sinergismo (BHAT, 2000).

As endoglicanases (EG) partem aleatoriamente as cadeias de celulose e diminuem o comprimento dessas cadeias (endo-1,4- β -D-glicano-hidrolase). As celobio-hidrolases (CBH) atacam as extremidades do polímero com o grupo final redutor ou não redutor (exo-1,4- β -D-glicanocelobio-hidrolase) e produzem, primeiramente, celobiose. As CBHs, quando presentes na mistura, representam, muitas vezes, de 50% a 70% de todas as enzimas. A celobiase, que hidrolisa a celobiose a glicose (β -D-glicosideoglicano-hidrolase), remove a celobiose, que inibe as reações de degradação da celulose. Estes três componentes celulolíticos atuam em sinergismo (BON; FERRARA; CORVO, 2008) (Figura 3).

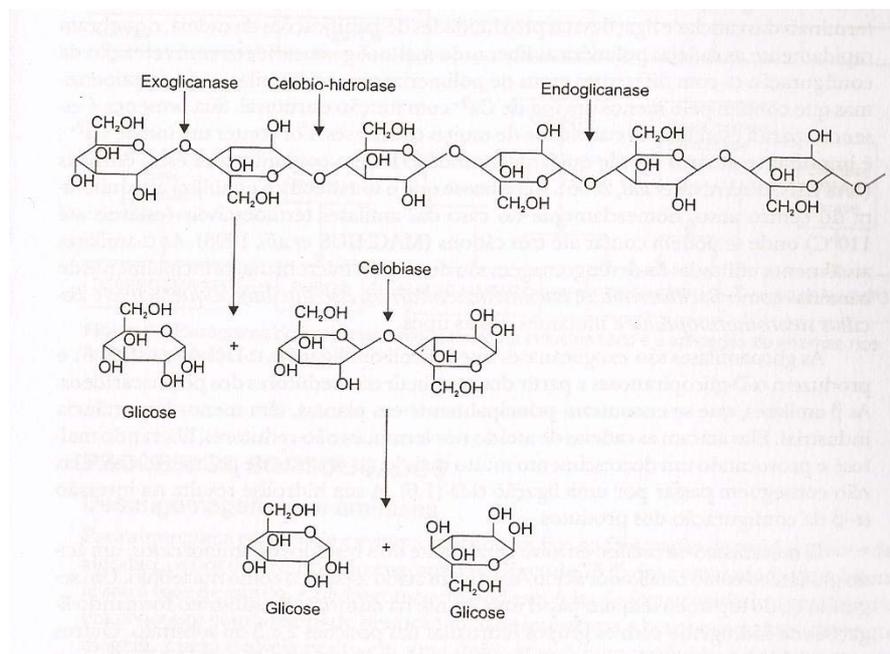


Figura 3 Atuação das enzimas celulases sobre a estrutura da celulose. (Fonte BON et al., 2008)

A produção de celulases em escala industrial começou em meados da década de 1980, visando à sua aplicação como um aditivo para ração animal, de forma a aumentar a digestibilidade de rações por ruminantes e monogástricos. Em seguida, essas enzimas começaram a ser utilizadas como um insumo para a indústria de alimentos, cujo objetivo era melhorar propriedades sensoriais de massas. Nesse setor, as celulases também começaram a ser utilizadas no processamento de bebidas, promovendo a clarificação de sucos de frutas e vinhos e a manutenção de uma reologia estável do produto final. Posteriormente, as enzimas celulolíticas começaram a serem utilizadas em larga escala nas seguintes indústrias têxtil, nos então implementados processos de biopolimento (desfibrilação de tecidos como algodão, linho, lã e viscose) e bioestonagem (amaciamento e desbotamento do brim); de polpa e papel, para a modificação controlada de propriedades mecânicas da polpa e liberação de tintas da

superfície das fibras a ser recicladas e em lavanderia, de forma a aumentar o brilho, a remoção de sujeiras e a maciez dos tecidos, além de amenizar o desgaste das peças, notado pela formação de fiapos e pelotas após sucessivas lavagens (BHAT, 2000). Também são empregadas em formulações de detergentes domésticos e industriais, extração de óleos, pigmentos, essências, alcaloides e amido; na produção de sucos; na preparação de alimentos infantis, produtos dermatológicos, produtos estimulantes de digestão e no tratamento de lixo orgânico (KUBICEK et al., 1993).

Além disso, as celulasas têm importante papel nos processos de utilização de resíduos agroindustriais. Ainda, é importante destacar o uso potencial das celulasas na hidrólise de material lignocelulósico para a produção de xarope de glicose e biocombustíveis (CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010).

Já na década de 1990, as celulasas, juntamente com as hemicelulasas, representavam mais de 20% do mercado mundial de enzimas (BHAT, 2000). No que tange ao cenário nacional, em 2008, apenas considerando-se importações e exportações brasileiras, as celulasas movimentaram um montante de USD 1,35 milhão (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2002).

2.2.2 Microrganismos produtores de celulasas

Os microrganismos sintetizam inúmeros compostos de importância industrial, como vitaminas, antibióticos, ácidos orgânicos e enzimas. Dentre esses metabólitos, as enzimas têm sido utilizadas em diversos processos industriais, principalmente no processamento de produtos alimentícios e no tratamento de resíduos (SCHMIDELL et al., 2001).

O primeiro passo no desenvolvimento de um processo industrial para a produção de uma enzima é o isolamento de cepas potenciais. O isolamento e a seleção de microrganismos produtores de celulasas são de imensa importância,

tendo em vista a demanda por novas enzimas e seu uso em aplicações biotecnológicas (KASANA et al., 2008).

Na natureza, existe grande variedade de microrganismos que produzem celulases, uma variedade de bactérias e fungos, aeróbios e anaeróbios, mesófilos e termófilos. No entanto, relativamente, poucos fungos e bactérias produzem altos níveis de celulase extracelular capaz de solubilizar a celulose cristalina extensivamente (BHAT, 2000).

As celulases, assim como as demais enzimas extracelulares de hidrólise, são induzidas quando há a necessidade de serem secretadas pelos microrganismos para que estes cresçam em celulose (LEE; KOO, 2001). Grande parte da produção industrial de celulases é realizada com o emprego de alguns fungos filamentosos, os quais são eficientes produtores de enzimas hidrolíticas. Em escala comercial, as celulases têm sido obtidas principalmente por meio das espécies de fungos *Aspergillus* e *Trichoderma*, devido à alta atividade sob temperaturas moderadas (NANDAKUMAR et al., 1994). Gomes (2007) observou atividade celulolítica em fungos filamentosos isolados de mangue dos gêneros *Aspergillus*, *Stilbella*, *Phoma*, *Cladosporium*, *Penicillium* e *Talaromyces*.

Alguns gêneros de bactérias citados na literatura, que apresentam atividade celulolítica, incluem *Bacillus*, *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Rumminococcus*, *Alteromonas*, *Acetivibrio* e *Bacteriodes* (ROBOSON; CHAMBLISS, 1989). Recentemente, uma variedade de gêneros tem sido relatada como produtores de celulase, incluindo *Bacillus* sp. (MAWADZA et al., 2000), *Bacillus amyloliquefaciens* (LEE et al., 2008), *Bacillus subtilis* (KIM et al., 2009), *Marinobacter* (SHANMUGHAPRIYA et al., 2010) e *Vibrio* (GAO et al., 2010).

Trivedi et al. (2010) descreveram o potencial da bactéria *Bacillus flexus* isolada da alga marinha *Ulva lactuca*, como produtora de celulase extracelular

com promissoras aplicações industriais. A capacidade de manter-se estável em pH alto de 9-12 e sob concentração de 15% de NaCl revelou a natureza alcali-halotolerante dessa celulase.

Herranen et al. (2010) isolaram 29 diferentes espécies de bactérias em farelos de aveia e centeio e estudaram a atividade de enzimas hidrolíticas. Dos isolados, 80% foram capazes de hidrolisar carboximetilcelulose e representantes dos gêneros *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Pedobacter* e *Sanguibacter* mostraram atividade enzimática para substratos diferentes. A espécie *Bacillus subtilis* isolada de aveia foi a que apresentou maior atividade celulolítica e *E.persicina* e todos os isolados de *Pantoea* apresentaram atividade hidrolítica apenas para celulose. Das espécies produtoras de celulase, nove também foram capazes de hidrolisar xilose.

2.3 Avaliação de comunidades microbianas por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)

Durante muito tempo, foi bastante limitada a capacidade de se realizar estudos sobre a diversidade de microrganismos, já que uma pequena porcentagem (1% a 5%, aproximadamente) podia ser cultivada e identificada pelos métodos convencionais. Uma nova perspectiva surgiu com o desenvolvimento de métodos moleculares e bioquímicos mais sensíveis, que têm permitido interpretar mais facilmente, e de forma mais sensível, a diversidade genética e funcional dos microrganismos em alimentos (ERCOLINI, 2004), bem como investigar a dinâmica das comunidades microbianas de amostras ambientais em relação à evolução de fatores ambientais (NICOL; GLOVER; PROSSER, 2003; SALLES; VAN VEEN; VAN ELSAS, 2004).

Estudos em comunidades microbianas originam questões sobre sua composição, estrutura e estabilidade e sobre a atividade e função de seus

membros individuais. Técnicas microbiológicas tradicionais e microscopia convencional são meios insuficientes para responder a essas questões (ROSADO; DUARTE, 2002). A maioria das bactérias presentes em amostras ambientais não pode ser detectada por meio de microscopia convencional, já que elas ficam aderidas a partículas de solo e sedimento. Experimentos fisiológicos têm sido utilizados com grande sucesso na caracterização de espécies isoladas. Entretanto, sabe-se, hoje, que apenas uma pequena fração de microrganismos presentes no ambiente pode ser isolada e caracterizada. Como alternativa às exaustivas estratégias de clonagem, podem-se utilizar experimentos de *fingerprinting* de comunidades microbianas por meio, por exemplo, do uso da técnica de DGGE de fragmentos amplificados por PCR (ROSADO et al., 1997).

A princípio, a técnica de DGGE foi introduzida em ecologia microbiana molecular para determinar a diversidade genética de misturas complexas de comunidades microbianas. Entretanto, atualmente, essa técnica pode ser usada com os mais variados propósitos, como, por exemplo, no estudo da estrutura de comunidades microbianas no ambiente, no monitoramento de mudanças ocorridas nessas comunidades em um intervalo de tempo após a introdução de um agente causador de estresse, como produtos químicos, pesticidas e poluentes, no estudo da diversidade de genes funcionais e na análise de comunidades de outros microrganismos (MUYZER; WAAL; UITTERLINDEN, 1993; AKKERMANS; VAN ELSAS; BRUIJN, 1995; FERRIS; MUYZER; WARD, 1997; ROSADO et al., 1998).

Nos últimos anos, esta técnica vem sendo empregada para conhecer os microrganismos em diferentes comunidades, bem como para monitorar a dinâmica da população em uma comunidade. A primeira aplicação de PCR-DGGE em microbiologia de alimentos foi realizada em 1999, quando Ampe et al. (1999) estudaram a distribuição de microrganismos em uma massa de milho mexicana fermentada. Desde então, a comunidade microbiana presente em

outros alimentos ou produtos tem sido analisada por DGGE, incluindo queijos (RANDAZZO et al., 2002; ERCOLINI; HILL; DODD, 2003), kefir (MAGALHÃES et al., 2010; MIGUEL et al., 2010), vinho (LOPEZ et al., 2003), processamento de café via-seca (VILELA et al., 2010), carne (ERCOLINI et al., 2006) e fermentação de cacau (NIELSEN et al., 2007).

Amostras ambientais também têm sido estudadas amplamente pelo uso de técnicas moleculares, como o DGGE, entre elas o solo (EDENBORN; SEXSTONE, 2007), tubérculos de batata (WEINERT et al., 2010), frutos (EL SHEIKHA et al., 2012; PEREIRA et al., 2011) e plantas (ANDREOTE et al., 2009; MONTEIRO et al., 2009).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de coleta e amostragem dos frutos

Os frutos foram coletados em áreas conservadas do Cerrado Mineiro, nos municípios de Arcos, Luminárias e Passos, no mês de janeiro de 2010 (Figura 4), segundo as seguintes coordenadas geográficas:

- a) **Arcos:** localizada na zona do Alto São Francisco, região centro-oeste de Minas Gerais ($20^{\circ}17'29''$ S $45^{\circ}32'23''$ W);
- b) **Luminárias:** situa-se no Sul de Minas e tem a posição geográfica determinada pelas coordenadas $21^{\circ}31'26''$ S e $44^{\circ}54'11''$ W;
- c) **Passos:** encontra-se na região sul do estado de Minas Gerais, nas coordenadas $20^{\circ}43'08''$ S de latitude e $46^{\circ}36'35''$ W de longitude.

Foram coletadas, no total, 33 diferentes espécies de frutos provenientes das três regiões descritas acima, conforme descrito na Tabela 1. Os frutos maduros foram coletados manualmente e armazenados em sacos plásticos estéreis e, posteriormente, transportados sob refrigeração (10° C), até o Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG. Os frutos foram selecionados de acordo com o tamanho e a ausência de injúrias mecânicas e fisiológicas para conservação em freezer, à temperatura de -20° C.

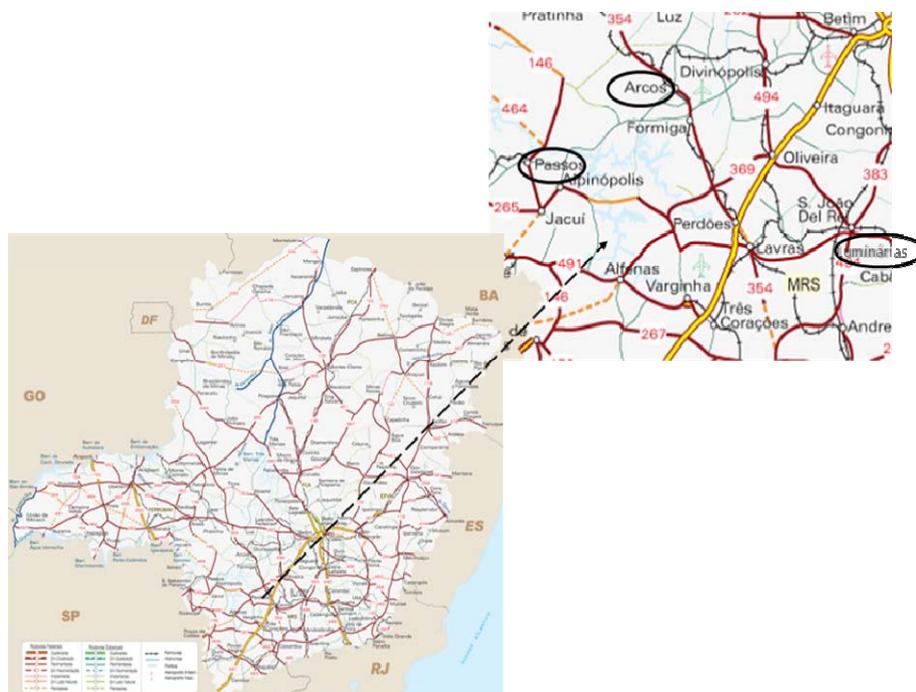


Figura 4 Mapa do estado de Minas Gerais com a localização aproximada dos municípios de Passos, Arcos e Luminárias onde localizam-se os pontos de coletas dos frutos utilizados no isolamento bacteriano

Tabela 1 Espécies de frutíferas do Cerrado coletadas nas regiões de Passos, Arcos e Luminárias (MG), utilizadas para o isolamento de bactérias epifíticas

Passos	Nome científico	Nome popular	Nº de frutos
1	<i>Psychotria</i> sp.	Erva-de-rato	45
2	<i>Erythroxylum</i> sp.	Pimentinha-do-mato	52
3	<i>Erythroxylum suberosum</i>	Cabelo-de-negro	40
4	<i>Rudgea jasminoides</i>	Cafezinho-do-mato	48
5	<i>Miconia pepericarpa</i>	Pixirica	20
6	<i>Erythroxylum daphnites</i>	Muxiba	12
7	<i>Byrsonima</i> sp.	Murici	7
8	<i>Psidium catleyanu</i>	Araçá	5
9	<i>Schinus polygama</i>	Aroeirinha	35
10	<i>Picramnia parvifolia</i>	Pau-amargo	27
11	<i>Psittacanthus robustus</i>	Erva-de-passarinho	30
12	<i>Miconia cinerascens</i>	Jacatirão	14
13	<i>Erythroxylum campestre</i>	Fruta-de-pomba	12
14	<i>Psittacanthus acinarius</i>	Erva-de-passarinho	30
15	<i>Davilla rugosa</i>	Bejuco-colorado	7
Arcos			
16	<i>Hymenaea courbaril</i>	Jatobá	5
17	<i>Solanum aculeatissimum</i>	Arrebenta-boi	8
18	<i>Ananás comosus</i>	Ananás	7
19	<i>Annona crassiflora</i>	Marolo	10
20	<i>Psidium guajava</i>	Goiaba	7
21	<i>Caryocar brasiliense</i>	Pequi	15
22	<i>Annona geraensis</i>	Marolinho	1
23	<i>Lantana lilacina</i>	Midigrilo	1
Luminárias			
24	<i>Kielmeyera speciosa</i>	Pau-santo	8
25	<i>Erythroxylum daphnites</i>	Muxiba	12
26	<i>Byrsonima crassifolia</i>	Murici-do-cerrado	7
27	<i>Miconia pseudonervosa</i>	Pixirica	20
28	<i>Leandra lacunosa</i>	Erva-de-jabuti	10
29	<i>Vitex montevicensis</i>	Azeitona-do-mato	7
30	<i>Myrsine coriacea</i>	Capororoça	30
31	<i>Miconia chamissois</i>	Pixirica	20
32	<i>Miconia cinamomifolia</i>	Jacatirão	12
33	<i>Miconia pepericarpa</i>	Pixirica	20

3.2 Isolamento dos microrganismos

Os frutos foram selecionados aleatoriamente, para a obtenção de uma amostra composta e, então, foram colocados inteiros, assepticamente, em erlenmeyers contendo água peptonada estéril (0,1% de peptona). Em seguida, foram homogeneizados, a 28 °C, por 30 minutos, sob agitação de 140 rpm, em shaker. Apenas para o fruto marolo foi necessária a raspagem da casca para adicioná-lo no erlemeyer. A partir do extrato obtido, foi retirado 1 mL e transferido para um tubo contendo 9 mL de água peptonada (0,1%) e realizadas diluições decimais seriadas (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}).

Para a determinação da contagem total de bactérias, foi utilizada uma alíquota de 100 µL de cada diluição em triplicata que, em seguida, foi espalhada com alça de Drigalsky, utilizando-se a técnica de plaqueamento por superfície. Apenas para o meio man rogosa sharpe (MRS) utilizou-se a técnica de espalhamento em profundidade (*pour plate*).

A contagem dos microrganismos foi realizada em quatro meios de cultura diferentes: ágar nutriente (AN) (0,3 g/L extrato de carne, 0,5 g/L peptona, 1,5 g/L ágar) e ágar nutriente acrescido de nistatina (400 mg/1000 mL) para o isolamento de bactérias aeróbias mesofílicas, eosina azul de metileno (EMB) (1,0 g/L peptona de carne, 0,5 g/L lactose, 0,2 g/L fosfato dipotássio, 0,04 g/L eosina y, 0,0065 g/L azul de metileno, 0,5 g/L sacarose, 1,5 g/L ágar) para enterobactérias e o meio MRS (1,0 g/L peptona, 1,0 g/L extrato de carne, 0,5 g/L extrato de levedura, 2,0 g/L glicose, 0,1 g/L tween 80, 0,2 g/L fosfato de potássio dibásico, 0,5 g/L acetato de sódio, 0,2 g/L citrato de amônio, 0,005 g/L sulfato de magnésio-7H₂O, 0,005 g/L sulfato de manganês-7 H₂O, 1,5 g/L ágar), foi utilizado para contagem de bactérias lácticas.

As placas foram incubadas em BOD, a 30 °C, por até 48 horas, para o crescimento bacteriano.

Após o período de incubação, as colônias crescidas nas placas foram classificadas de acordo com as características e as estruturas morfológicas, buscando caracterizar os diferentes morfotipos crescidos nos meios de cultivo. A análise da morfologia das colônias incluiu: tamanho, cor, bordo, textura, aparência, brilho, formato e elevação. Foi realizada contagem total dos morfotipos encontrados, identificando o tipo de meio cultivado, a amostra, a diluição e a triplicata. A partir da contagem total, foram escolhidas, para morfologia, as placas que tivessem entre 30 e 300 colônias. O número de isolados que foram selecionados para identificação foi determinado pelo cálculo da raiz quadrada do número total de isolados contados conforme mencionado no *Bacteriological Manual for Foods* (ANDREWS; HAMMACK, 1972).

Os isolados bacterianos foram preservados em criotubos contendo o meio YEPG acrescido de glicerol, para uma concentração final de 20%, com exceção dos isolados do meio MRS, que foram armazenados em criotubos contendo MRS. Todos os isolados foram depositados na Coleção de Culturas de Microrganismos do Departamento de Biologia da UFLA.

3.3 Caracterização morfológica, bioquímica e agrupamento

As culturas puras dos distintos morfotipos coloniais foram caracterizadas mediante as seguintes provas: coloração de Gram e morfologia microscópica, catalase, esporulação e motilidade, de acordo com as recomendações propostas em *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (BRENNER; KRIEG; STALEY, 2005). Os resultados destes testes junto à caracterização morfológica dos diversos isolados foram submetidos à análise de grupos no programa BioDiversity Pro ver.2 (MCALEECE et al., 1997). As matrizes de similaridade foram geradas utilizando-se a análise de grupos de

Bray-Curtis e os dendrogramas criados usando o vínculo simples. Cepas representativas de cada grupo foram submetidas à caracterização molecular.

3.4 Extração de DNA dos isolados obtidos dos frutos

O DNA genômico total foi extraído segundo Pereira et al. (2011). Colônias isoladas de culturas puras com 24 horas de incubação foram suspendidas em 25 µL de água MiliQ e submetidas a aquecimento, a 95 °C, durante 15 minutos, sem processamento adicional. Esta metodologia antecedeu a técnica de amplificação do DNA por PCR analisando o gene 16S rRNA.

3.6 Amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA

O DNA de cada isolado foi amplificado e sequenciado utilizando-se os *primers* 27f (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') e 1512r (5'ACGGCTACCTTGTTACGACT 3') da região 16S do rDNA (DEVEREUX et al., 2004). As condições para a amplificação serão as mesmas descritas por Miguel et al. (2010). A presença de produtos da PCR foi confirmada mediante eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1x a 70 V/30 min, corados com SYBR Green (Invitrogen, Foster City, CA, USA) e visualizados em um transiluminador. O sequenciamento dos amplicons foi realizado na Macrogen (Macrogen, Inc., Seúl, Coreia) e as sequências foram comparadas com a base de dados do GenBank, utilizando-se o algoritmo BLAST (BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOLL, 2012).

3.7 Extração de DNA e análises por PCR-DGGE da comunidade bacteriana presente nas amostras de frutos

3.7.1 Extração de DNA

Para extração do DNA total, foi utilizada a suspensão microbiana, a mesma dos plaqueamentos. Para a obtenção do pellet, as amostras foram centrifugadas 14.000 rpm, por 3 minutos. A purificação do DNA total foi realizada utilizando-se o kit 'DNA Purification from Tissues' (Qiaamp DNA Mini Kit (Qiagen, Chatsworth, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante.

3.7.2 Amplificação por reação da polimerase em cadeia (PCR) para bactérias

As amostras, após serem purificadas, foram submetidas à reação de polimerase em cadeia e verificadas em gel de agarose 1%. As reações para amplificação do DNA da comunidade bacteriana utilizaram *primers* universais rRNA 16S, seguindo o protocolo estabelecido por Miguel et al. (2010). A reação de PCR teve volume final de 25 µl: 9,0 µl de água MilliQ estéril; 12,0 µl de Mixtaq 2x (Tap Taq™ Master Mix Kit – Qiagen, São Paulo, Brasil); 1 µl de cada *primer* rRNA 16S 338f GC (5'- CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GG ACGGGGGACTCCTACGGGAGG CAGCAG-3') e 518r (5' ATTACCGCGGCTGCTGG-3') e 2 µl de DNA.

O termociclador foi programado da seguinte maneira: desnaturação inicial, a 95 °C, por 5 minutos; 35 etapas de desnaturação, a 95 °C, por 1 minuto; anelamento dos *primers*, a 55 °C, por 1 minuto e extensão da fita de DNA, a 72 °C, por 1 minuto; extensão final, a 72 °C, por 7 minutos e 4 °C como temperatura de armazenamento.

3.7.3 Eletroforese de gel com gradiente desnaturante (DGGE)

Os produtos do PCR foram analisados por DGGE, utilizando-se um sistema vertical DCode (Bio-Rad), seguindo os procedimentos já descritos por Muyzer, Waal e Uitterlinden (1993). Os produtos de PCR foram aplicados diretamente em gel de poliacrilamida 8% (m/v) em tampão 0,5X TAE com gradiente de desnaturação variando de 20% a 50% (100% correspondeu a 7 M de ureia e 40% (v/v) de formamida). A eletroforese foi realizada em uma voltagem constante de 120 V, por 4 horas, a 60 °C. Após a eletroforese, os géis foram corados em solução de SYBR-Green I (Invitrogen, Foster City, CA, USA) (1:10.000 (v/v)). A imagem foi capturada, visualizada e fotografada em transluminador, utilizando-se luz ultravioleta.

3.7.3.1 Identificação e análise das bandas de DGGE

As bandas selecionadas foram excisadas dos géis de DGGE com uma lâmina estéril e o DNA foi eluído em água miliQ estéril. O DNA das bactérias foi amplificado utilizando-se o TapTaqTM Master Mix Kit (Qiagen, São Paulo, Brasil) com os *primers* 338f e 518r sem o grampo GC. Os produtos de PCR não purificados foram sequenciados pela Macrogen (Macrogen, Inc., Seúl, Coreia) e as sequências obtidas alinhadas com o banco de dados do *GenBank*, utilizando-se o programa BLAST (*National Centre for Biotechnology Information*, Maryland, USA).

3.8 Avaliação enzimática qualitativa

Os isolados foram submetidos à análise qualitativa segundo metodologia proposta por Kasana et al. (2008) para a seleção de bactérias produtoras de celulase.

A determinação da produção e da atividade da enzima celulase foi realizada em meio ágar carboximetilcelulose (CMC) contendo (em % m/v) 0,2 NaNO₃, 0,1 K₂HPO₄, 0,05 MgSO₄, 0,05 KCl, 0,2 carboximetilcelulose (CMC), 0,02 peptona e 1,7 ágar. Para tal, foram inoculados 5 µL de cada isolado pela técnica de plaqueamento por microgota. As placas foram incubadas por 48 horas, a 28 °C e a revelação foi realizada adicionando-se solução aquosa de iodo (KI 0,67%, iodo 0,33% m/v) na superfície, deixando-a em contato por 3 a 5 minutos. A hidrólise enzimática foi evidenciada pela formação de um halo de coloração clara ao redor da colônia.

Os resultados da atividade enzimática qualitativa foram classificados como negativo (-), fraco (W), positivo (+) e forte (++)

3.9 Avaliação enzimática quantitativa

A análise quantitativa foi realizada por meio de um delineamento experimental para avaliar a influência de três fatores sobre a atividade da enzima e estabelecer a condição ideal para a melhor produção enzimática. Foram escolhidos dois isolados (UFLA BCEF 1130 e UFLA BCEF 1615) que apresentaram atividade qualitativa forte.

3.9.1 Delineamento experimental

Para a determinação da melhor atividade celulolítica e a otimização do processo, foi definido um delineamento central composto rotacional DCCR com fatorial completo 2^3 , incluindo 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 17 ensaios. Para avaliar a atividade enzimática, foram utilizadas 3 variáveis independentes, testadas em 5 níveis diferentes, como mostrado na Tabela 2.

Tabela 2 Valores utilizados no DCCR para as três variáveis testadas para avaliação da atividade celulolítica dos isolados bacterianos

Variáveis	Unidade	Código	Níveis				
			-1,68	-1	0	+1	+1,68
pH		X ₁	4,82	5,5	6,5	7,5	8,18
Inóculo	10 ⁷ células/mL	X ₂	2,32	3,0	4,0	5,0	5,68
(NH₄)₂SO₄	g/L	X ₃	0,32	1,0	2,0	3,0	3,68

Na Tabela 3 estão apresentados os 17 ensaios para as três variáveis. Dada pela equação polinomial de 2ª Ordem:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ij} x_i x_j + \sum \beta_{ii} x_i^2 \quad (1)$$

em que Y é a variável resposta; β_0 , a constante; β_i , o coeficiente do efeito linear; β_{ii} , o coeficiente para o efeito quadrático; β_{ij} , o coeficiente para o efeito de interação e x_i e x_j são os níveis codificados das variáveis X_i e X_j . A equação quadrática acima foi utilizada para plotar superfícies para as variáveis.

As variáveis testadas foram codificadas de acordo com a seguinte equação:

$$x_i = (X_i - X_0)/\Delta X_i \quad (2)$$

Na qual x_i é o valor codificado e X_i é o valor real para variável independente, X_0 é o valor real para o ponto central (valor médio dos níveis) e ΔX_i é a diferença entre os níveis sucessivos das variáveis.

Tabela 3 Delineamento experimental composto central rotacional para as três variáveis independentes pH, inóculo e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Ensaio	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	-1,68	0	0
10	+1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	+1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	+1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

X_1 = pH; X_2 = volume de inóculo e X_3 = $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

3.9.2 Microrganismos e condições de cultivo

Os isolados foram crescidos em caldo nutriente (0,3 g/L extrato de carne, 0,5 g/L peptona) e incubados em *shaker*, sob agitação de 100 rpm, a 28 °C. Estas condições foram mantidas até que a concentração celular atingisse um valor de 0,8 de absorbância, medido por espectrofotometria, a 600 nm. Após o tempo de incubação, foi realizado o plaqueamento em triplicata das diluições de

10^{-6} a 10^{-9} para contagem das células UFC/mL. Este valor de 0,8 correspondeu a 10^7 células/mL e, em seguida, foi realizada a inoculação nos ensaios.

3.9.3 Condições da fermentação

Os isolados foram cultivados em meios de cultura específicos contendo carboximetilcelulose (CMC), celulose cristalina e de β -glicosidase, sendo retiradas amostras (3 mL) de cada ensaio, nos tempos de incubação 0, 3 e 5 dias e armazenadas em freezer, a -20 °C, para posterior quantificação enzimática.

Para atividade de endo β -1,4 glucanase, os isolados foram cultivados em erlenmeyers de 250 mL contendo 60 mL de meio CMC líquido (NaNO_3 0,2%, K_2HPO_4 0,1%, MgSO_4 0,05%, KCl 0,05%, CMC 0,2%, peptona 0,02%, m/v), tendo como indutor CMC. Para atividade de exo β -1,4 glucanase foi utilizado o mesmo meio, substituindo-se apenas a CMC pelo indutor Avicel^R e a celobiose para β -glicosidase, nas mesmas condições descritas anteriormente. Os frascos foram mantidos sob agitação de 100 rpm, a 28 °C, durante 5 dias.

A partir do extrato bruto enzimático, fez-se a centrifugação, a 6.000 rpm, por 10 minutos, à temperatura de 10 °C. Os sobrenadantes foram armazenados em *freezer*, para posterior determinação da atividade enzimática.

3.9.4 Determinação da atividade de exo β -1,4 glucanase (EC 3.2.1.91)

A atividade de exoglucanase foi mensurada por espectrofotometria em leitor de microplacas (Thermo Scientific, Multiskan[®] FC), utilizando-se hidrazida do ácido β -hidroxibenzoico 1% m/v (PAHBAH), para a dosagem de glicose liberada pela ação da enzima (LEVER, 1972). Para a reação, foram utilizados 50 μL da fonte enzimática e 450 μL de Avicel^R 1% (m/v), em tampão acetato de sódio 0,05 M (pH 5,0), como substrato. Após 30 minutos de

incubação, a 50 °C, a reação foi paralisada com a adição de 1,5 mL PAHBAH 1%. Em seguida, a mistura foi aquecida a 100 °C, por 5 minutos e, logo depois, resfriada em gelo.

A leitura da absorbância foi realizada a 410 nm contra branco (1,5 mL de PAHBAH + 0,5 mL de tampão acetato de sódio 0,05 M). Para cada amostra foram realizadas três repetições. As leituras das amostras foram subtraídas do controle (mistura sem incubação prévia) e os resultados foram correlacionados com a curva analítica preparada utilizando glicose como padrão, na concentração de 0 a 50 µg/mL para o cálculo da glicose liberada pela enzima (Gráfico 1). A atividade enzimática (U/mL) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µg de glicose por minuto. A atividade específica (U/mg) foi obtida pela razão entre U/mL e a quantidade de proteínas (em mg/mL) determinada no extrato enzimático (BRADFORD, 1976).

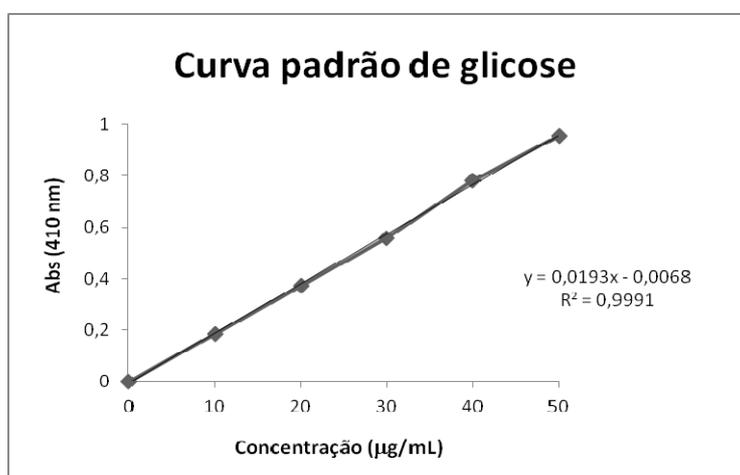


Gráfico 1 Gráfico da curva analítica de glicose – absorbância x concentração de glicose

3.9.5 Determinação da atividade de endo β -1,4 glucanase (EC 3.2.1.4)

Para a reação, foram utilizados 50 μ L da fonte enzimática e 450 μ L de CMC 1% (m/v) em tampão acetato de sódio 0,05 M (pH 5,0). A mistura foi incubada, a 50 °C, por 30 minutos e a reação foi paralisada com a adição de 1,5 mL de PAHBAH 1% (m/v). Em seguida, a mistura foi aquecida a 100 °C, por 5 minutos e, logo após, resfriada em gelo.

A leitura da absorbância foi realizada a 410 nm contra branco (1,5 mL de PAHBAH + 0,5 mL de tampão acetato de sódio 0,05M). As leituras das amostras foram subtraídas do controle (mistura sem incubação prévia) e os resultados foram correlacionados com a curva analítica preparada utilizando glicose como padrão, na concentração de 0 a 50 μ g/mL para o cálculo da glicose liberada pela enzima, representando a produção em atividade específica (Gráfico 1). A atividade enzimática (U/mL) de endo β -1,4 glucanase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μ g de glicose por minuto. A atividade específica (U/mg) foi obtida pela razão entre U/mL e a quantidade de proteínas (em mg/mL) determinada no extrato enzimático (BRADFORD, 1976).

3.9.6 Determinação da atividade de β -glicosidase (EC 3.2.1.21)

A atividade de β -glicosidase foi determinada pela reação que consistiu de 300 μ L de p-nitrofenil glucopiranosídeo como substrato e 200 μ L da fonte enzimática. A mistura da reação foi incubada, a 50 °C, por 30 minutos, sendo paralisada pela adição de 1 mL de Na₂CO₃ 1M. Os resultados da atividade foram obtidos subtraindo-se os valores das absorbâncias das amostras e controle obtidas em leitura a 405 nm. Os resultados foram correlacionados com a curva analítica preparada utilizando-se p-nitrofenol como padrão na concentração de 0 a 25 μ g/mL para o cálculo da glicose liberada pela enzima, representando a

produção em atividade específica (Gráfico 2). A atividade enzimática (U/mL) de β -glicosidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μg de p -nitrofenol por minuto. A atividade específica (U/mg) foi obtida pela razão entre U/mL e a quantidade de proteínas (em mg/mL) determinada (BRADFORD, 1976) no extrato enzimático.

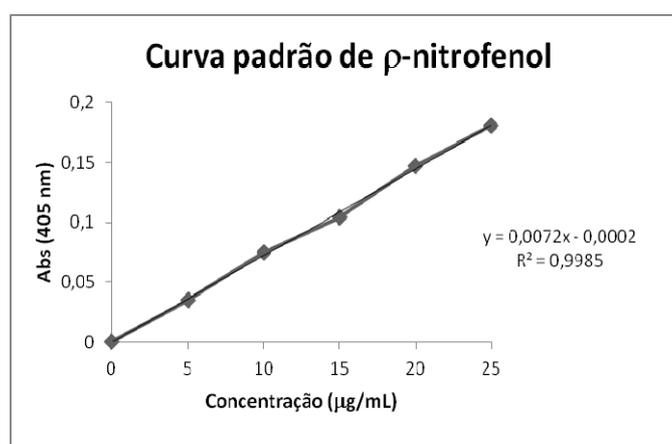


Gráfico 2 Gráfico da curva analítica de p -nitrofenol – absorbância x concentração de p -nitrofenol

3.9.7 Dosagem de proteínas totais

A dosagem de proteínas foi obtida segundo o método de Bradford (1976), que consistiu em reação com 200 μL de amostra e 800 μL de reagente de Bradford concentrado, adicionado sob agitação. Após 5 minutos, procedeu-se à leitura por espectrofotometria em leitor de microplacas (Thermo Scientific, Multiskan[®] FC), a 595 nm. O aparelho foi calibrado com 200 μL de água e 800 μL do reagente concentrado de Bradford. A concentração de proteínas foi expressa mg de proteína/mL e obtida pela plotagem em curva analítica de albumina de soro bovino (BSA) (Gráfico 3).

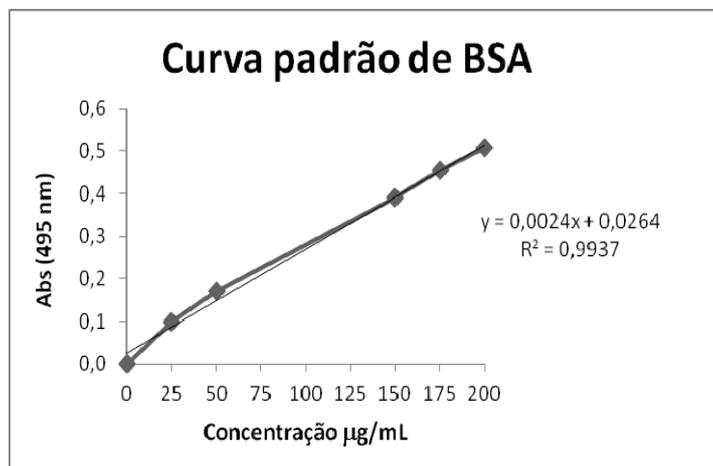


Gráfico 3 Gráfico da curva analítica de albumina de soro bovino (BSA) – absorvância x concentração de reagente de Bradford

3.10 Análise estatística

A matriz do delineamento experimental, a análise de dados e a otimização foram realizadas pelo programa Design-Expert, Version 8.0 (STATEASE Inc., Minneapolis, Minn., U.S.A).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Enumeração e isolamento dos grupos bacterianos

A partir das 33 amostras de frutos coletadas nas regiões de Passos, Arcos e Luminárias, foram obtidos, no total, 1560 isolados, agrupados em 717 morfotipos diferentes. Neste estudo, nos meios AN e EMB foram selecionados os maiores números de isolados e morfotipos diferentes.

Em alguns trabalhos envolvendo o isolamento bacteriano de frutos de morango (KRIMM et al. 2005; DIAS et al., 2009; PEREIRA et al., 2011) foram utilizados os meios AN e EMB para isolamento de espécies de *Enterobacteria* e *Bacillus* sp. Além destes, Pereira et al. (2011), adicionalmente, utilizaram o meio MRS para isolamento de bactérias láticas, desde que um grande número de espécies de *Lactobacillus* sp. com propriedades antifúngicas tem sido isolado de materiais vegetais *in vitro* (MAGNUSSON et al., 2003).

A população média de bactérias aeróbicas mesofílicas para os meios AN e AN⁺, em todos os frutos das regiões de Passos, foi de 2,95 e 2,94 log UFC.g⁻¹, respectivamente. Em Arcos, a população média foi de, aproximadamente, 2,91 e 2,93 log UFC.g⁻¹ e o mesmo resultado pôde ser observado para os frutos de Luminárias, cujas médias das populações de bactérias aeróbicas mesofílicas, para AN e AN⁺, foi de 2,84 e 2,90 log UFC.g⁻¹, respectivamente (Tabelas 4, 5 e 6).

Para os frutos de Passos, pode-se observar (Tabela 4) que os erva-de-rato (1), murici (7), erva-de-passarinho (11) e bejuco-colorado (15) tiveram as maiores médias populacionais, com valores acima de 3,0 log UFC.g⁻¹.

Os frutos erva-de-passarinho (14), fruta-de-pomba (13) e bejuco-colorado (15), de Passos, apresentaram população média de 2,96; 2,88 e 0,39 log UFC.g⁻¹, respectivamente, de bactérias láticas (BAL). Em Arcos foi detectada

população média de BAL de 2,62 log UFC.g⁻¹ no fruto jatobá (16) e 2,39 log UFC.g⁻¹ no marolo (19) (Tabela 5).

Tabela 4 Contagem média da população bacteriana crescida nos quatro meios utilizados para o isolamento, a partir das 15 amostras de frutos coletados em Passos, MG

Meio de cultura	Fruto														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
AN	3,25	2,66	2,89	2,71	2,81	3,24	3,32	2,87	2,59	2,73	3,14	3	2,72	2,87	3,42
AN+	3,35	2,81	2,89	2,84	2,66	2,73	3,06	2,62	2,57	2,86	3,27	2,91	2,7	3,49	3,41
EMB	3,48	2,52	0,95	2,62	2,28	2,46	2,84	1,47	0	1,42	2,84	1,54	2,19	2,78	2,96
MRS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,88	2,96	0,39

Meios AN (Ágar Nutriente), AN⁺(Ágar Nutriente acrescido com nistatina), EMB (Eosina Azul de Metileno) e MRS (Man Rogosa Sharpe). Frutos: 1. Erva-de-rato, 2. Pimentinha-do-mato, 3. Cabelo-de-negro, 4. Cafezinho-do-mato, 5. Pixirica, 6. Muxiba, 7. Murici, 8. Araça 9. Aroeirinha, 10. Pau-amargo, 11. Erva-de-passarinho, 12. Jacatirão, 13. Fruta-de-pomba, 14. Erva-de-passarinho e 15. Bejuco-colorado

Para os frutos provenientes do município de Arcos, observou-se que, no meio AN, o fruto jatobá (16) apresentou a maior média populacional, 3,40 log UFC.g⁻¹. Já no meio AN⁺, os frutos jatobá (16), marolo (19) e marolinho (22) apresentaram as melhores médias, de 3,33; 3,07; 3,33 log UFC.g⁻¹, respectivamente. A maior contagem no meio EMB pode ser observada a partir do fruto arrebenta-boi (17), com 3,45 log UFC.g⁻¹. Porém, no meio MRS, o fruto jatobá (16) apresentou maior média populacional, de 2,62 log UFC.g⁻¹ (Tabela 5).

Na Tabela 5 foi possível observar que no fruto 22 (marolinho) não houve diferença significativa para a contagem de colônias nos meios AN e AN⁺. Além disso, foi um dos frutos que apresentaram as maiores contagens populacionais médias. O fruto arrebenta-boi (17) ao contrário dos demais frutos para o meio EMB, apresentou a maior população média, de 3,45 log UFC.g⁻¹. Somente os frutos jatobá (16) e marolo (19) tiveram contagem no meio MRS, 2,62 e 3,39 log UFC.g⁻¹, respectivamente.

Tabela 5 Contagem média da população bacteriana crescida nos quatro meios utilizados para o isolamento, a partir das oito amostras de frutos coletados em Arcos, MG

Meio de cultura	Fruto							
	1	2	3	4	5	6	7	8
AN	3,40	2,45	2,7	3,09	2,66	2,67	3,34	3,13
AN ⁺	3,33	2,56	2,57	3,07	2,7	2,61	3,33	3,1
EMB	2,96	3,45	0	2,55	0	0	0	0
MRS	2,62	0	0	3,39	0	0	0	0

Meios NA (ágar nutriente), AN⁺ (ágar nutriente acrescido com nistatina), EMB (eosina azul de metileno) e MRS (man rogosa sharpe)

Frutos: 16. Jatobá, 17. Arrebenta-boi, 18. Ananás, 19. Marolo, 20. Goiaba, 21. Pequi, 22. Marolinho e 23. Midigrilo

Em relação aos frutos provenientes da região de Luminárias, não foram detectado crescimento representativo de bactérias do ácido láctico (BAL); a população encontrada foi inferior a 10 logUFC.g⁻¹ (Tabela 6). No entanto, nos

meios AN e AN⁺, observou-se que os frutos muxiba (25), murici (26), azeitonado-mato (29) e pixirica (33) tiveram as maiores contagens.

Di Cagno et al. (2010) relataram, em estudo sobre a estrutura taxonômica da microbiota de leveduras e BAL associadas ao fruto abacaxi, que a população de BAL isolada foi de $5,75 \pm 0,91 \log \text{UFC.g}^{-1}$. Já estudando a população bacteriana presente em fruto de morango, Pereira et al. (2011) tiveram as contagens da população em AN de $4,89 \log \text{UFC.g}^{-1}$; para MRS foi $3,05 \log \text{UFC.g}^{-1}$ e o meio EMB, $3,07 \log \text{UFC.g}^{-1}$. Estes valores foram superiores às contagens dos grupos bacterianos nos frutos do Cerrado.

Tabela 6 Contagem média da população bacteriana crescida nos quatro meios utilizados para o isolamento, a partir das dez amostras de frutos coletados em Luminárias, MG

Meio de cultura	Fruto									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
AN	1,51	3,26	3,08	2,58	2,6	3,47	2,76	2,85	2,35	3,15
AN+	2,11	3,28	3,13	1,56	2,74	3,46	2,7	2,74	2,4	3,43
EMB	0	3,16	0,1	0	0	2,22	1,39	0	1,35	0,39
MRS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Meios AN (ágar nutriente), AN⁺ (ágar nutriente acrescido com nistatina), EMB (eosina azul de metileno) e MRS (man rogosa sharpe)

Frutos: 24. Pau-santo, 25. Muxiba, 26. Murici-do-cerrado, 27. Pixirica, 28. Erva-de-jabutí 29. Azeitona-do-mato, 30. Capororoca, 31. Pixirica, 32. Jacatirão e 33. Pixirica

Além disso, observou-se que somente nos meios AN e AN⁺ foram isoladas bactérias provenientes de todas as amostras, cujos valores de contagem também foram superiores aos observados para os demais meios, com exceção do fruto 2 (pimentinha-do-mato), coletado em Passos. Esses resultados podem ser explicados pelo fato de o meio AN possuir composição química simples e não ser seletivo, sendo, assim, muito utilizado no cultivo e na enumeração de bactérias menos exigentes nutricionalmente, como as bactérias aeróbicas mesofílicas (MADIGAN et al., 2010).

Seow et al. (2012), em Singapura, avaliaram a qualidade microbiológica de frutos e a contagem média de bactérias aeróbicas mesofílicas foi de $3,4 \log$

UFC.g⁻¹, para maçã e laranja e de 4,0 log UFC.g⁻¹, para manga. Da mesma forma, na Espanha, em um estudo foram avaliadas 445 amostras comerciais de frutos e vegetais e os frutos apresentaram contagem de bactérias aeróbicas variando de 3,0 a 4,0 log UFC.g⁻¹ (BADOSA et al., 2008). Em contrapartida, em um levantamento feito na Índia, com 120 amostras analisadas de vegetais e frutos coletados de vendedores de rua, a contagem de bactérias aeróbicas para os frutos variou de 4,0 a 7,0 log UFC.g⁻¹ (VISWANATHAN; KAUR, 2001). Estes resultados são considerados altos se comparados com os resultados obtidos neste trabalho, o que reflete a falta de condições fitossanitárias dos vendedores de ruas locais na Índia.

Variação de temperatura, chuvas, época de maturação do fruto e localização geográfica têm sido relatadas por influenciar na população microbiana epifítica das plantas (CHAND-GOYAL; SPOTTS, 1996; THOMAS; SOLY, 2009). No presente estudo, os frutos foram coletados em diferentes áreas geográficas e isso pode ser parcialmente responsável pelas variações entre as contagens nesse estudo e as demais.

5.2 Caracterização morfológica, bioquímica e agrupamento

Das 33 amostras de frutos, foram obtidos 1.560 isolados bacterianos, dos quais 600 isolados foram submetidos ao processo de purificação e aos testes de coloração diferencial de Gram, caracterização microscópica e testes bioquímicos de esporulação, catalase e motilidade.

De acordo com os resultados desses testes, os isolados foram, inicialmente, agrupados mediante dendrogramas correspondentes a cada fruto amostrado e, a partir dos grupos obtidos, foram selecionados isolados os quais, novamente, foram submetidos à análise de grupos correspondentes a cada região de amostragem (Figuras 5 a 7). Bactérias representativas das três regiões do

Cerrado amostradas foram selecionadas para o sequenciamento da região 16S do rDNA. No total, foram 172 isolados, sendo 70 isolados de Passos, 45 de Arcos e 45 de Luminárias.

Dendrogram - frutos Passos

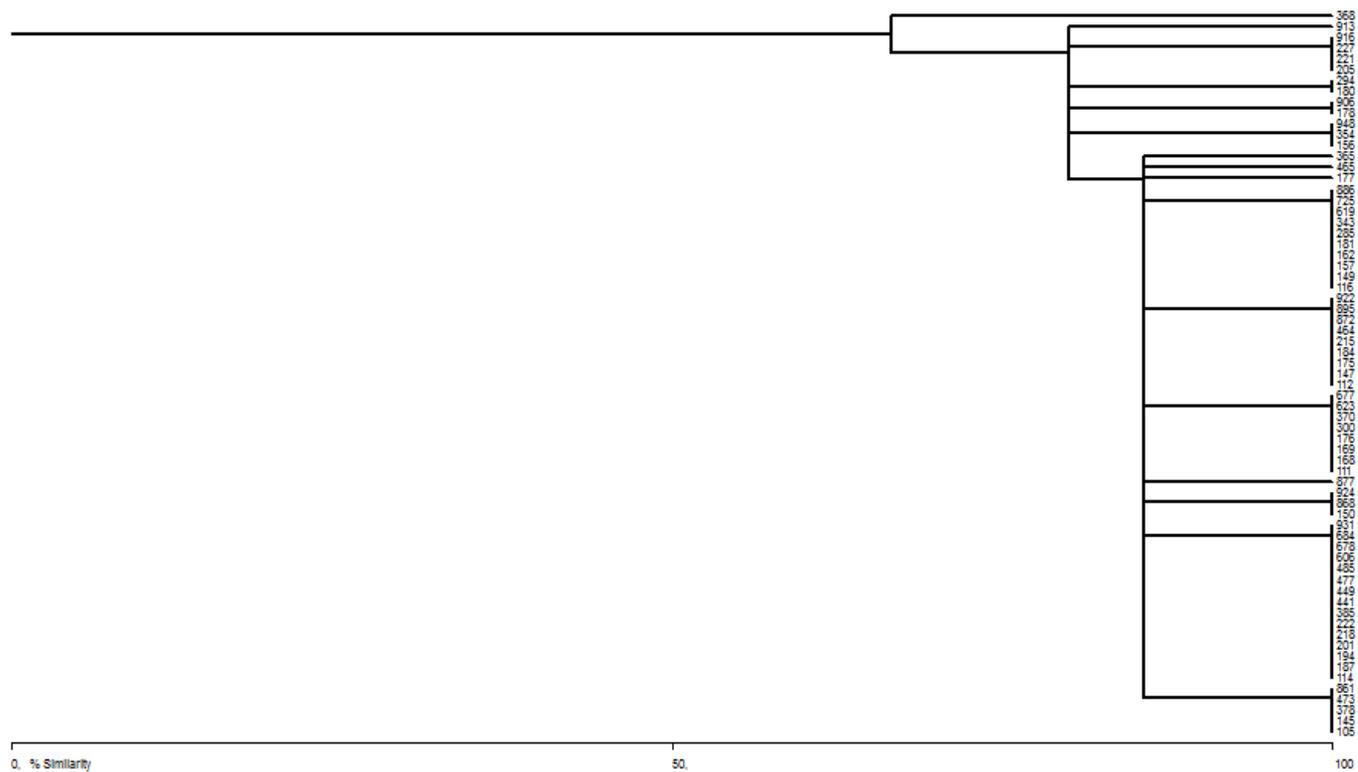


Figura 5 Dendrograma correspondente aos isolados representativos obtidos das quinze amostras de frutos da região de Passos, MG

Bray-Curtis Cluster Analysis (Single Link) - frutos Arcos

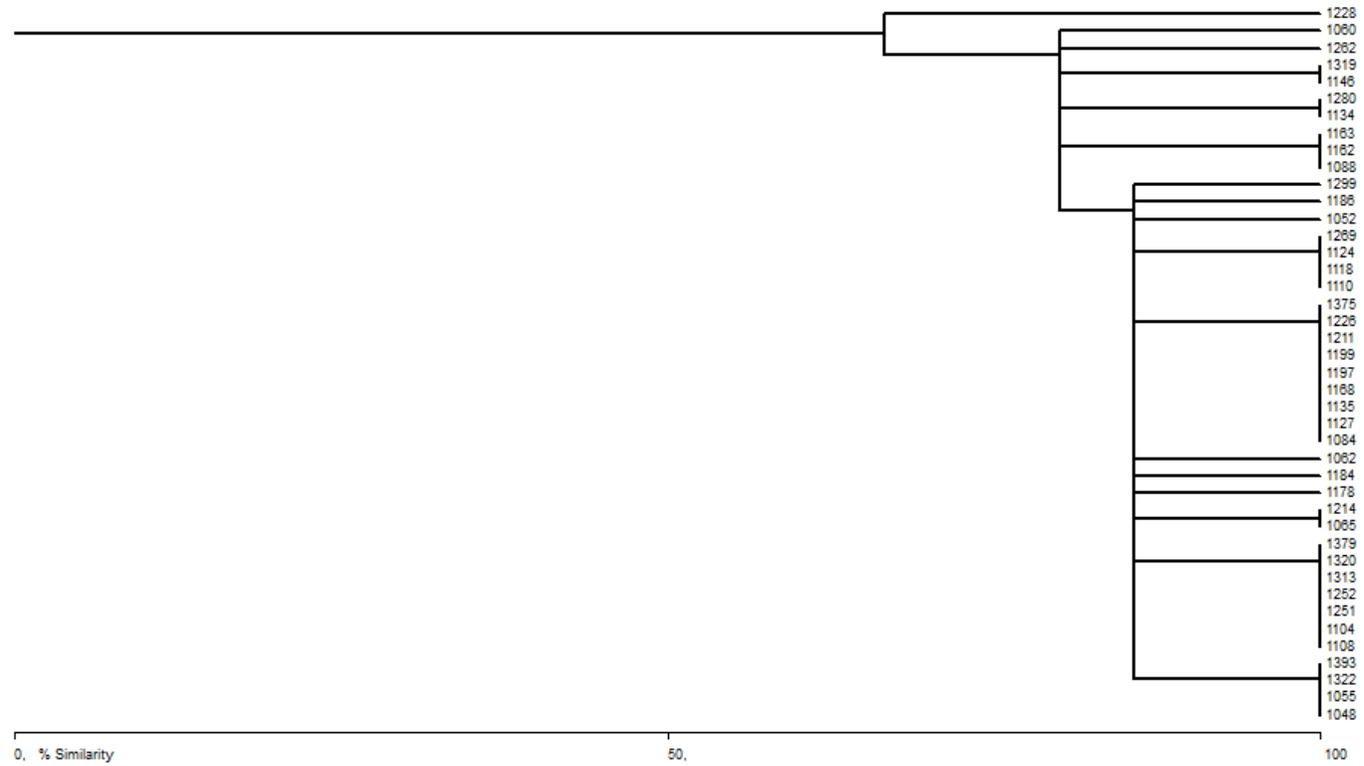


Figura 6 Dendograma correspondente aos isolados representativos obtidos das oito amostras de frutos da região de Arcos, MG

Bray-Curtis Cluster Analysis (Single Link) - frutos Luminárias

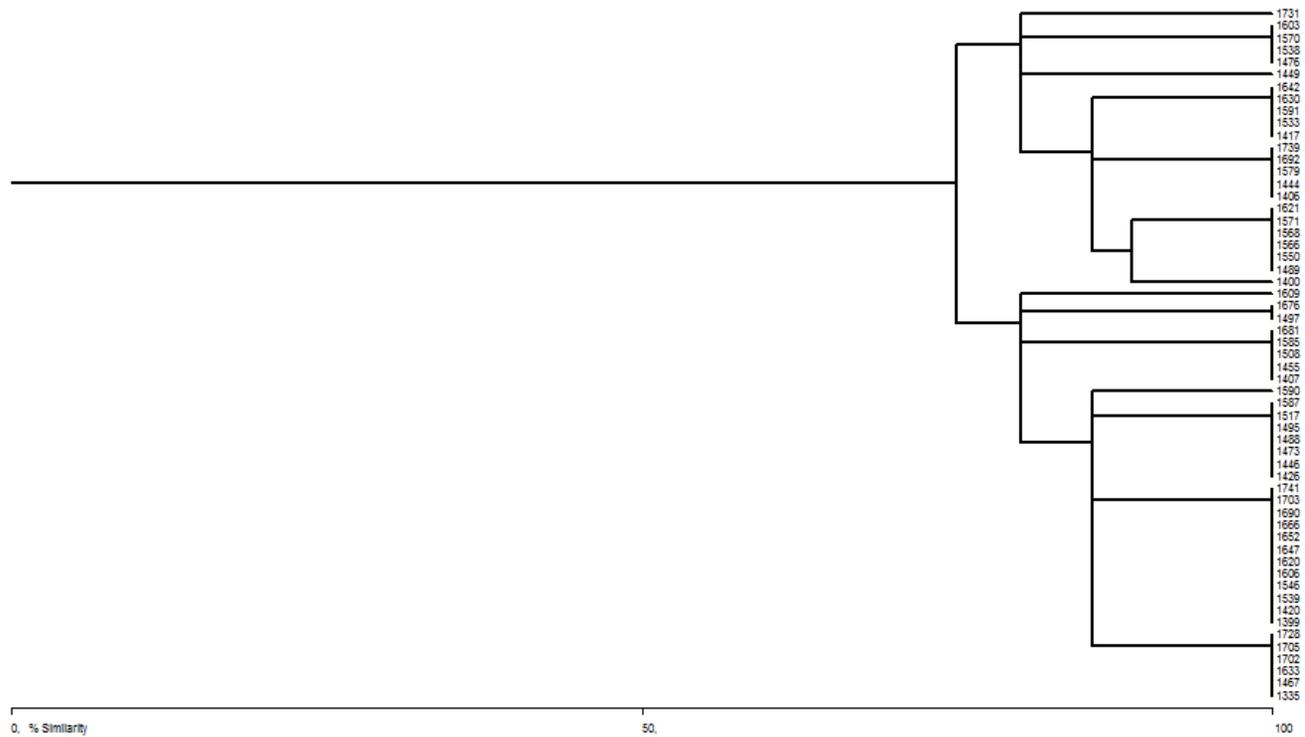


Figura 7 Dendrograma correspondente aos isolados representativos obtidos das dez amostras de frutos da região de Luminárias, MG

5.3 Identificação das bactérias por análise do gene 16S rDNA e sequenciamento

A partir dos 70 isolados provenientes dos frutos de Passos, MG, foram identificadas 21 bactérias em nível de gênero (*Streptomyces*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Burkholderia*, *Klebsiella*, *Delftia*, *Pantoea*, *Aerococcus*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Curtobacterium*, *Arthrobacter*, *Xanthomonas*, *Nocardioides*, *Diaphorobacter*, *Enterococcus*, *Microbacterium*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas* e *Chryseobacterium*) e 29 espécies entre eles (Tabela 7).

Em frutos provenientes de Arcos e Luminárias, foram identificadas 28 espécies pertencentes a 18 gêneros cada uma (Tabelas 8 e 9). Dentre os representantes isolados dos frutos coletados em Arcos, destacam-se os gêneros *Delftia*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Microbacterium*, *Burkholderia*, *Ochrobactrum*, *Bradyrhizobium*, *Erwinia*, *Streptomyces*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Methylobacterium*, *Curtobacterium*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Lactobacillus* e *Stenotrophomonas*. Os principais gêneros identificados para Luminárias foram *Achromobacter*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Tenacibaculum*, *Curtobacterium*, *Arthrobacter*, *Acidithiobacillus*, *Klebsiella*, *Streptococcus*, *Sinorhizobium*, *Vibrio* e *Citrobacter*.

Dois isolados, um de Passos e outro de Luminárias, foram identificados como bactérias não cultivadas com 100% de similaridade em relação ao número de acesso JN178882.1 e EU620183.1 no GenBank, respectivamente.

Nos frutos oriundos de Passos, foram identificadas 28 espécies Gram positivas, dentre estas as espécies de *Bacillus* (10) e *Streptomyces* (7) foram as mais representativas.

Espécies do gênero *Bacillus* são bactérias em forma de bastonetes, Gram-positivas formadoras de esporos (estrutura de resistência) e podem ser aeróbias ou aeróbias facultativas. Existem espécies tanto de vida livre como patogênicas, comumente encontrados no solo. Muitos bacilos produzem enzimas hidrolíticas extracelulares (celulases, proteases) que clivam polímeros complexos como polissacarídeos, ácidos nucleicos e lipídeos, além de algumas espécies produzirem antibióticos (MADIGAN et al., 2010). Muitas espécies do gênero *Bacillus* têm sido estudadas para aplicação biotecnológica.

O gênero *Streptomyces* é pertencente do grupo das Actinobactérias, bactérias Gram-positivas filamentosas, que formam filamentos ramificados, a maioria é formadora de esporos e estritamente aeróbios. Cerca de mais de 500 espécies de *Streptomyces* são conhecidas. Considerando a significativa importância econômica e médica dos diversos antibióticos e enzimas produzidas pelas actinobactérias, várias pesquisas têm sido realizadas com esses microrganismos (FODIL et al., 2012; PARK et al., 2012; KUMAR et al., 2012).

Tabela 7 Identificação dos isolados bacterianos procedentes da região de Passos, MG, o número de acesso (NA) correspondente no GeneBank, a respectiva percentagem de similaridade (S%) e a estimativa populacional ($\log\text{UFC.g}^{-1}$)

ISOLADOS	IDENTIFICAÇÃO	NºA	S (%)	Estimativa populacional $\log\text{UFC.g}^{-1}$
Passos				
Gram-positivas				
UFLA BCEF 105	<i>Streptomyces</i> sp.	JN566169.1	100	2,60
UFLA BCEF 111	<i>Bacillus subtilis</i>	HQ236065.1	100	2,48
UFLA BCEF 112	<i>Streptomyces</i> sp.	JN566180.1	100	2,48
UFLA BCEF 114	<i>Streptomyces</i> sp.	JN566169.1	100	2,48
UFLA BCEF 150	<i>Bacillus</i> sp.	DQ451097.1	100	2,48
UFLA BCEF 157	<i>Streptomyces</i> sp.	JN566179.1	100	2,60
UFLA BCEF 168	<i>Bacillus</i> sp.	DQ451097.1	100	2
UFLA BCEF 169	<i>Streptomyces</i> sp.	JN566179.1	100	3
UFLA BCEF 175	<i>Streptomyces</i> sp.	JN566179.1	100	2,30
UFLA BCEF 176	<i>Streptomyces</i> sp.	JN566179.1	100	2,30
UFLA BCEF 178	<i>Bacillus acidiceler</i>	FJ613547.1	96	2,78
UFLA BCEF 180	<i>Bacillus macauensis</i>	NR042892.1	97	2,30
UFLA BCEF 285	<i>Bacillus aminovorans</i>	AY211147.1	96	2,30
UFLA BCEF 294	<i>Aerococcus</i> sp.	AF076639.1	97	2
UFLA BCEF 300	<i>Streptomyces</i> sp.	JN566179.1	100	3
UFLA BCEF 354	<i>Lactobacillus brevis</i>	AB548884.1	100	2
UFLA BCEF 368	<i>Bacillus macauensis</i>	NR042892.1	97	3,69
UFLA BCEF 385	<i>Clostridium chartatabidum</i>	NR029239.1	100	2,78
UFLA BCEF 464	<i>Bacillus</i> sp.	DQ451097.1	100	2,30
UFLA BCEF 477	<i>Bacillus</i> sp.	DQ451097.1	100	2,60
UFLA BCEF 532	<i>Curtobacterium citreum</i>	FN178369.1	96	2
UFLA BCEF 606	<i>Arthrobacter</i> sp.	JF901933.1	100	2,60
UFLA BCEF 678	<i>Bacillus macauensis</i>	NR042892.1	100	2,30
UFLA BCEF 755	<i>Enterococcus faecalis</i>	FJ821315.1	100	2,78
UFLA BCEF 861	<i>Nocardioides</i> sp.	JN869461.1	100	2
UFLA BCEF 872	<i>Enterococcus faecalis</i>	FJ821315.1	96	3,70
UFLA BCEF 877	<i>Microbacterium testaceum</i>	AF474325.1	97	4,15
UFLA BCEF 913	<i>Curtobacterium herbarum</i>	JF460761.1	96	4,67
UFLA BCEF 916	<i>Curtobacterium citreum</i>	FN178369.1	97	2,60

Tabela 7, conclusão

Gram negativas				
UFLA BCEF 145	<i>Escherichia coli</i>	DQ536420.1	97	3,08
UFLA BCEF 147	<i>Enterobacter</i> sp.	DQ536420.1	97	3,08
UFLA BCEF 149	<i>Burkholderia cepacia</i>	HQ607778.1	100	2,48
UFLA BCEF 177	<i>Enterobacter cloacae</i>	FJ686827.1	94	2,78
UFLA BCEF 181	<i>Enterobacter cloacae</i>	FJ686827.1	94	2,30
UFLA BCEF 184	<i>Enterobacter</i> sp.	DQ536420.1	97	2,85
UFLA BCEF 194	<i>Klebsiella</i> sp.	FJ823035.1	97	2
UFLA BCEF 201	<i>Delftia</i> sp.	DQ131821.1	97	2,48
UFLA BCEF 205	<i>Klebsiella oxytoca</i>	NR041749.1	97	2,90
UFLA BCEF 215	<i>Klebsiella</i> sp.	DQ068764.1	98	2,60
UFLA BCEF 218	<i>Delftia</i> sp.	DQ131821.1	97	2,85
UFLA BCEF 221	<i>Pantoea agglomerans</i>	JN162392.1	97	2,60
UFLA BCEF 222	<i>Enterobacter cloacae</i>	FJ686827.1	95	2,48
UFLA BCEF 343	<i>Enterobacter</i> sp.	DQ536420.1	97	2,48
UFLA BCEF 370	<i>Delftia</i> sp.	DQ131821.1	97	2,70
UFLA BCEF 378	<i>Enterobacter</i> sp.	DQ536420.1	97	2,60
UFLA BCEF 441	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>subsp. cloacae</i>	CP001918.1	99	2
UFLA BCEF 465	<i>Escherichia coli</i>	GU329913.1	97	2,48
UFLA BCEF 473	<i>Enterobacter</i> sp.	DQ536420.1	97	3,75
UFLA BCEF 485	<i>Enterobacter asburiae</i>	CP003026.1	96	2,30
UFLA BCEF 619	<i>Xanthomonas oryzae</i>	CP000967.1	100	3,04
UFLA BCEF 677	<i>Delftia</i> sp.	DQ131821.1	97	2,60
UFLA BCEF 684	<i>Delftia</i> sp.	DQ131821.1	97	3,60
UFLA BCEF 868	<i>Diaphorobacter</i> sp.	AY997013.1	97	2,60
UFLA BCEF 895	<i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i>	AJ293464.1	97	2,48
UFLA BCEF 906	<i>Enterobacter</i> sp.	GU646906.1	96	3,0
UFLA BCEF 924	<i>Pseudomonas putida</i>	HM537229.1	100	3,30
UFLA BCEF 931	<i>Delftia</i> sp.	DQ131821.1	97	3,30
UFLA BCEF 948	<i>Chryseobacterium</i> sp.	JF768716.1	98	4
UFLA BCEF 156	Bactéria não cultivável	JN178882.1	100	2,70

Conforme se observa na Tabela 7, foram identificadas 30 espécies de bactérias Gram-negativas nos frutos coletados em Passos, sendo as espécies de enterobactérias e *Delftia* as mais representativas. As bactérias entéricas compreendem um grupo filogenético relativamente homogêneo de Gamma

proteobacteria, consistindo de bacilos aeróbios facultativos, Gram-negativos e não esporulantes. Dentre as bactérias entéricas, são encontradas várias espécies patogênicas ao homem, outros animais ou plantas, como também espécies de importância industrial. *Escherichia coli* é o organismo mais conhecido dentre todos. *Enterobacter* e *Klebsiella* contêm espécies fermentadoras de butanediol e são encontradas em água e solo. A maioria das linhagens de *Klebsiella* é capaz de fixar N₂, uma propriedade não observada em outras bactérias entéricas (MADIGAN et al., 2010).

Bactérias do gênero *Delftia* são pertencentes ao grupo das *Betaproteobacteria*, da ordem *Burkholderiales*, da família *Comamonadaceae*. A espécie *Delftia acidivorans* tem muitas atividades catabólicas e tem sido descrita fazendo parte das bactérias celulolíticas em diversos nichos ecológicos (JUÁREZ-JIMÉNEZ et al., 2010), incluindo os solos (MEHNAZ; BAIG; LAZAROVITS, 2010).

Analisando-se os dados da Tabela 8, com relação às espécies identificadas nos frutos provenientes da região de Arcos, 23 são bactérias gram-positivas e 16, Gram-negativas. Dentre as positivas, os gêneros *Bacillus*, *Streptomyces* e *Microbacterium* foram os mais representativos. Resultado semelhante pode ser observado para as bactérias Gram-positivas isoladas nos frutos de Luminárias.

Já as espécies dos gêneros de *Burkholderia* e *Ochrobactrum* foram as Gram-negativas mais detectadas em frutos da região de Arcos. Bactérias do gênero *Burkholderia* são bacilos retos, móveis, não esporulados e quimiorganotróficos, ou seja, têm a capacidade de utilizar diferentes compostos orgânicos como fonte de carbono e energia. Estes organismos são de importância ecológica no solo e na água; algumas espécies são fitopatógenos, também capazes de quebrar compostos xenobióticos, sendo importantes agentes de biorremediação no ambiente (MADIGAN et al., 2010).

Dois isolados identificados como *Stenotrophomonas maltophilia*, em frutos provenientes de Passos e Arcos-MG, pertencentes ao filo das proteobactérias são patogênicos oportunistas em humanos. Recentemente, um isolado de *Stenotrophomonas maltophilia* foi relatado com sendo celulolítico (WANG et al., 2011).

Dentre as bactérias gram-negativas provenientes de frutos de Luminárias, os gêneros *Serratia* e *Enterobacter* foram os mais presentes.

Tabela 8 Identificação dos isolados bacterianos procedentes da região de Arcos, o número de acesso (NA) correspondente no GeneBank, a respectiva porcentagem de similaridade (S%) e a estimativa populacional ($\log\text{UFC.g}^{-1}$)

ISOLADOS	IDENTIFICAÇÃO	NºA	S (%)	Estimativa populacional $\log\text{UFC.g}^{-1}$
Arcos				
Gram positivas				
UFLA BCEF 1055	<i>Bacillus pumilus</i>	FJ763642.1	98	2
UFLA BCEF 1060	<i>Staphylococcus warneri</i>	HQ831387.1	99	2,30
UFLA BCEF 1065	<i>Staphylococcus warneri</i>	HQ831387.1	99	3
UFLA BCEF 1084	<i>Microbacterium testaceum</i>	AP012052.1	99	2,60
UFLA BCEF 1108	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	AM882686.1	97	3
UFLA BCEF 1118	<i>Bacillus subtilis</i>	HQ678662.1	97	2,60
UFLA BCEF 1124	<i>Bacillus vallismortis</i>	JF912890.1	99	1,30
UFLA BCEF 1135	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	JN648098.1	99	1,48
UFLA BCEF 1162	<i>Streptomyces</i> sp.	JN566179.1	100	2,11
UFLA BCEF 1201	<i>Streptomyces</i> sp.	JN566180.1	96	2
UFLA BCEF 1211	<i>Bacillus</i> sp.	HM233971.1	99	2,08
UFLA BCEF 1228	<i>Curtobacterium</i> sp.	HQ324707.1	96	1,85
UFLA BCEF 1252	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	JF460751.1	97	2,30
UFLA BCEF 1269	<i>Bacillus pumilus</i>	FR821657.1	96	2,18
UFLA BCEF 1280	<i>Lactobacillus plantarum</i>	GQ468312.1	97	2
UFLA BCEF 1299	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	FJ174588.1	97	2
UFLA BCEF 1319	<i>Microbacterium testaceum</i>	AF474325.1	98	2,30
UFLA BCEF 1320	<i>Microbacterium testaceum</i>	JN084138.1	96	3,60
UFLA BCEF 1322	<i>Microbacterium testaceum</i>	AB478972.1	97	2,18
UFLA BCEF 1335	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	AB695338.1	96	1,70
UFLA BCEF 1375	<i>Microbacterium testaceum</i>	JN084138.1	97	1,48
UFLA BCEF 1379	<i>Microbacterium testaceum</i>	AB478964.1	95	1
UFLA BCEF 1393	<i>Microbacterium testaceum</i>	AB478972.1	97	2

Tabela 8, conclusão

Gram negativas				
UFLA BCEF 1015	<i>Delftia</i> sp.	DQ131821.1	97	2,85
UFLA BCEF 1062	<i>Serratia</i> sp.	EU439032.1	94	2,60
UFLA BCEF 1088	<i>Burkholderia phenazinium</i>	GQ181056.1	95	3,08
UFLA BCEF 1104	<i>Burkholderia sordicola</i>	AF512826.1	97	3,26
UFLA BCEF 1110	<i>Ochrobactrum</i> sp.	DQ295875.1	98	3
UFLA BCEF 1127	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	BA000040.2	100	1,48
UFLA BCEF 1146	<i>Erwinia billingiae</i>	FP236843.1	94	1,60
UFLA BCEF 1163	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	EU294137.1	100	2,26
UFLA BCEF 1168	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	AM490609.1	98	1,30
UFLA BCEF 1178	<i>Ochrobactrum pseudogrignonense</i>	FJ859687.2	97	1
UFLA BCEF 1184	<i>Pantoea ananatis</i>	FJ605368.1	96	2,18
UFLA BCEF 1186	<i>Enterobacter aerogenes</i>	FJ380123.1	97	2,18
UFLA BCEF 1214	<i>Methylobacterium</i> sp.	EU912441.1	96	1,48
UFLA BCEF 1251	<i>Escherichia coli</i>	GU329913.1	97	1,30
UFLA BCEF 1262	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	GQ480478.1	100	1,60
UFLA BCEF 1313	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	CP000958.1	98	2

Tabela 9 Identificação dos isolados bacterianos procedentes da região de Luminárias, o número de acesso (NA) correspondente no GeneBank, a respectiva percentagem de similaridade (S%) e a estimativa populacional (logUFC.g⁻¹)

ISOLADOS	IDENTIFICAÇÃO	NºA	S(%)	Estimativa populacional logUFC.g ⁻¹
Luminárias				
Gram-positivas				
UFLA BCEF1417	<i>Microbacterium testaceum</i>	AF474327.1	95	1,70
UFLA BCEF1426	<i>Microbacterium testaceum</i>	AB478972.1	96	1,60
UFLA BCEF1446	<i>Streptomyces</i> sp.	JN566174.1	100	1,60
UFLA BCEF1449	<i>Microbacterium</i> sp.	GQ280061.1	96	1,90
UFLA BCEF1467	<i>Bacillus pumilus</i>	HQ220147.1	100	1,85
UFLA BCEF1473	<i>Microbacterium marinilacus</i>	AB286020.1	97	2,11
UFLA BCEF1476	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	HM130543.1	97	2,08
UFLA BCEF1488	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	JF899288.1	98	1,90
UFLA BCEF1495	<i>Bacillus safensis</i>	JF411318.1	98	1,90
UFLA BCEF1497	<i>Microbacterium</i> sp.	JQ071519.1	98	3,00
UFLA BCEF1517	<i>Microbacterium</i> sp.	GQ280061.1	96	1,70
UFLA BCEF1557	<i>Bacillus cereus</i>	JF815044.1	94	2,72
UFLA BCEF1566	<i>Curtobacterium citreum</i>	FN178369.1	97	1,60
UFLA BCEF1568	<i>Bacillus pumilus</i>	CP000813.1	92	1,30
UFLA BCEF1587	<i>Arthrobacter echigonensis</i>	GU326383.1	98	3,30
UFLA BCEF1591	<i>Bacillus thuringiensis</i>	CP002508.1	99	3,00

Tabela 9, conclusão

UFLA BCEF1609	<i>Microbacterium marinilacus</i>	AB286020.1	97	1,70
UFLA BCEF1642	<i>Streptomyces</i> sp.	JN566174.1	100	1,30
UFLA BCEF1652	<i>Bacillus licheniformis</i>	JN133843.1	94	2,00
UFLA BCEF1676	<i>Streptomyces</i> sp.	JN566180.1	100	1,48
UFLA BCEF1676	<i>Streptomyces</i> sp.	JN566180.1	100	1,48
UFLA BCEF1728	<i>Streptomyces</i> sp.	JN566180.1	100	2,60
Gram-negativas				
UFLA BCEF1407	<i>Achromobacter</i> sp.	HQ256543.1	94	1,70
UFLA BCEF1420	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	GU447237.1	100	1,48
UFLA BCEF1444	<i>Serratia liquefaciens</i>	HQ683839.1	97	2,00
UFLA BCEF1455	<i>Serratia marcescens</i>	GU213910.1	95	2,67
UFLA BCEF1489	<i>Burkholderia multivorans</i>	AP009385.1	96	1,90
UFLA BCEF1508	<i>Enterobacteriaceae bacterium</i>	GU213133.1	97	1,30
UFLA BCEF1539	<i>Tenacibaculum soleae</i>	EU669862.1	98	1,85
UFLA BCEF1550	<i>Enterobacter</i> sp.	FJ897483.1	97	1,00
UFLA BCEF1571	<i>Serratia liquefaciens</i>	JF819697.1	94	1,78
UFLA BCEF1585	<i>Enterobacter</i> sp.	DQ129700.1	93	3,95
UFLA BCEF1647	<i>Enterobacter</i> sp.	JN853240.1	98	1,30
UFLA BCEF1666	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	CP001219.1	100	2,00
UFLA BCEF1681	<i>Klebsiella</i> sp.	FJ823014.1	94	1,30
UFLA BCEF1705	<i>Sinorhizobium fredii</i>	HE616896.1	96	1,70
UFLA BCEF1731	<i>Vibrio natriegens</i>	JN188424.1	100	1,30
UFLA BCEF1739	<i>Citrobacter freundii</i>	EF450115.1	79	2,78
UFLA BCEF1590	Bactéria não cultivável	EU620183.1	100	4,00

As espécies que apresentaram as maiores populações nos frutos de Passos foram *Curtobacterium herbarium* e *Microbacterium testaceum* 4,67 e 4,15 log UFC.g⁻¹, respectivamente entre as Gram-positivas e *Enterobacter* sp. (3,75 log UFC.g⁻¹) e *Delftia* sp. (3,60 log UFC.g⁻¹) entre as gram-negativas .

Com relação às espécies identificadas dos frutos de Arcos, entre as Gram-positivas, a espécie *Microbacterium testaceum* apresentou a maior população, 3,60 log UFC.g⁻¹. Duas espécies de *Burkholderia* (*Burkholderia sordicola* e *Burkholderia phenazinium*) foram mais representativas, entre as Gram-negativas, cujas populações foram 3,26 e 3,08 log UFC.g⁻¹, respectivamente. Estas bactérias apresentam formato de bastonetes, gram-

negativas, móveis e não esporulados. São ecologicamente saprófitas (reciclam matéria orgânica), algumas espécies são patógenos de plantas e humanos.

Em frutos da região de Luminárias, as espécies *Arthrobacter echigonensis*, *Bacillus thuringiensis* e *Microbacterium* sp. foram as bactérias gram-positivas presentes em maior número, ambas as populações foram de, aproximadamente, $3,0 \log \text{ UFC.g}^{-1}$. As espécies pertencentes ao gênero *Arthrobacter* são do filo das actinobactérias, família *Micrococcaceae*; apresentam a forma de bastonetes durante a fase exponencial de crescimento e cocos na fase estacionária. Estas bactérias não são móveis e não formam esporos; algumas espécies são utilizadas em processos de biorremediação, por serem capazes de crescer numa variedade de compostos aromáticos. Comumente encontrado nos solos e amostras ambientais. Dentre as Gram-negativas, *Enterobacter* sp. teve a maior população, $3,95 \log \text{ UFC.g}^{-1}$.

Muitos isolados dos frutos do Cerrado foram identificados como pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. Dentre as espécies, estão *Enterobacter* sp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Citrobacter freundii*, *Pantoea ananatis*, *Erwinia billingiae* e *Serratia* sp. Algumas dessas bactérias podem ser comumente encontradas em amostras de solo, água, intestino de insetos e vertebrados. Além disso, algumas espécies de enterobactérias já foram identificadas como microbiota endofítica de frutos e plantas (PEREIRA et al., 2011; TRIVEDI; SPANN; WANG, 2011; THOMAS et al., 2007). Neste caso, pode-se dizer que essas espécies presentes nos frutos estudados do Cerrado são de ocorrência natural desses frutos ou podem estar presentes pela influência de vetores bióticos, como insetos e animais ou por fatores abióticos como vento e chuva.

Métodos dependentes de cultivo apresentam algumas desvantagens em relação à enumeração de bactérias, uma vez que os microrganismos só podem ser cultivados se suas necessidades metabólicas e fisiológicas puderem ser

reproduzidas *in vitro* (NADKARNI et al., 2009). Em particular, as plantas constituem um ecossistema rico em nutriente e os meios seletivos e as condições de cultivo podem não conseguir reproduzir os nichos ecológicos e relações simbióticas encontradas através de bactérias, plantas e interações bactéria-bactéria.

Plantas fornecem um nicho rico em nutrientes para o crescimento e o desenvolvimento de vários grupos de microrganismos, especialmente bactérias. Pereira et al. (2011), em estudo sobre a diversidade de bactérias endofíticas do morango, identificaram as espécies *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Lactobacillus plantarum*, *Pseudomonas* sp. e *Curtobacterium citreum*. Estas espécies também foram encontradas associadas à microbiota epifítica dos frutos do cerrado.

Em estudo realizado com frutos de masau, fruta típica do Sul da África, muito utilizada para a produção de alimentos, como mingau, bolos, *mahewu* e geléias, Nyanga et al. (2007), por meio de métodos bioquímicos e moleculares, isolaram e identificaram leveduras e bactérias do ácido láctico associadas aos frutos no estágio imaturo e durante a fermentação da polpa do fruto. Entre as bactérias do ácido láctico identificadas, *Lactobacillus agilis* e *L. plantarum* foram as predominantes. As demais espécies presentes incluíram *L. bifementans*, *L. minor*, *L. divergens*, *L. confusus*, *L. hilgardii*, *L. fructosus*, *L. fermentum* e *Streptococcus* spp.

Krimm et al. (2005) estudaram microrganismos epifíticos de plantas de morango e identificaram bactérias relacionadas com a superfície das folhas, pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Bacillus* e *Arthrobacter*. As espécies *Klebsiella oxytoca* e *Enterobacter* sp. foram relatadas por Nisiotou et al. (2011), em uvas; *Streptococcus* spp. (NYANGA et al., 2007), em frutos de masau; *Lactobacillus plantarum*, (DI CAGNO et al., 2010) em abacaxi e *Enterobacter cloacae* (ABDULLA et al., 2011), em tomate.

Microorganismos, como *Bacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Pantoea*, *Agrobacterium* e *Methylobacterium* spp. constituem as bactérias endofíticas e epifíticas comumente isoladas de diversas plantas, como arroz, trigo, milho, algodão, cana-de-açúcar, tomate, pepino e gramíneas selvagens, têm sido foco de trabalhos anteriores (MANO; MORISAKI, 2008; ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006; SUN et al., 2007; BACON; HINTON, 2006; CHELIUS; TRIPLETT, 2001; STURZ et al., 1998).

Atualmente, alguns trabalhos envolvendo a comunidade bacteriana de endofíticos e epifíticos de culturas perenes estão sendo desenvolvidos com uvas (NISIOTOU et al., 2011), citrus (TRIVEDI; SPANN; WANG, 2011), morango (PEREIRA et al., 2011), café (SILVA et al., 2008; VILELA et al., 2010), mamão (THOMAS et al., 2007), banana (THOMAS et al., 2007) e espécies florestais (ULRICH et al., 2008). No Cerrado, embora haja poucos trabalhos na literatura, a diversidade microbiana de frutos já foi relatada em gabioba (DUARTE et al. 2010), acerola, pitanga, umbu, mangaba (TRINDADE et al., 2002; TRINDADE, 2004), pequi (FERREIRA; JUNQUEIRA, 2007) e frutos secos de cabacinha (AMARAL; COUTINHO; RIBEIRO, 2001).

5.4 Espécies de bactérias detectadas por PCR-DGGE

Atualmente, o conhecimento da estrutura da comunidade bacteriana associada a diferentes espécies de plantas baseia-se em métodos dependentes e independentes de cultivo (ULRICH et al., 2008; ANDREOTE et al., 2009; VILELA et al., 2010; PEREIRA et al., 2011).

No perfil da comunidade bacteriana revelado pela técnica PCR-DGGE, pôde-se observar que houve diferença na microbiota presente nas diferentes amostras de frutos e regiões estudadas. As análises das sequências obtidas das

bandas excisadas (97% a 100% de similaridade) demonstraram que nenhuma espécie esteve presente em todas as amostras examinadas (Figura 8). Nos frutos oriundos das regiões de Passos e Luminárias, foram notados diferentes perfis bacterianos entre as amostras de frutos, enquanto em frutos de Arcos, as diferentes amostras revelaram perfis mais homogêneos. Comparando-se a diversidade bacteriana entre as três regiões, pode-se observar que os frutos de Passos e Luminárias apresentaram maior incidência de bandas do que os frutos de Arcos. No entanto, em Passos e Luminárias, houve maior número de amostras de diferentes frutos.

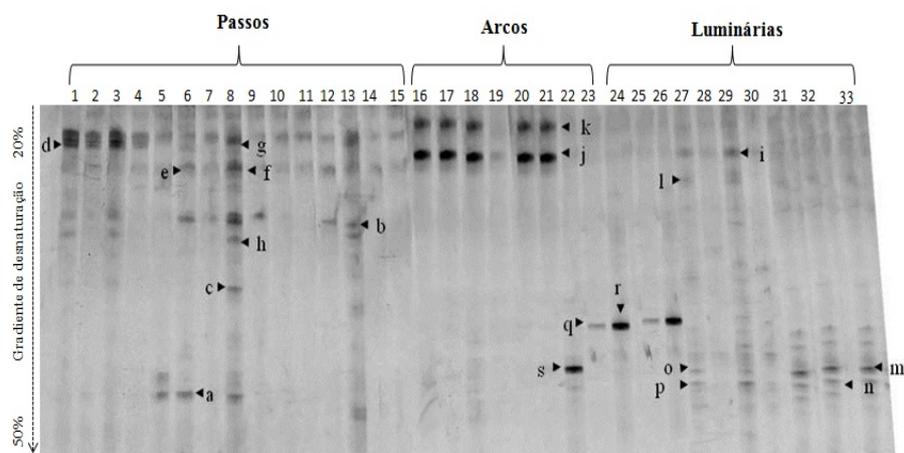


Figura 8 Perfis de PCR-DGGE de 33 amostras de frutos das regiões de Passos, Arcos e Luminárias, com gradiente desnaturante de 20% a 50%. Os números se referem às diferentes amostras de frutos coletadas: coluna de 1 a 15 frutos de Passos (erva-de-rato, pimentinha-do-mato, cabelo-de-negro, cafezinho-do-mato, pixirica, muxiba, murici, araçá, aroeirinha, pau-amargo, erva-de-passarinho - *Psittacanthus robustus*, jacatirão, fruta-de-pomba, erva-de-passarinho - *Psittacanthus acinarius*, bejuco-colorado, respectivamente); coluna 16 a 23 frutos de Arcos, (jatobá, arrebenta-boi, ananás, marolo, goiaba, pequi, marolinho e midigrilo, respectivamente) e coluna 24 a 33, frutos coletados em Luminárias (pau-santo, muxiba, murici-do-cerrado, pixirica - *Miconia pseudonervosa*, erva-de-jabutí, azeitona-do-mato, capororoca, pixirica - *Miconia chamissois*, jacatirão, pixirica - *Miconia pepericarpa*, respectivamente). As letras correspondem às espécies correspondentes às diferentes bandas: a- bactéria não cultivável FJ406571.1; b - bactéria de solo não cultivável GQ351443.1; c - *Methylobacterium gregans* HM803941.1; d- bactéria não cultivável FJ403001.1; e- *Stenotrophomonas* sp. FJ609992.1; f- *Methylobacterium* sp. JN590732.1; g - bactéria não cultivável FN421647.1; h - bactéria não cultivável JF681620.1; i - bactéria não cultivável EF990686; j - bactéria não cultivável GU764869.1; k - *Lactobacillus fermentum* JQ083644.1; l - não identificada; m - *Enterobacter aerogenes* CP002824.1 ; n - α -*Proteobacterium* não cultivável FJ938135.1; o - *Clostridium* sp. FJ609997.1; p - *Pantoea* sp. FJ611805.1; q - não identificada; r - *Acinetobacter* sp. CR543861.1; s - *Methylomonas methanica* CP002738.1

Em relação aos frutos de Passos, os frutos araçá (8) e erva-de-passarinho (13) tiveram maior número de bandas, o que, possivelmente, indica a presença de mais de espécies. As bandas A, B, D, G e H foram identificadas como bactérias não cultiváveis. As bandas D e G estiveram presentes em todas as amostras de frutos dessa região e o perfil A foi detectado nos frutos pixirica (5), muxiba (6) e araçá (8).

As bandas C e F, presentes no fruto araçá (8), embora distintas, correspondem à mesma espécie *Methylobacterium gregans* e *Methylobacterium* sp., respectivamente. Embora as bandas E (*Stenotrophomonas* sp.) e F (*Methylobacterium* sp.) sejam perfis semelhantes não corresponderam à mesma espécie. Mesmo sendo sequências diferentes, o fragmento do gene 16S rDNA pode ter comportamento de fusão idêntico, o que levou à semelhança entre as bandas no gel (ERCOLINI, 2004).

O perfil da comunidade bacteriana presente nas amostras de Arcos se mostrou bastante homogêneo. Não houve diferença entre os frutos jatobá (16), arrebenta-boi (17), ananás (18), marolo (19) e goiaba (20), sendo predominantes as bandas J e K, bactéria não cultivável e *Lactobacillus fermentum*, respectivamente. Entretanto, a banda S, identificada como *Methylomonas methanica*, foi detectada apenas no fruto marolinho (22).

Em Luminárias, foi detectada maior riqueza de amplicons entre os frutos. Nas amostras pixirica (31), jacatirão (32) e pixirica (33), houve similaridade entre alguns perfis, sendo a banda M identificada como *Enterobacter aerogenes* e a banda N, bactéria gram-negativa pertencente ao grupo das α proteobactérias. Além disso, os frutos pau-santo (24), muxiba (25) e murici-do-cerrado (26) também apresentaram perfis semelhantes à banda R identificada como *Acinetobacter* sp. As bandas O e P, isoladas do mesmo fruto pixirica (27), correspondem às espécies *Clostridium* sp. e *Pantoea* sp., respectivamente. Não foi possível realizar a identificação das bandas L e Q.

As espécies *Methylobacterium* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Clostridium* sp., *Pantoea* sp., *Enterobacter* sp. e espécies do grupo α - *Proteobacteria* foram detectadas tanto por isolamento como por DGGE. Oito bandas (A, B, D, G, H, I, J e N) detectadas no DGGE foram identificadas como bactérias não cultiváveis. Porém, nem todas as espécies (*Lactobacillus fermentum*, *Acinetobacter* sp. e *Methylomonas methanica*) recuperadas pelo método independente de cultivo foram isoladas por cultivo.

A maior parte das espécies isoladas por cultivo não foi detectada no gel de DGGE das mesmas amostras, o que pode ser explicado pela maior afinidade de algumas espécies com os *primers* utilizados em relação às outras.

Alguns gêneros de bactérias detectadas por DGGE neste trabalho são comumente encontrados em diferentes amostras de frutos, como *Acinetobacter* sp. em café (SILVA et al., 2008; VILELA et al., 2010) e banana (THOMAS; SOLY, 2009), *Pantoea* sp. em morango (PEREIRA et al., 2011), *Lactobacillus fermentum* em masau (NYANGA et al., 2007) e *Methylobacterium* sp. em citrus (TRIVEDI; SPANN; WANG, 2011).

A utilização da técnica PCR-DGGE permitiu a caracterização da diversidade bacteriana presente nas amostras de frutos, uma vez que foi possível detectar bactérias não cultiváveis e das espécies *Lactobacillus fermentum*, *Acinetobacter* sp. e *Methylomonas methanica*.

Em estudo sobre a diversidade microbiana presente em frutos de café, durante o processamento semiseco, a utilização de PCR-DGGE foi capaz de detectar *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter agglomerans*, *Bacillus cereus* e *Klebsiella pneumoniae* como bactérias predominantes. Todas as espécies de bactérias detectadas PCR-DGGE foram isoladas por métodos dependentes de cultivo, com exceção de uma bactéria não cultivável (VILELA et al., 2010).

Weinert et al. (2010), analisando a diversidade bacteriana epifítica presente em batatas, detectaram os grupos bacterianos *Actinobacteria*, α -*Proteobacteria*, β -*Proteobacteria*, *Bacillus*, *Streptomycetaceae* e *Pseudomonas* sp.

Em estudo realizado com frutos de morango, as espécies de *Bacillus subtilis*, *Enterobacter* sp. e *Pseudomonas* sp. foram detectadas tanto por cultivo quanto pela técnica de DGGE. No entanto, as espécies *Lactobacillus plantarum*, *Pantoea punctata* e *Curtobacterium citreum*, representativas pelo isolamento, não apresentaram bandas correspondentes no gel de DGGE. Por outro lado, algumas bandas no perfil de DGGE, que foram identificadas como *Arthrobacter* sp. e uma espécie não cultivável de *Erythrobacter* sp. não foram recuperadas pela técnica de cultivo (PEREIRA et al., 2011).

O método amplamente utilizado de PCR-DGGE tem mostrado grande potencial para estudos sobre bactérias endofíticas em diferentes espécies de plantas (ANDREOTE et al., 2009; MONTEIRO et al., 2009; PEREIRA et al., 2011). Embora a análise da diversidade de bactérias usando técnicas de cultura tenha a suas próprias limitações, sua principal vantagem é que as bactérias podem ser isoladas e caracterizadas para mais estudos.

Assim, a combinação entre métodos convencionais de cultura e PCR-DGGE é necessária para melhor caracterizar a diversidade pertencente aos frutos, além de compreender o papel ecológico de microrganismos epifíticos e endofíticos e suas aplicações biotecnológicas na agricultura.

5.5 Avaliação enzimática qualitativa

A seleção de cepas bacterianas produtoras de celulase foi realizada com 600 isolados provenientes dos frutos das regiões de Passos, Arcos e Luminárias.

Considerando produtores fracos, positivos e fortes, 178 cepas (30%) foram capazes de formar o halo de degradação da celulose ao redor das colônias. Isso indica que estas bactérias produzem uma mistura complexa de enzimas: celulases. Estas enzimas, que coletivamente apresentam especificidade para ligações glicosídicas β -1,4, são necessárias para a solubilização completa da celulose, exigindo sinergismo na sua forma de atuar (BON, et al., 2008).

Dentre as bactérias fortes produtoras (halo \geq 3), destacaram-se oito cepas isoladas de três frutos de Arcos, sendo cinco isolados (UFLA BCEF 1124, UFLA BCEF 1130, UFLA BCEF 1135, UFLA BCEF 1180, UFLA BCEF 1181) associados à microbiota epifítica do fruto marolo (*Annona crassiflora*), UFLA BCEF 1252 à goiaba (*Psidium guajava*) e UFLA BCEF 1048 ao fruto arrebenta-boi (*Solanum aculeatissimum*). Da região de Luminárias, apenas o isolado UFLA BCEF 1615, proveniente do fruto capororoca (*Myrsine coriacea*), apresentou atividade celulolítica.

Dessas cepas, apenas duas (UFLA BCEF 1130 e UFLA BCEF 1615) foram selecionadas para a quantificação enzimática. O isolado UFLA BCEF 1130 foi caracterizado como bastonete Gram-positivo, formador de esporo e móvel e UFLA BCEF 1615, cocos Gram-positivos, não formador de esporo e móvel. As cepas mostraram máxima zona de clareamento (+ +) em ágar CMC, após a imersão da solução de iodo (Figura 9).

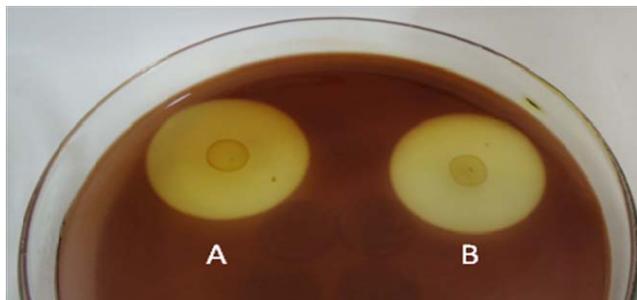


Figura 9 Halo ao redor das cepas de bactérias produtoras de celulase. A) UFLA BCEF 1130 e B) UFLA BCEF 1615

Algumas bactérias e leveduras relacionadas com doenças de plantas expressam sua ação patogênica pela produção de exoenzimas, tais como proteases, celulasas e pectinases (TOTH et al., 2003).

Korpole, Sharma e Verma (2011) selecionaram 22 cepas de bactérias capazes de degradar carboximetilcelulose (CMC). Estes isolados foram cultivados em meio com CMC como única fonte de carbono e todos estes foram caracterizados como gram-positivos, formadores de esporos e crescimento ótimo em pH 9-10.

Tecidos vegetais em decomposição e a superfície do solo constituem o principal hábitat da microbiota aeróbica celulolítica. Sistemas celulolíticos completos são produzidos por diferentes gêneros e espécies de bactérias e fungos. As bactérias celulolíticas incluem espécies aeróbias, como actinomicetos, anaeróbias facultativas, como *Bacillus* e *Cellulomonas* anaeróbias estritas como *Clostridium* (BON; FERRARA; CORVO, 2008).

Recentemente, várias bactérias produtoras de celulase têm sido relatadas, incluindo *Cellulomonas*, *Cytophaga*, *Pseudomonas*, *Sporocytophaga*, *Streptomyces* (WIRTH; ULRICH, 2002), *Bacillus pumilus* (ARIFFIN et al., 2008), *Bacillus subtilis* (KIM et al., 2009), *Bacillus flexus* (TRIVEDI et al.,

2010), *Marinobacter* (SHANMUGHAPRIYA et al., 2010) e *Vibrio* (GAO et al., 2010).

5.6 Avaliação enzimática quantitativa

As bactérias selecionadas a partir do teste qualitativo foram cultivadas em meio líquido, por 5 dias, com os respectivos indutores carboximetilcelulose, celulose microcristalina (avicel) e celobiose, para verificar a capacidade de produção das enzimas endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase, respectivamente. Para isso, foi utilizado um delineamento experimental – delineamento composto central rotacional (DCCR). O uso da metodologia de superfície de resposta é um procedimento rápido e eficiente que permite obter uma ideia geral das condições ideais para um experimento (RATNAM et al., 2005).

Após a análise dos resultados das atividades específicas para endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase pelo programa estatístico Design-Expert[®] 8.0, apenas os ensaios para endoglucanase realizados com o isolado UFLA BCEF1130 demonstraram resposta estatística significativa ($p < 0,05$).

Nas Tabelas 10 e 11 encontram-se os resultados referentes às atividades específicas (U/mg) das três enzimas quantificadas (endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase) para os isolados UFLABCEF1615 e UFLA BCEF1130, respectivamente. Os baixos valores observados para as atividades específicas das enzimas podem ser atribuídos aos altos valores de proteínas determinados em cada ensaio. Além disso, o tempo de incubação, 5 dias, pode ter sido pouco para que o microrganismo começasse a liberar a enzima para o meio. No entanto, em alguns ensaios, não foi detectada atividade no 3º dia de incubação e somente no 5º dia foi observada atividade, por exemplo, de 0,1 U/mg de proteína no ensaio 13 de β -glucosidase.

Tabela 10 Atividade enzimática específica (U/mg de proteína x 10⁻³) para endoglucanase, exoglucanase e β-glicosidase, obtida nos 17 ensaios avaliados por DCCR, durante o 3° (Y₃) e o 5° (Y₅) dia de produção

UFLA BCEF 1615 Ensaio	Endoglucanase		Exoglucanase		β-glicosidase	
	Y ₃	Y ₅	Y ₃	Y ₅	Y ₃	Y ₅
1	0	0,1661	0	0	0	0
2	0	0,1665	0,1415	0	0	0
3	0	0,1023	0,0352	0	0	0
4	0	0,0267	0,0669	0	0	0
5	0,1089	0,1579	0,0302	0	0	0
6	0,0573	0,1289	0,0861	0,091	0	0,035
7	0,02	0,0939	0,0248	0	0	0
8	0,0419	0,146	0	0,0505	0	0
9	0,0607	0,0779	0	0	0	3,6551
10	0	0,0466	0,0668	0	0	0
11	0,0351	0	0	0,0643	0	0
12	0	0,0476	0	0	0	0,3313
13	0,0548	0,0482	0	0	0	11,9384
14	0,0182	0	0,0863	0	0	0
15	0,0266	0	0	0	0	0
16	0,0778	0	0	0	0	0
17	0,0255	0	0	0	0	0

Tabela 11 Atividade enzimática específica (U/mg de proteína $\times 10^{-3}$) para endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase, obtida nos 17 ensaios avaliados por DCCR durante o 3^o (Y_3) e no 5^o (Y_5) dia de produção

UFLA BCEF 1130 Ensaio	Endoglucanase		Exoglucanase		β -glicosidase	
	Y_3	Y_5	Y_3	Y_5	Y_3	Y_5
1	0,851	0,322	0,0512	0,0913	0	0
2	0,0429	0,2011	0,0431	0,0706	0	0
3	0,1463	0,2117	0,0613	0,517	0	0
4	0,1031	0,2029	0	0,0395	0,7218	1,2662
5	0,1123	0,1006	0,0325	0,0587	0	3,5563
6	0,0731	0,1891	0	0,0702	0,1185	0,6219
7	0,1278	0,3147	0,0502	0	0	0,7724
8	0,1187	0,3189	0,0303	0,0572	0,3332	0,0781
9	0,1524	0,3103	0,0333	0,0586	0	0
10	0,0693	0,0602	0,0407	0,022	0	0,6792
11	0,0913	0,2895	0,0435	0,0401	0	0
12	0,1287	0,5718	0,0517	0,0486	0	0
13	0	0,522	0,1302	0,0608	0	0
14	0,1093	0,3956	0,038	0,0396	0	0
15	0,1701	0,306	0,0707	0,0405	0	0
16	0,1408	0,1591	0,0572	0,0549	0	0
17	0,1007	0,2619	0,0707	0	0	0

Dentre outros fatores que poderiam estar relacionados à baixa atividade estão as variáveis testadas, como volume de inóculo e fonte inorgânica de nitrogênio que talvez não estivessem em quantidades suficientes para maximizar o processo. O meio de crescimento (caldo nutriente) dos microrganismos era de composição diferente do meio de fermentação; neste caso, pode ter ocorrido uma fase lag maior, o que retardou a produção enzimática.

As variáveis indicadas não apresentaram resposta significativa para os ensaios relacionados ao isolado UFLA BCEF1615. Neste caso, os resultados mostrados a seguir referem-se apenas ao experimento realizado com o isolado UFLA BCEF1130 (Tabela 12).

Os resultados experimentais do DCCR foram definidos seguindo equação linear. A partir dos resultados da análise de variância dos dados

(ANAVA), os modelos matemáticos para Y_3 e Y_5 , como funções de pH (X_1), inóculo (X_2) e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (X_3), puderam ser expressos pelas equações (3) e (4).

$$Y_3 = +1.04233\text{E-}003 - 2.00241\text{E-}004 X_1 + 1.79643\text{E-}004 X_2 + 1.74458\text{E-}004 X_3 \quad (3)$$

$$Y_5 = +2.78672\text{E-}003 - 9.24063\text{E-}004 X_1 - 4.52069\text{E-}004 X_2 - 2.19894\text{E-}004 X_3 \quad (4)$$

A análise de variância (ANAVA) indicou que apenas as atividades de endoglucanase nos tempos 3 e 5, do isolado UFLA BCEF1130, foram significativas.

A determinação dos valores do coeficiente de regressão (R^2) para as duas variáveis respostas foram de 0,49 e 0,53; Y_3 e Y_5 , respectivamente.

Analisando-se os valores na Tabela 12 observa-se que somente o fator pH (X_1) teve efeito significativo sobre a atividade enzimática. Assim, pode-se notar, pela equação (3), que, se o o valor de pH aumentar, a resposta (atividade enzimática) diminui.

Tabela 12 Análise de variância dos resultados experimentais do DCCR, para as variáveis respostas (Y_3 e Y_5) do isolado UFLA BCEF1130

Fonte	df	Valor de F		Valor de P	
		Y_3	Y_5	Y_3	Y_5
Modelo linear	3	4,18	4,94	0,0281*	0,0167*
X_1 -pH	1	4,9	11,44	0,0454*	0,0049*
X_2 -Inóculo	1	3,94	2,74	0,0687NS	0,122NS
X_3 - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1	3,72	0,65	0,076NS	0,4335NS
Resíduo	13				
Desvio padrão	11	0,91	2,51	0,6339NS	0,3197NS
Erro	2				
TOTAL	16				

*valores significativos, pelo teste – F ($p < 0,05$)

NS – não significativo

As curvas de superfície de resposta foram plotadas para determinar o nível ótimo de cada variável. As curvas de superfície de resposta são mostradas nos Gráficos 4 e 5. Para as três variáveis, pH, inóculo e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, o efeito linear foi estatisticamente significativo para a atividade específica da endoglucanase do isolado UFLA BCEF1130.

A atividade específica de endoglucanase no 3º dia de produção foi positivamente afetada pelo inóculo e pelas concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH e inóculo e pH e concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Gráfico 4). No entanto, as variáveis inóculo e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ não apresentaram efeito significativo sobre a atividade enzimática.

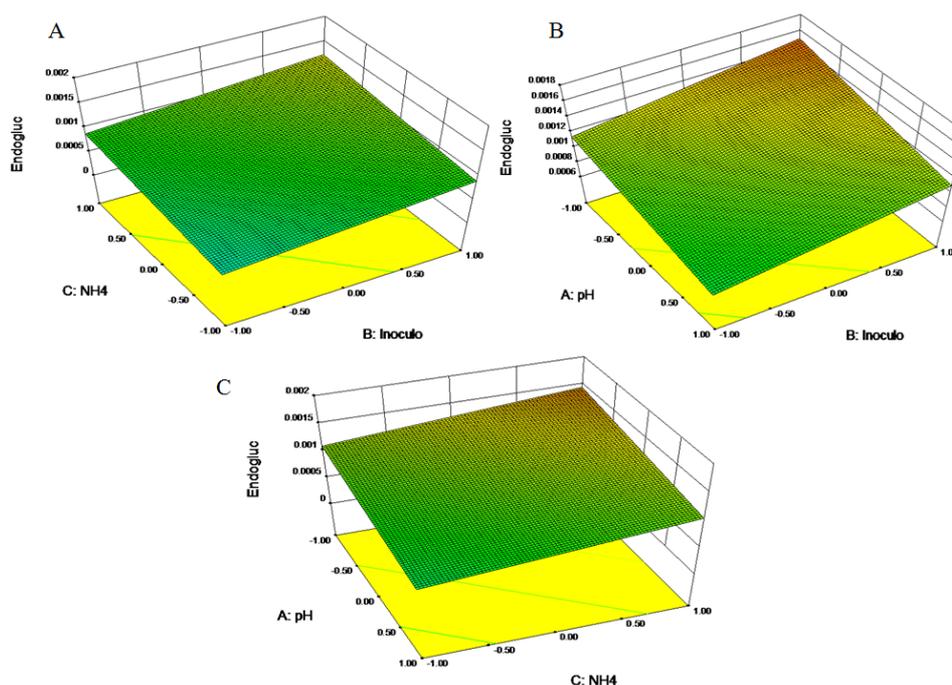


Gráfico 4 Superfície resposta para a variável dependente Y_3 (atividade endoglucanase no tempo 3). (A) efeito da concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e inóculo; (B) efeito do pH e inóculo; (C) efeito do pH e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

No entanto, nos gráficos B e C da Gráfico 4, o fator pH teve efeito contrário aos fatores inóculo e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, em relação à atividade de endoglucanase, ou seja, quanto menores os valores de pH, maiores foram as respostas para atividade enzimática.

De acordo com os resultados obtidos, a melhor atividade de endoglucanase foi observada em pH 5.5. Li et al. (2009) estudaram o efeito do pH sobre a atividade da endoglucanase produzida por um novo isolado de *Escherichia coli*. Estes autores relataram que a melhor atividade enzimática (0.17 e 2.01 U/mg proteína) foi obtida com 3 dias (72 horas) de cultivo em pH 6,0. Essa atividade manteve-se estável no intervalo de pH 5,0 a 10,0 e quase 85% da atividade máxima em pH 10,0, sugerindo ser um isolado produtor de endoglucanase alcalino resistente. Os autores sugerem que essa habilidade de manter alta atividade sob elevados valores de pH é uma propriedade potencialmente útil em processos que empregam deslignificação alcalina.

Ahuja, Ferreira e Moreira (2004) estudaram o efeito de várias fontes de carbono e nitrogênio sob a atividade de endoglucanase, produzida pela bactéria marinha *Teredinobacter turnirae*. Entre as fontes de carbono, a sacarose resultou na máxima produção enzimática, seguida pela celulose. O fosfato de amônio $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ foi a melhor fonte de nitrogênio utilizada para a produção de endoglucanase, seguida pelo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. No presente trabalho a única fonte inorgânica de nitrogênio testada foi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ que, para o isolado UFLA BCEF1130, não teve efeito significativo sobre a produção enzimática.

A atividade específica de endoglucanase no 5º dia de produção foi positivamente afetada linearmente pelo inóculo e pelas concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH e inóculo e pH e concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Gráfico 5). No entanto, as variáveis inóculo e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ não apresentaram efeito significativo sobre a atividade enzimática.

Ao contrário dos resultados do terceiro dia de cultivo e, com base na equação (2), pode-se observar que, para os três fatores avaliados, a maior atividade de endoglucanase foi obtida nos ensaios em que pH, inóculo e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ apresentavam os valores mais baixos. No entanto, apenas o pH teve efeito significativo sobre a atividade de endoglucanase, ou seja, valores mais baixos de pH incrementaram a atividade.

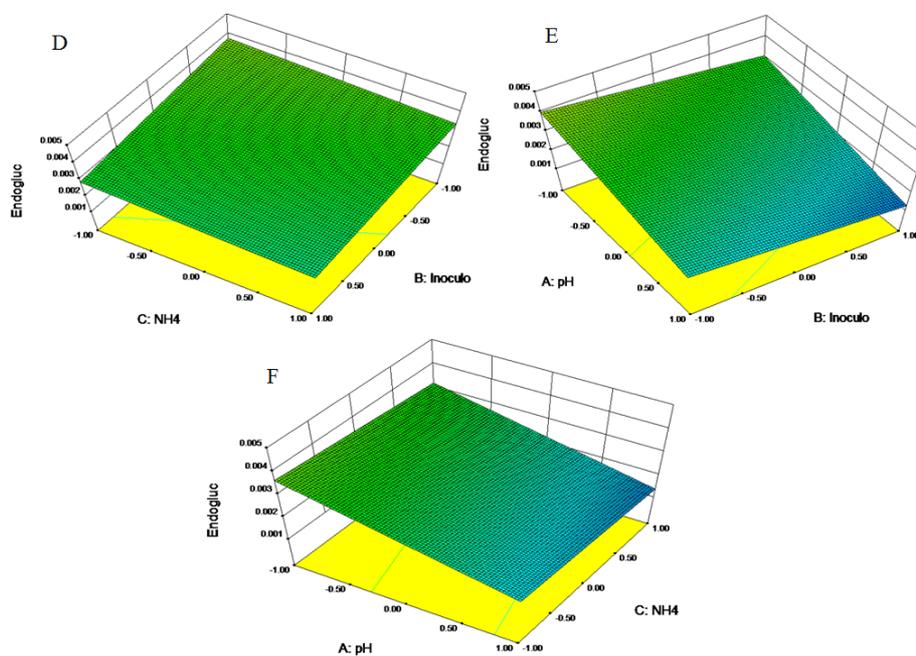


Gráfico 5 Superfície resposta para a variável dependente Y_5 (atividade endoglucanase no tempo 5). (D) efeito da concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e inóculo; (E) efeito do pH e inóculo; (F) efeito do pH e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

O isolado UFLA BCEF1130 é um bastonete gram-positivo e esporulante. De acordo com os isolados identificados, pode-se inferir que esta cepa pertence ao gênero *Bacillus* e, neste caso, o sequenciamento deste isolado será realizado para confirmação da espécie.

Muitas celulasas são produzidas por espécies de *Bacillus*, a maioria delas sendo enzimas hidrolíticas extracelulares alcalinas (TRIVEDI et al., 2010; SINGH; BATRA; SOBTI, 2004; HAKAMADA et al., 2002). Apenas alguns tipos de celulasas ácidas são produzidas por espécies de *Bacillus* (LI et al., 2006; ECKERT & SCHNEIDER 2003; MAWADZA et al., 2000). Neste estudo, o isolado UFLA BCEF1130 apresentou ótima atividade de endoglucanase sob baixos valores de pH segundo o modelo experimental.

Ariffin et al. (2008) estudaram a produção de endoglucanase por uma cepa de *Bacillus pumilus* e relataram que a máxima atividade (0,076 U/mL) foi secretada a 37 °C, pH 7,0 e 10g/L de CMC como fonte de carbono. Com relação às fontes de nitrogênio testadas, a fonte orgânica (extrato de levedura), na concentração de 2 g/L, revelou a maior produtividade enzimática (1,44 U/L.h⁻¹) do que a fonte inorgânica (NH₄)₂SO₄, cuja produtividade enzimática observada foi de 1,13 U/L h⁻¹.

De modo geral, as atividades enzimáticas aqui reveladas ainda são muito reduzidas, em comparação com outros microrganismos já estudados. Yang et al. (2011) observaram que a maior produção de endoglucanase (0,24 U/mL) pela espécie *Achromobacter xylosoxidans* foi no 16º dia de cultivo, com pH 5,0. No entanto, o isolado UFLA BCEF1130 apresentou maior atividade de endoglucanase (0,0057 U/mg proteína), no 5º dia de incubação. As maiores atividades celulolíticas observadas para duas cepas de bactérias Bdc_183 e Bdc_345 foram 13,50 e 9,27 U/mL (WHANG; WANG; HU, 2011).

Sendo assim, estudos mais detalhados devem ser realizados com essa e outras cepas de bactérias, que mostraram ser potenciais produtoras de celulase.

6 CONCLUSÕES

A partir da metodologia empregada pode-se concluir que:

- a) após o sequenciamento de 172 isolados bacterianos, para Passos, foram identificados 21 gêneros bacterianos e 29 espécies. Arcos e Luminárias tiveram 28 espécies pertencentes a 18 gêneros cada. Dentre os gêneros comuns para as três regiões, estão *Streptomyces*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Curtobacterium*, *Microbacterium*, *Methylobacterium* e *Curtobacterium*;
- b) as espécies *Methylobacterium* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Clostridium* sp., *Pantoea* sp., *Enterobacter* sp. e bactérias gram-negativas do grupo das proteobactérias foram detectadas tanto por isolamento como por DGGE;
- c) oito espécies de bactérias não cultiváveis foram detectadas pelo DGGE. As espécies (*Lactobacillus fermentum*, *Acinetobacter* sp. e *Methylomonas methanica*) foram detectadas somente pelo método independente de cultivo;
- d) dentre as bactérias, 178 cepas (30%) foram capazes de produzir celulase em meio sólido sintético (ágar CMC);
- e) o DCCR permitiu observar que somente o pH teve efeito sobre a atividade de endoglucanase do isolado UFLA BCEF1130.
- f) não foi possível a otimização do processo de produção da celulase, sendo necessários mais estudos testando diferentes fatores que possam influenciar significativamente na atividade enzimática.

REFERÊNCIAS

ABDULLA, M. H. et al. Isolation and characterization of *Serratia rubidaea* from dark brown spots of tomato fruits. **Phytoparasitica**, Israel, v. 39, n. 2, p. 175-183, 2011.

AGÊNCIA DE NOTÍCIAS DA FUNDAÇÃO DO AMPARO À PESQUISA DE SÃO PAULO. Enzimas em tecnologia ambiental. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 9., 2010, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: FAPESP, 2010. Disponível em: <<http://www. .com.br/>> Acesso em: 10 out. 2010.

AGOSTINI-COSTA, T.; VIEIRA, R. F. **Frutas nativas do cerrado**: qualidade nutricional e sabor peculiar. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. Disponível em: <<http://www.ambientebrasil.com.br/composer.php3?base=/biotecnologia/index.html>>. Acesso em: 28 jun. 2010.

AHUJA, S. K.; FERREIRA, G. M.; MOREIRA, A. R. Production of an endoglucanase by the shipworm bacterium, *Teredinobacter turnirae*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 31, n. 2, p. 41-47, Jan. 2004.

AKKERMANS, A. D. L.; VAN ELSAS, J. D.; BRUIJN, F. J. de. **Molecular microbial ecology manual**. Dordrecht: Kluwer, 1995.

ALMEIDA, S. P. de Frutas nativas do Cerrado: caracterização físico-química e fonte potencial de nutrientes. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. (Ed.). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1998. p. 247-285.

AMARAL, F. M. M.; COUTINHO, D.; RIBEIRO, M. N. Controle de qualidade de frutos de *Luffa operculata* (L) Cogn: comercializados em mercados de São Luís/Maranhão, Brasil. **Revista do Hospital Universitário**, Maranhão, v. 2, n. 3, p. 9-13, 2001.

AMPE, F. et al. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. **Applied Environmental Microbiology**, New York, v. 65, n. 12, p. 5464-5473, Dec. 1999.

ANDREOTE, F. D. et al. Culture-independent assessment of *Alphaproteobacteria* related to order *Rhizobiales* and the diversity of cultivated *Methylobacterium* in the rhizosphere and rhizoplane of transgenic eucalyptus. **Microbial Ecology**, New York, v. 57, n. 1, p. 82-93, 2009.

ANDREWS, W. H.; HAMMACK, T. Bacteriological analytical manual. **Food and Drug Administration**, Silver Spring, 1972.

AQUINO, F. de G.; OLIVEIRA, M. C. de. Reserva legal no bioma cerrado: uso e preservação. **Embrapa Cerrados**, Planaltina, 2006. (Documentos, 158).

ARIFFIN, H. et al. Production of Bacterial Endoglucanase from Pretreated Oil Palm Empty Fruit Bunch by *Bacillus pumilus* EB3. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 106, n. 3, p. 231-236, Sept. 2008.

BACON, C. W.; HINTON, D. M. Bacterial endophytes: the endophytic niche, its occupants and its utility. In: GNANAMANICKAM, S. S. (Ed.). **Plant associated bacteria**. New Delhi: Springer, 2006. p. 155-194.

BADOSA, E. et al. Microbiological quality of fresh fruit and vegetable products in Catalonia (Spain) using normalized plate-counting methods and real time polymerase chain reaction (QPCR). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 88, n. 4, p. 605-611, Mar. 2008.

BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOLL. Bethesda: BLAST, 2012.
Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>>. Acesso em: 15 out. 2011.

BERNARDES, C. M.; SANTOS, M. A. População microbiana como indicadora de interferência de diferentes manejos de solos de cerrado com cultivo de soja. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 22, n. 2, p. 7-16, 2006.

BHAT, M. K.; Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, New York, v. 18, n. 5, p. 355-383, Aug. 2000.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia**: produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. cap. 10, p. 257.

BRADFORD, M. A. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 7, n. 72, p. 248-254, May 1976.

BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2. ed. New York: Springer, 2005.

BUSCHBACHER, R. **Expansão agrícola e perda da biodiversidade no cerrado**: origens históricas e o papel do comércio internacional. Brasília: WWF Brasil, 2000. (Série técnica, 7).

CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. **Bioresouce Technology**, Essex, v. 101, n. 13, p. 4754-4766, July 2010.

CARNEIRO, R. G. et al. Indicadores biológicos associados a o ciclo do fósforo em solos de Cerrado sob plantio direto e plantio convencional. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 7, p. 661-669, jul. 2004.

CARVALHO, V. G. **Comunidades de fungos em solos do Cerrado sob vegetação nativa e sob cultivo de soja e algodão**. 2008. 62 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CASTRO, A. P. et al. Diversity of soil fungal communities of Cerrado and its closely surrounding agriculture fields. **Archives of Microbiology**, Berlim, v. 190, n. 2, p. 129-139, 2008.

COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. **Tecnologia enzimática**: volume 1. Rio de Janeiro: EPUB, 2008.

COUTINHO, L. M. O conceito de bioma. **Acta Botanica Brasílica**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 13-23, jan./mar. 2006.

CHAND-GOYAL, T.; SPOTTS, R. A. Enumeration of bacterial and yeast colonists of apple fruits and identification of epiphytic yeasts on pear fruits in the Pacific Northwest United States. **Microbiological Research**, Jena, v. 151, n. 4, p. 427-432, Dec. 1996.

CHELIUS, M. K.; TRIPLETT, E. W. The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. **Microbial Ecology**, New York, v. 41, n. 3, p. 252-263, 2001.

DETMANN, K. S. C. et al. Comparação de métodos para observação de fungos micorrízicos arbusculares e endofíticos do tipo dark septate em espécies nativas de cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 32, n. 5, p. 1883-1890, set./out. 2008.

DEVEREUX, S. et al. **Improving the analysis of food Insecurity**: food insecurity measurement, livelihoods approaches and policy: applications in FIVIMS'. Africa: Development Reader, 2004.

DI CAGNO, R. et al. Taxonomic structure of the yeasts and lactic acid bacteria microbiota of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) and use of autochthonous starters for minimally processing. **Food Microbiology**, London, v. 27, n. 3, p. 381-389, May 2010.

DIAS, A. C. F. et al. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 25, n. 2, p. 189–195, 2009.

DRUMMOND, G. M. et al. **Biodiversidade em Minas Gerais: um atlas para sua conservação**. 2. ed. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 2005.

DRUMMOND, G. M. et al. **Biota Minas: diagnóstico do conhecimento sobre a biodiversidade no Estado de Minas Gerais: subsídio ao Programa Biota Minas**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 2009.

DRUMMOND, B. P. et al. Brazilian Vaccinia virus strains are genetically divergent and differ from the Lister vaccine strain. **Microbes and Infection**, Paris, v. 10, n. 2, p. 185-97, Feb. 2008.

DUARTE, W. Characterization of different fruit wines made from cacao, cupuassu, gabirola, jaboticaba and umbu. **Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 43, p. 1564-1572, 2010.

ECKERT, K.; SCHNEIDER, E. A thermoacidophilic endoglucanase (CelB) from *Alicyclobacillus acidocaldarius* displays high sequence similarity to arabinofuranosidases belonging to family 51 of glycoside hydrolases. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 270, n. 4, p. 3593–3602, Apr. 2003.

EDENBORN, S. L.; SEXSTONE, A. J. DGGE fingerprinting of culturable soil bacterial communities complements culture-independent analyses. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 39, n. 7, p. 1570–1579, July 2007.

EL SHEIKHA, A. F. et al. Study of the microbial discrimination of fruits by PCR-DGGE: application to the determination of the geographical origin of *Physalis* fruits from Colombia, Egypt, Uganda and Madagascar. **Food Control**, Guildford, v. 24, n. 1-2, p. 57- 63, Mar./Apr. 2012.

ENDO, A.; FUTAGAWA-ENDO, Y.; DICKS, L. M. T. Isolation and characterization of fructophilic lactic acid bacteria from fructose-rich niches. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 32, n. 8, p. 593–600, Dec. 2009.

ERCOLINI, D. et al. Changes in the spoilage-related microbiota of beef during refrigerated storage under different packaging conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 72, n. 7, p. 4663-4671, July 2006.

ERCOLINI, D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 56, n. 3, p. 297–314, Mar. 2004.

ERCOLINI, D.; HILL, P. J.; DODD, C. E. R. Bacterial community structure and location in Stilton cheese. **Applied Environmental Microbiology**, New York, v. 69, n. 6, p. 3540-3548, June 2003.

FAORO, H. **Determinação da biodiversidade de *Archaea* e Bactéria da Mata Atlântica paranaense**. 2006. 186 f. Dissertação (Mestrado de Ciências-Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Paraná.

FERREIRA, L. C.; JUNQUEIRA, R. G. Microbiological evaluation of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) preserves made from a typical Brazilian fruit. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 23, n. 8, p. 1179-1181, 2007.

FERRIS, M. J.; MUYZER, G.; WARD, D. M. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA- defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 62, n. 4, p. 340-346, Apr. 1997.

FODIL, D. et al. A thermostable humic acid peroxidase from *Streptomyces* sp. strain AH4: purification and biochemical characterization. **Bioresource Technology**, Essex, Feb. 2012.

FRUTAS nativas do Cerrado Brasileiro: aproveitamento alimentar. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002.

GAO, Z. et al. A novel salt-tolerant endo-1,4-glucanase Cel 5 A in *Vibrio* sp.G21 isolated from mangrove soil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 87, n. 4, p. 1373-1382, 2010.

GOMES, D. N. F. **Diversidade e potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados do manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco**. 2007. 94 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

GUIMARÃES, M. M.; SILVA, M. S. Valor nutricional e características químicas e físicas de frutos de murici-passa (*Byrsonima verbascifolia*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 4, p. 817-821, out./dez. 2008.

HAKAMADA, Y. et al. Enzymatic properties, crystallization, and deduced amino acid sequence of an alkaline endoglucanase from *Bacillus circulans*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1570, p.174–180, 2002.

HENRIQUES, R. P. B. O futuro ameaçado do Cerrado Brasileiro. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 125, p. 33-39, jul. 2003.

HERRANEN, M. et al. Isolation and characterization of folate-producing bacteria from oat bran and rye flakes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 142, n. 3, p. 277–285, Sept. 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Minas Gerais**: síntese. Rio de Janeiro: IBGE, 2007. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=mg>>. Acesso em: 13 out. 2010.

JUÁREZ-JIMÉNEZ, B. et al. Metabolic characterization of a strain (BM90) of *Delftia tsuruhatensis* showing highly diversified capacity to degrade low molecular weight phenols. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 21, n. 3, p. 475-489, 2010.

KASANA R. C. et al. A Rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. **Current Microbiology**, New York, v. 57, n. 5, p. 503-507, 2008.

KIM, B. K. et al. Purification and characterization of carboxymethylcellulase isolated from a marine bacterium, *Bacillus subtilis subsp. subtilis* A-53. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 44, n. 6-7, p. 411-416, June 2009.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservação do cerrado. **Megadiversidade**, Brasília, v. 1, n. 1, p. 148-151, jul. 2005.

KLINK, C. A.; MOREIRA, A. G. Past and current human occupation, and land use. In: OLIVEIRA, P. S.; MARQUIS, R. J. (Ed.). **The cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna**. New York: Columbia University, 2002. p. 69-88.

KORPOLE, S.; SHARMA, R.; VERMA, D. Characterization and phylogenetic diversity of carboxymethyl cellulase producing bacillus species from a landfill ecosystem. **Indian Journal of Microbiology**, Índia, v. 51, n. 4, p. 531-535, Oct. 2011.

KRIMM, U. et al. Epiphytic microorganisms on strawberry plants (*Fragaria ananassa* cv. Elsanta): identification of bacterial isolates and analysis of their interaction with leaf surfaces. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 53, n. 3, 483-492, Aug. 2005.

KUBICEK, C. P. et al. Triggering of cellulose biosynthesis by cellulose in *Trichoderma reesei*. Involvement of a constitutive, sophorose-inducible, glucose-inhibited beta-diglycoside permease. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 268, n. 26, 19364-19368, Sept. 1993.

KUMAR, A. et al. Xylanase production from an alkalophilic actinomycete isolate *Streptomyces sp.* RCK-2010, its characterization and application in saccharification of second generation biomass. **Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic**, Amsterdam, v. 74, n. 3-4, p. 170– 177, Feb. 2012.

LACHANCE, M.-A. et al. Biogeography of the yeasts of ephemeral flowers and their insects. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 35, n. 1, p. 1-8, Mar. 2001.

LEE Y.-J. et al. Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyoliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, n. 2, p. 378-386, Jan. 2008.

LEE, S. M.; KOO, Y. M. Pilot-scale production of cellulose using *Trichoderma reesei* Rut C-30 in fed-batch mode. **Journal of Microbiology Biotechnology**, Oxford, v. 11, p. 229-233, 2001.

LEVER, M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 47, n. 1, p. 273-79, May 1972.

LI, X. et al. Screening and identification of new isolate: thermostable *Escherichia coli* with novel thermoalkalotolerant cellulases. **Current Microbiology**, New York, v. 59, n. 4, p. 393–399, 2009.

LI, Y. et al. A novel thermoacidophilic endoglucanase, Ba-EGA, from a new cellulose-degrading bacterium, *Bacillus sp.* AC-1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 70, n. 4, p. 430–436, 2006.

LIMA, J. E. F. W.; SILVA, E. M. Estimativa da produção hídrica superficial do Cerrado brasileiro. In: SCARIOT, A.; SOUSA-SILVA, J.; FELFILI, J. M. (Org.). **Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005. p. 61-72.

LOPEZ, I. et al. Design and evaluation of PCR primers for analysis of bacterial populations in wine by denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied Environmental Microbiology**, New York, v. 69, n. 11, p. 6801-6807, Nov. 2003.

LUCAS, E. M. F. et al. Phthalates production from *Curvularia senegalensis* (Speg.) Subram, a fungal species associated to crops of commercial value. **Microbiological Research**, Jena, v. 163, n. 5, p. 495-502, Sept. 2008.

LYND, L. R. et al. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 66, n. 3, p. 506-577, Sept. 2002.

MACHADO, R. B. **A fragmentação do Cerrado e efeitos sobre a avifauna na região de Brasília-DF**. 2000. 163 f. Tese (Doutorado de Ecologia) - Universidade de Brasília, Brasília.

MACHADO, R. B. et al. **Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro**. Brasília: Conservation Internacional do Brasil, 2004.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de brock**. 12. ed. São Paulo: Prentice Hall, 2010.

MAGALHÃES, K. T. et al. *Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 26, n. 7, p. 1241–1250, 2010.

MAGNUSSON, J. K. et al. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 219, n. 1, p. 129–135, Jan. 2003.

MANO, H.; MORISAKI, H. Endophytic bacteria in the rice plant. **Microbes and Environments**, New York, v. 23, n. 2, p. 109–117, 2008.

MARINHO-FILHO, J. S.; RODRIGUEZ, F. H. G.; JUAREZ, K. M. The Cerrado mammals: diversity, ecology, and natural history. In: OLIVEIRA, P. S.; MARQUIS, R. J. (Ed.). **The Cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical Savanna**. New York: Columbia University, 2002. p. 266-284.

MAWADZA, C. et al. Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 83, n. 3, p. 177-187, Oct. 2000.

MCALEECE, N. et al. **Biodiversity professional statistics analysis software**. London: Scottish Association for Marine and Natural History Museum, 1997.

MEHNAZ, S.; BAIG, D. N.; LAZAROVITS, G. Genetic and phenotypic diversity of plant growth promoting rhizobacteria isolated from sugarcane plants growing in Pakistan. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 20, n. 12, p. 1614-1623, Dec. 2010.

MENDES, I. C. et al. **Biomassa C e atividade microbiana em solos de cerrado sob plantio direto e plantio convencional**. Planaltina: CNPAC, 1999.

MENDES, I. C. et al. Propriedades biológicas em agregados de um latossolo vermelho-escuro sob plantio convencional e direto no Cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 27, n. 3, p. 435-443, maio/jun. 2003.

MENDONÇA, R. C. et al. (Ed.). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: Embrapa, 1998.

MIGUEL, M. G. da C. et al. Diversity of bacteria present in milk kefir grains using culture-dependent and culture-independent methods. **Food Research International**, Barking, v. 43, n. 5, p. 1523-1528, June 2010.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros**. Brasília: MMA, 2002.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Biodiversidade Brasileira**. Brasília: MMA, 2002a.

MITTERMEIER, R. A. et al. **Hotspots revisited**: earth's biologically richest and most endangered ecoregions: conservação internacional/CI. Sierra Madre: Agrupación, 2005.

MONTEIRO, J. M. et al. Comparison of the bacterial community and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from different genotypes of *Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty (Vetiver) rhizospheres. **Journal of Microbiology**, Amsterdam, v. 4, n. 4, p. 363–370, Aug. 2009.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica dos solos**. 2. ed. Lavras: Editora UFLA, 2006.

MOTTA, P. E. F.; CURI, N.; FRANZMEIER, D. P. Relation of soils and geomorphic surfaces in the Brazilian Cerrado. In: OLIVEIRA, P. S.; MARQUIS, R. J. (Ed.). **The cerrados of Brazil**: ecology and natural history of a neotropical savanna. New York: Columbia University, 2002. p. 91-120.

MUYZER, G.; WAAL, E. C. de; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 59, n. 1, p. 695-700, Jan. 1993.

NADKARNI, A. et al. Functional characterization of the RAD51D E233G genetic variant. **Pharmacogenet Genomics**, Ohio, v. 19, n. 2, p. 153-160, Feb. 2009.

NANDAKUMAR, M. P. et al. Mechanism of solid particle degradation by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, London, v. 29, n. 7, p. 545-551, 1994.

NASCIMENTO, R. P. et al. Production and partial characterisation of xylanase from *Streptomyces sp* strain AMT3 isolated from Brazilian Cerrado soil. **Enzyme and Microbial Technology**, Amsterdam, v. 31, n. 4, p. 549-555, 2002.

NICOL, G. W.; GLOVER, L. A.; PROSSER, J. I. Spatial analysis of archaeal community structure in grassland soil. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 69, n. 12, p. 7420-7429, Dec. 2003.

NIELSEN, D. S. et al. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 114, n. 2, p. 168-186, Mar. 2007.

NISIOTOU, A. et al. Bacterial species associated with sound and Botrytis-infected grapes from a Greek vineyard. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 145, n. 2-3, p. 432-436, 2011.

NYANGA, L. K. et al. Yeasts and lactic acid bacteria microbiota from *masau* (*Ziziphus mauritiana*) fruits and their fermented fruit pulp in Zimbabwe. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 120, n. 1-2, p. 159-166, Nov. 2007.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; RATTER, J. A. Vegetation physiognomies and woody flora of the cerrado biome. In: OLIVEIRA, P. S.; MARQUIS, R. J. (Ed.). **The cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna**. New York: Columbia University, 2002. p. 91-120.

PARK, J. K. et al. Purification and characterization of a 1,3- β -d-glucanase from *Streptomyces torulosus* PCPOK-0324. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 87, p.1641- 1648, 2012.

PASSOS, X. S. et al. Atividade antifúngica de *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 6, p. 623-627, nov./dez. 2002.

PEREIRA, G. V. M. et al. A Multiphasic Approach for the Identification of Endophytic Bacterial in Strawberry Fruit and their Potential for Plant Growth Promotion. **Microbial Ecology**, New York, v. 63, n. 2, p. 405-417, 2011.

PEREZ, K. S. S.; RAMOS, M. L. G.; MCMANUS, C. Carbono da biomassa microbiana em solo cultivado com soja sob diferentes sistemas de manejo nos Cerrados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 5, p. 567-573, maio 2004.

PFENNING, L. H.; ABREU, L. M. Diversity of microfungi in Tropical soils. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAAD, L. (Ed.). **Soil biodiversity in Amazonian and other brazilian ecosystems**. New York: CABI Publishing, 2006. p. 184-205.

QUIRINO, B. F. et al. Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with soil of the savanna-like Cerrado vegetation. **Microbiological Research**, Jena, v. 164, n. 1, p. 59-70, Mar. 2009.

RANDAZZO, C. L. et al. Diversity, dynamics and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. **Applied Environmental Microbiology**, New York, v. 68, n. 4, p. 1882-1892, Apr. 2002.

RATNAM, B. V. V. et al. Optimization of medium constituents and fermentation conditions for the production of ethanol from palmyra jiggery using response surface methodology. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 21, n. 4, p. 399-404, 2005.

REATTO, A.; MARTINS, E. S. Classes de solo em relação aos controles da paisagem do bioma Cerrado. In: SCARIOT, A.; SOUSA-SILVA, J.; FELFILI, J. M. (Org.). **Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005. p. 47-57.

ROBOSON, L. M.; CHAMBLISS, G. H. Cellulases of bacterial origin. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 11, n. 10, p. 626-644, Oct. 1989.

ROCHA, C. et al. Elaboração e avaliação de iogurte sabor frutos do cerrado. **CEPPA**, Curitiba, v. 26, n. 2, p. 255-266, jul./dez. 2008.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais do domínio do cerrado na região do alto Rio Grande – Minas Gerais. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 1, p. 102-123, jan./fev. 2001.

ROSADO, A. S. et al. Genetic diversity of *nifH* sequences in *Paenibacillus azotofixans* strains and soil samples analysed by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR- amplified gene fragments. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 64, n. 2, p. 2770-2779, Feb. 1998.

ROSADO, A. S. et al. Molecular microbial ecology: a minireview. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 135-147, jan. 1997.

ROSADO, A. S.; DUARTE, G. F. Utilização de eletroforese em gel com gradiente de desnaturantes (DGGE) e gel com gradiente de temperatura (TGGE) para estudar diversidade microbiana. In: MELO, I. S. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramentos**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2002. p. 97-128.

ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 19, n. 8, p. 827-837, Aug. 2006.

SALLES, J. F.; VAN VEEN, J. A.; VAN ELSAS, J. D. Multivariate analyses of Burkholderia species in soil: effect of crop and land use history. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 70, n. 7, p. 4012–4020, July 2004.

SCHMIDELL, W. et al. (Coord.). **Biotecnologia industrial**: volume 2. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

SCHWAN, R. F.; CAMPOS, C. R.; DIAS, D. R. Diversidade de leveduras em ecossistemas brasileiros. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. Lavras: Ed. UFLA, 2008.

SEOW, J. et al. Microbiological quality of fresh vegetables and fruits sold in Singapore. **Food Control**, Guildford, v. 25, n. 1, p. 39-44, May 2012.

SHANMUGHAPRIYA, S. et al. Optimization, purification, and characterization of extracellular mesophilic alkaline cellulose from sponge-associated *Marinobacter* sp.MSI032. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 162, n. 3, p. 625-640, 2010.

SILVA M. R. et al. Caracterização química de frutos nativos do cerrado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 6, p. 46-53, set. 2008.

SILVA, C. F. et al. Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. **Food Microbiology**, London, v. 25, n. 8, p. 951-957, Dec. 2008a.

SILVA, D. B. et al. **Frutas do cerrado**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001.

SILVA, E. G. da et al. Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 5, n. 9, p. 859–865, June 2005.

SINGH, J.; BATRA, N.; SOBTI, R. C. Purification and characterisation of alkaline cellulase produced by a novel isolate, *Bacillus sphaericus* JS1. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 31, n. 2, p. 51–56, Jan. 2004.

SIQUEIRA, J. C. de. O Bioma Cerrado e a preservação de grupos taxonômicos: um olhar sobre as *Amaranthaceae*. **Pesquisa Botânica**, São Leopoldo, n. 58, p. 389-394, 2006.

SOARES, F. P. et al. Marolo: uma frutífera nativa do Cerrado. **Boletim Técnico**, Lavras, n. 82, p. 1-17, 2009.

STURZ, A. V. et al. Association of bacterial endophyte populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 44, p. 162–167, 1998.

SUN, L. et al. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. **Microbial Ecology**, New York, v. 55, n. 3, p. 415–424, 2007.

THOMAS, P. et al. Papaya shoot tip associated endophytic bacteria isolated from *in vitro* cultures and host–endophyte interaction *in vitro* and *in vivo*. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 53, n. 2, p. 380–390, Feb. 2007.

THOMAS, P.; SOLY, T. A. Endophytic bacteria associated with growing shoot tips of banana (*Musa* sp.) cv. Grand Naine and the Affinity of Endophytes to the Host. **Microbial Ecology**, New York, v. 58, n. 4, p. 952–964, 2009.

TOLAN, J. S. Effects of xylanase enzymes in pulp bleaching. **Abstracts of papers of the American Chemical Society**, Amsterdam, v. 223, p. 125-136, 2002.

TOTH, I. K. et al. Soft rot *Erwinia*: from genes to genomes. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 4, n. 1, p. 17-30, Jan. 2003.

TRINDADE, R. C. *Candida sergipensis*, a new asexual yeast species isolated from frozen pulps of tropical fruits. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 86, n. 1, p. 27-32, 2004.

TRINDADE, R. C. et al. Yeasts associated with fresh and frozen pulps of brazilian tropical fruits. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 25, n. 2, p. 294-300, Aug. 2002.

TRIVEDI, N. et al. Analkali-halotolerant cellulose from *Bacillus flexus* isolated from green seaweed *Ulva lactuca*. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 83, n. 2, p. 891-897, Jan. 2010.

TRIVEDI, P.; SPANN, T.; WANG, N. Isolation and characterization of beneficial bacteria associated with citrus roots in Florida. **Microbial Ecology**, New York, v. 62, n. 2, p. 324–336, 2011.

ULRICH, K. et al. Diversity of endophytic bacterial communities in poplar grown under field conditions. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 63, n. 2, p. 169–180, Feb. 2008.

VILELA, D. M. et al. Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). **Food Microbiology**, London, v. 27, n. 8, p. 1128-1135, Dec. 2010.

VISWANATHAN, P.; KAUR, R. Prevalence and growth of pathogens on salad vegetables, fruits and sprouts. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, Jena, v. 203, n. 3, p. 205-213, 2001.

WALTER, B. M. **Fitofisionomias do bioma Cerrado: síntese terminológica e relações florísticas**. 2006. 373 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Brasília, Departamento de Ecologia do Instituto de Ciências Biológicas, Brasília.

WANG, W. D. et al. Biodiversity of mesophilic microbial community BYND-8 capability of lignocellulose degradation and its effect on biogas production. **Huan Jing Ke Xue**, China, v. 32, p. 253-258, 2011.

WEINERT, N. et al. Bacterial diversity on the surface of potato tubers in soil and the influence of the plant genotype. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 74, n. 1, p. 114-123, Oct. 2010.

WHANG, W.; WANG, P.; HU, R. A Novel Screening Method of Cellulase Producing Bacteria Based on *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 47, n. 1, p. 49–52, Jan. 2011.

WIRTH, S.; ULRICH, A. Cellulose degrading potentials and phylogenetic classification of carboxymethyl-cellulose decomposing bacteria isolated from soil. **Systematic and Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 25, n. 4, p. 584–591, Apr. 2002.

YANG, H. et al. Selection and characteristics of a switchgrass-colonizing microbial community to produce extracellular cellulases and xylanases. **Bioresource Technology**, Essex, v. 102, n. 3, p. 3546–3550, Feb. 2011.