**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Identificação e controle de microrganismos contaminantes no processo de
micropropagação de cana-de-açúcar**

Cristiane Poletti Toledo

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2011**

Cristiane Poletti Toledo
Bacharelado e Licenciatura Plena em Ciências Biológicas

**Identificação e controle de microrganismos contaminantes no processo de
micropropagação de cana-de-açúcar**

Orientador:
Prof. Dr. FERNANDO DINI ANDREOTE

Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestre em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2011

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Toledo, Cristiane Poletti

Identificação e controle de microrganismos contaminantes no processo de micropropagação de cana-de-açúcar / Cristiane Poletti Toledo. - - Piracicaba, 2011.

71 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Antibióticos 2. Bactérias 3. Cana-de-açúcar 4. Microrganismos endofíticos
5. Micropropagação vegetal I. Título

CDD 633.61
T649i

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus pais, Messias e Maria

Inês e a minha avó Linda

Baraldi Poletti, pelo incentivo,

amor, carinho e dedicação.

DEDICO

*Ao meu namorado Felipe Mani, a
minha irmã Tatiane e ao meu cunhado*

*Ricardo, por me apoiarem e me
distráírem nos momentos difíceis.*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde, paz, harmonia e todas as conquistas alcançadas.

Aos meus pais, Maria Inês Poletti Toledo e Messias Aparecido Toledo, pelo amor, carinho e pelo apoio incondicional.

A minha irmã, Tatiane Poletti Toledo Mofato e ao meu cunhado, Ricardo Cortez Mofato, por sempre acreditarem em mim e me fazerem uma pessoa melhor.

A minha avó, Linda Baraldi Poletti, por cuidar tão bem de mim durante todos esses anos.

Ao meu noivo, Felipe Milaré, pela imensa compreensão em tantos momentos difíceis, pelo amor, carinho e companheirismo.

Ao co-orientador, Walter Maccheroni, por ter idealizado o trabalho e concedido a mim a oportunidade de realizá-lo, pelo conhecimento e orientação.

Ao Prof. Dr. Fernando Dini Andreote, meu orientador, pela confiança, conhecimento, amizade e por me orientar tão bem durante a minha pós-graduação.

As amigas Fernanda, Mariana, Juliana e Vivian, por toda a ajuda que foi fundamental para concretizar este trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcílio de Almeida e a Cristina Vieira de Almeida, por terem me mostrado diferentes visões sobre endofíticos em plantas micropropagadas e por terem ministrado aulas com rico conteúdo.

Ao grande amigo, Carlos Ivan Aguilar Vildoso, meu primeiro orientador, fonte de muito conhecimento, por ter me incentivado e me ajudado durante todos esses anos.

As minhas amigas-irmãs, Tatiane, Cláudia, Ágatha, Marcela, Fernanda, Carla e Liliane, por estarem junto comigo em todos os momentos de alegria e principalmente em todos os momentos difíceis e esse é o significado de amizade incondicional.

A todos os outros amigos e familiares que estiveram por perto e de alguma maneira participaram da realização desse sonho.

"A arte de viver consiste em tirar o maior bem do maior mal."

Machado de Assis

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS	17
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 Cana-de-açúcar.....	21
2.2 Cultura de tecidos vegetais	24
2.3 Endofíticos.....	27
2.4 Endofíticos em plantas micropropagadas	30
2.5 Antibióticos	32
2.6 Metodologias para antibiograma	35
3 MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1 Material vegetal e cultivo <i>in vitro</i>	38
3.2 Isolamento dos contaminantes.....	38
3.3 Extração de DNA.....	39
3.4 Amplificação da região do 16S	40
3.5 Identificação por comparação de sequências.....	40
3.6 Determinação do efeito da autoclavagem sobre a atividade dos antibióticos	41
3.7 Antibiograma	45
3.8 Antibioticoterapia	47
4 RESULTADOS	48
4.1 Obtenção da coleção de isolados	48
4.2 Identificação por comparação de sequências.....	48
4.3 Determinação do efeito da autoclavagem sobre a atividade dos antibióticos	50
4.4 Antibiograma	52
4.5 Antibioticoterapia	55
5 DISCUSSÃO	58
REFERÊNCIAS	63

RESUMO

Identificação e controle de microrganismos contaminantes no processo de micropropagação de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) chegou ao Brasil com a implementação das primeiras capitâneas. Hoje ela é cultivada em praticamente todos os estados brasileiros, sendo processada para a produção de açúcar e álcool combustível. Para suprir este mercado crescente com plantas de alta qualidade é necessária a utilização da técnica de cultura de tecidos aplicada à micropropagação *in vitro* para produzir mudas livres de doenças e em larga escala. Porém a contaminação microbiana é um fator determinante no sucesso da produção de plantas micropropagadas, sendo responsável por grandes perdas no processo. Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como principal objetivo encontrar antibióticos capazes de reduzir as perdas por contaminação bacteriana no processo produtivo de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar sem afetar o desenvolvimento vegetal. Para tanto, foram realizados o isolamento e identificação dos contaminantes bacterianos presentes no material micropropagado, a seleção dos principais antibióticos capazes de inibir o crescimento destes contaminantes e posteriormente um processo de antibioticoterapia foi estabelecido. Os resultados obtidos através da identificação evidenciaram que a maioria dos contaminantes bacterianos é composta por microrganismos endofíticos, sendo o gênero *Gluconacetobacter* o contaminante encontrado com mais frequência. Os resultados dos testes de suscetibilidade mostraram que nenhum antibiótico é 100% eficaz no controle geral do crescimento bacteriano, porém o antibiótico rifampicina se mostrou mais eficiente quando usado na concentração mínima de 50 µg/mL e quando realizada a antibioticoterapia não afetou o crescimento das plantas micropropagadas.

Palavras-chave: Antibióticos; Bactérias; Cana-de-açúcar; Endofíticos; Micropropagação

ABSTRACT

Identification and control of microorganisms contaminants in sugarcane micropropagation process

Sugarcane (*Saccharum* sp.) arrived in Brazil with the first captaincy implementation. Nowadays, it is cultivated in almost all Brazilian states, processed to produce sugar and alcohol as fuel. In order to supply this growing market with high quality plants, it is necessary to use the technique of tissue culture applied to *in vitro* micropropagation to produce seedlings free of disease in large scale. But the microbial contamination is a determinant factor for the success of micropropagated plants production; it is responsible for great losses in the process. Within this context, the present work aimed to find antibiotics that can reduce losses by bacterial contamination in the production process of sugarcane micropropagated plants without affecting its development. Therefore, we have performed the isolation and identification of bacterial contaminants present in micropropagated material, the selection of the main antibiotics capable of inhibiting the growth of these contaminants and then a process of antibiotic therapy was established. The results obtained through the identification evidenced that most of the bacteria contaminants is composed of endophytic microorganisms, and the genus *Gluconacetobacter* was the contaminant found more often. The results of susceptibility tests showed that no antibiotic is 100% effective in the general control of bacterial growth, but the antibiotic rifampicin was more efficient when used at the minimum concentration of 50 µg/mL and when performed with antibiotic therapy did not affect the growth of micropropagated plants.

Keywords: Antibiotics; Bacteria; Sugarcane; Endophytics; Micropropagation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Distribuição global da cana-de-açúcar.....	22
Figura 2 -	Mapa da produção de cana-de-açúcar no Brasil.....	23
Figura 3 -	Primeira etapa do processo de micropropagação de cana-de-açúcar.....	26
Figura 4 -	Segunda etapa do processo de micropropagação de cana-de-açúcar.....	26
Figura 5 -	Terceira etapa do processo de micropropagação de cana-de-açúcar.....	27
Figura 6 -	Tubos e frasco contendo microplantas de cana-de-açúcar sem contaminação....	39
Figura 7 -	Tubo e frasco contendo microplantas de cana-de-açúcar com contaminantes bacterianos.....	39
Figura 8 -	Esquema ilustrativo das diluições para concentração final de 100, 10 e 1 µg/mL dos antibióticos.....	42
Figura 9 -	Esquema ilustrativo das diluições para concentração final de 50, 5 e 0,5 µg/mL dos antibióticos.....	43
Figura 10 -	Esquema ilustrativo das diluições para concentração final de 25 e 2,5 µg/mL dos antibióticos.....	44
Figura 11 -	Esquema ilustrativo dos tubos com inoculo + antibiótico + meio de cultura LB.....	44
Figura 12 -	Placa de Petri com meio de cultura LB sem antibiótico com crescimento de todas as colônias bacterianas.....	46
Figura 13 -	Porcentagem dos gêneros de bactérias coletadas em cada etapa do processo de micropropagação de cana-de-açúcar, determinados pelo sequenciamento parcial do gene 16S.....	50
Figura 14 -	Crescimento dos isolados bacterianos obtidos em cada etapa do processo de micropropagação de cana-de-açúcar em meio de cultura MS frente ao controle e aos antibióticos após 48 h de incubação.....	54
Figura 15 -	Porcentagem de isolados bacterianos resistentes aos antibióticos adicionados ao meio de cultura MS antes da autoclavagem após 48 h de incubação. Agr – agrimicina; Tet – tetraciclina; Cla 1 – clavulin 50µg/mL; Cla 2 - clavulin 250µg/mL; Cip – ciprofloxacina; Gen – gentamicina; Lev – levofloxacina; Rif – rifampicina.....	55

Figura 16 - Porcentagem de frascos descartados por contaminação bacteriana para cada clone de cana-de-açúcar avaliado durante o processo de micropropagação.....	56
Figura 17 - Número de frascos obtidos para cada clone de cana-de-açúcar nas etapas da micropropagação sem antibiótico e com o antibiótico rifampicina na concentração de 50 µg/mL.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Taxonomia de isolados bacterianos, contaminantes do processo de micropropagação de cana-de-açúcar, determinada pelo seqüenciamento parcial do gene 16S RNAr.....	49
Tabela 2 -	Valores da leitura da absorbância em 600nm de tubos após 16 horas de inoculação em meio de cultura LB com a bactéria <i>Escherichia coli</i> DH5 α , e contendo diferentes concentrações dos antibióticos filtrados ou autoclavados.....	52

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* sp), típica de climas tropicais e subtropicais, é uma planta perene, de grande porte, que forma rizomas e touceiras. Esta planta tem grande importância no atual cenário econômico do Brasil, sendo a principal matéria-prima para a fabricação de açúcar e do álcool etílico, principal alternativa energética no mundo ao petróleo. A sua produção no Brasil ocupa cerca de 8,2 milhões de hectares e está centralizada nas regiões Sudeste, Sul, Centro-Oeste e Nordeste, sendo o estado de São Paulo o maior produtor, com área de 4,4 milhões de hectares. Na safra 2009/2010 o processamento da cana-de-açúcar foi de aproximadamente 600 milhões de toneladas e a expectativa para a safra de 2010/11 é de 651,51 milhões de toneladas, um aumento de 7,8% em relação à safra anterior.

Devido à grande importância da cana-de-açúcar é necessário controlar ou até mesmo erradicar alguns microrganismos patogênicos que possam provocar doenças, ameaçando a produção e resultando na redução da biomassa e de seus subprodutos. Com o processo de propagação vegetativa por meio de colmos, método utilizado na maioria dos canaviais, são propagados conjuntamente os microrganismos sistêmicos que provocam doenças na cana-de-açúcar. Como alternativa a este processo podemos utilizar a propagação vegetativa *in vitro*, buscando a produção de mudas com alta qualidade.

A propagação vegetativa *in vitro*, também denominada de micropropagação, é a aplicação mais prática da cultura de tecidos e aquela de maior impacto. A aplicação da micropropagação na produção de cana-de-açúcar além de atuar na melhoria da qualidade do produto possibilitando a propagação de plantas isentas de viroses e outras doenças, atua na manutenção das características da planta matriz e na otimização da produtividade proporcionando a multiplicação rápida e em grande escala das mudas. Entretanto, a contaminação microbiana é uma das maiores dificuldades enfrentadas durante este processo, podendo comprometer a produção em até 100%.

Dessa forma, este trabalho buscou a identificação e posterior controle químico dos contaminantes microbianos presentes ao longo do processo de micropropagação de cana-de-açúcar.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cana-de-açúcar

De acordo com a classificação taxonômica (CRONQUIST, 1981), a cana-de-açúcar pertence à tribo Andropogonae da família Poaceae, ordem Cyperales, classe Liliopsida, divisão Magnoliophyta. A subtribo é Saccharininae e o gênero é *Saccharum* (SCARPARI et al., 2008), nome derivado de "sarkara = açúcar branco" em sânscrito, um lembrete de que a planta é proveniente da região do Mediterrâneo, Índia (SUGARCANECROPS, 2010). É uma planta perene e própria de climas tropicais e subtropicais. Várias espécies pertencem ao gênero *Saccharum*: *S. officinarum* L., *S. spontaneum* L., *S. robustum*, *S. sinense* R. e *S. barberi* J. Pesquisadores asseguram que *S. sinense* e *S. barberi* são originárias de cruzamentos entre *S. officinarum* e *S. spontaneum*. No entanto, as variedades comercialmente cultivadas atualmente são híbridas de várias espécies (CLAYTON; DANIELS, 1975). Nesses híbridos, procura-se reunir as qualidades de riqueza em açúcar das variedades nobres de *S. officinarum* à resistência a moléstias e rusticidade de outras espécies (AGUIRRE JUNIOR, 1936; DANIELS, 1975).

A cana-de-açúcar se desenvolve em forma de touceira. A parte aérea é formada por colmos (caule típico de gramíneas), folhas, inflorescências (conjunto de flores arranjadas em uma haste) e frutos; e a subterrânea por raízes e rizomas (caules subterrâneos, espessados, ricos em reservas, providos de nós e entrenós e de crescimento horizontal) (MOZAMBANI et al., 2006).

Esta foi uma das primeiras culturas introduzidas no Brasil, sendo cultivada há mais de quatro séculos no litoral do Nordeste. Recentemente, através da produção do álcool etílico, essa cultura disseminou-se por quase todos os estados brasileiros, estabelecendo-se nos mais diferentes tipos de solos (EMBRAPA, 2010).

A cana-de-açúcar é cultivada em áreas localizadas entre as coordenadas 36,7° de latitude norte e 31,0° sul do equador, que se estende desde a zona tropical até a subtropical. O mapa abaixo mostra a distribuição de cana-de-açúcar do mundo (SUGARCANECROPS, 2010) (Figura 1).

Figura 1 - Distribuição global da cana-de-açúcar (www.sugarcanecrops.com)

A cana-de-açúcar é a principal matéria-prima para a fabricação de açúcar, onde responde por 75% da produção mundial, sendo o restante da produção oriunda da beterraba (MING et al., 2006). Da fermentação do açúcar pode-se obter o álcool etílico, principal alternativa energética no mundo ao petróleo, especialmente devido ao agravamento da degradação ambiental pelo homem, dos perigos iminentes do aquecimento global e dos preços instáveis e elevados do petróleo (ORTOLAN, 2006). Outro subproduto importante é a co-geração de energia elétrica a partir da queima do bagaço (SCARAMUCCI et al., 2006).

Neste contexto, a cana-de-açúcar é a segunda maior fonte de energia renovável do Brasil, com 12,6% de participação na matriz energética atual de nosso país. Apesar de todo o potencial para a co-geração, a produção de energia elétrica é apenas uma das alternativas para o uso do bagaço, sendo crescente o número de pesquisas que buscam transformá-lo em álcool (hidrólise lignocelulósica), biodiesel e como recurso para o seu melhor aproveitamento pela indústria moveleira e para a fabricação de ração animal (BIODIESELBR, 2010).

A área destinada ao setor sucroalcooleiro no Brasil chega a 8,2 milhões de hectares, o que representa cerca de 0,95% do território nacional, sendo as regiões de cultivo o Sudeste, Sul, Centro-Oeste e Nordeste (Figura 2). O estado de São Paulo possui a maior parte desta área, com 4,4 milhões de hectares, seguido de Minas Gerais (706 mil ha), Paraná (613,7 mil ha), Goiás (599,3 mil ha) e Alagoas (438,6 mil ha) (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2010).

Figura 2 - Mapa da produção de cana-de-açúcar no Brasil (www.unica.com.br)

A previsão do montante de cana que será moída na safra 2010/11 é de 651,51 milhões de toneladas, com incremento de 7,8% em relação à safra 2009/10. Na próxima safra, a produção de açúcar deve ser 15,35% maior do que o resultado obtido no ano anterior e deverá chegar a 38,15 milhões de toneladas do produto. A produção total de álcool deverá ter um crescimento de 10,3%, com um total de 28,41 bilhões de litros. (CONAB, 2010).

No entanto, mesmo nesta crescente, a produção de cana-de-açúcar brasileira pode enfrentar dificuldades para atender a demanda crescente de etanol. A procura pelo produto no mercado interno está em expansão, principalmente devido ao aumento da frota de veículos bicompostíveis, onde há o incremento de cerca de três milhões de novas unidades a cada ano. (CORREIO BRAZILIENSE, 2010).

A severidade de algumas doenças é outro fator que ameaça a produção de cana-de-açúcar, resultando na redução de biomassa e de seus subprodutos. No Brasil foram diagnosticadas 40 doenças, das 177 relacionadas ao cultivo de cana-de-açúcar no mundo, provocadas por fungos, bactérias e vírus (SANGUINO, 1998). No Brasil, são consideradas nove doenças mais importantes para a cultura da cana-de-açúcar, sendo elas: Carvão (*Sporosorium scitamineum*), Raquitismo da Soqueira (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*), Escaldadura (*Xanthomonas albilineans*), Mosaico (vírus do mosaico), Ferrugem Marrom (*Puccinia melanocephala*), Ferrugem Alaranjada (*Puccinia kuehnii*), Estrias Vermelhas (*Acidovorax avenae*), Podridão Vermelha (*Colletotrichum*

falcatum) e a Podridão do Abacaxi (*Ceratocystis paradoxa*). Estas doenças são controladas a campo principalmente por meio do melhoramento genético de variedades (CANAVIALIS, 2010).

Devido à grande importância da cana-de-açúcar, fatores que podem gerar aumento na sua produção ou diminuição em seu custo são importantes. Dentre esses fatores podemos considerar: a) Controle ou erradicação de microrganismos que possam provocar doenças, onde surge a importância da limpeza clonal através da micropropagação; b) Programas de melhoramento genético de espécies cultivadas, visando à introdução de características de interesse agrônomo, como resistência a pragas e patógenos, tolerância a herbicidas e aumento no teor de sacarose.

2.2 Cultura de tecidos vegetais

A cultura de tecidos vegetais compreende a regeneração de plantas a partir de células isoladas não diferenciadas, ou a partir de órgãos e tecidos vegetais, em ambiente artificial, sob condições controladas (temperatura, fotoperíodo, irradiância e umidade) e assépticas. Tais células, quando colocadas em um meio de cultura apropriado podem dividir-se indefinidamente ou diferenciar-se, o que irá propiciar a regeneração de parte da planta ou a planta inteira, sendo desta forma produzidos milhares de indivíduos clonais a partir de uma ou algumas células (RAMALHO et al., 2000).

As técnicas de cultura de tecidos podem oferecer novas alternativas aos programas de melhoramento genético, dentre as quais se destacam a conservação de germoplasma *in vitro*, a obtenção de transformantes via engenharia genética, a limpeza clonal (FERREIRA et al., 1998) e a rápida multiplicação de novas variedades através da micropropagação.

Micropropagação é o conjunto de técnicas de propagação vegetativa *in vitro*, utilizando propágulos de pequeno tamanho. É uma das principais aplicações da cultura de tecidos e seu uso tem aumentado devido às vantagens apresentadas, como manutenção das características da planta matriz, possibilitando a propagação de plantas isentas de viroses e outras doenças, permitindo uma produção intensiva de mudas sadias em curto período de tempo e com uma necessidade mínima de espaço (PASQUAL et al., 2001). Além disso, este tipo de propagação mantém a identidade genética do genótipo propagado, não introduzindo nenhuma variabilidade genética aos seus descendentes (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Em programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar a falta de procedimentos de multiplicação é um problema sério. Normalmente são necessários de 10 a 15 anos de trabalho

para completar um ciclo de seleção e mais alguns anos para se estabelecer as novas cultivares em plantios comerciais, devido à demanda por plantas. O tempo gasto para essa multiplicação, através da propagação vegetativa por meio de colmos, é considerado um problema econômico, principalmente tendo em vista o maior rendimento que seria obtido pelo plantio se a nova variedade fosse plantada antes em escala comercial. Além disso, também é possível que a nova variedade entre antecipadamente em seu ciclo degenerativo, devido à contaminação continuada por doenças sistêmicas que muitas vezes acontece durante a fase de multiplicação em campo aberto (LEE, 1987). A micropropagação surge neste contexto, como uma alternativa ao processo convencional de propagação vegetativa por meio de colmos. Altas taxas de multiplicação de cana-de-açúcar podem ser alcançadas por esse método, com inúmeras vantagens em relação à multiplicação em campo (MALHOTRA, 1995), reduzindo o tempo necessário para a produção de mudas de boa qualidade e livres de doenças (LEE, 1984).

Podemos dividir o processo de micropropagação de mudas de cana-de-açúcar em 3 etapas principais. A primeira etapa (Figura 3) é constituída do preparo do explante, que necessita ser um material limpo. Essa etapa começa no jardim de matrizes, onde as plantas são indexadas para as principais doenças de cana-de-açúcar e depois são cultivadas. Os colmos selecionados das matrizes são coletados e cortados em minitoletes. Os minitoletes são tratados termicamente, plantados e acondicionados numa estrutura denominada UTI (Unidade de Termoterapia Intensiva) à 35°C para o brotamento rápido das gemas. As brotações são retiradas dos minitoletes, cortadas (explantes) e desinfetadas. Na segunda etapa (Figura 4) é realizada a extração do ápice caulinar proveniente do explante. Esse ápice caulinar é colocado em meio de cultura para propiciar seu desenvolvimento. Após o desenvolvimento do ápice, quando as plantas já formaram touceiras, ocorre a multiplicação, processo que se desenvolve por um tempo, durante diversas fases de subcultivo, sendo que o número de plantas obtidas rege a realização da etapa posterior, o enraizamento. Nesta etapa ocorre a maior perda do processo devido à contaminação microbiana do material vegetal. Na terceira etapa (Figura 5) o material vegetal enraizado *in vitro* é individualizado, plantado e aclimatizado em estufa protegida. Após a aclimatização, o material é encaminhado para uma estufa de rustificação onde permanecerá até ser transportado e plantado no campo.

Figura 3 – Primeira etapa do processo de micropropagação de cana-de-açúcar

Figura 4 - Segunda etapa do processo de micropropagação de cana-de-açúcar

Figura 5 - Terceira etapa do processo de micropropagação de cana-de-açúcar

A cultura de tecidos vegetais é realizada com rigorosa assepsia, principalmente devido ao fato de que, uma parte dos microrganismos, ao entrar em contato com o meio de cultura, encontrará as condições necessárias para se desenvolver, inviabilizando a cultura. O alto grau de contaminação e a localização sistêmica de microrganismos são responsáveis, em alguns casos, pelo insucesso da implantação de culturas *in vitro*. Existem três fontes básicas de contaminação por microrganismos; o meio de cultura, o explante e o ambiente (PASQUAL, 2001).

Na maioria das vezes, essa contaminação é proveniente de bactérias endofíticas. Contudo, mesmo que essas contaminações não sejam desejáveis, quando a bactéria é identificada como não patogênica o cultivo associado é uma opção (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

2.3 Endofíticos

O termo Endófito (Endophyte) é de origem Grega, onde ‘endon’ significa ‘de dentro’ e ‘phyte’ significa ‘planta’ (CARROLL, 1998). Uma possível definição para estes organismos diz que estes são microrganismos, em pelo menos uma fase do seu ciclo de vida, habitam o interior das plantas, sendo encontrados em órgãos e tecidos vegetais como ramos, folhas e raízes sem produzirem estruturas externas visíveis e sem ocasionar doenças, ou seja, sem causar qualquer

dano aparente aos seus hospedeiros. Estes organismos podem ser denominados endófitos facultativos ou verdadeiros conforme o grau de interação dos mesmos com as plantas hospedeiras (AZEVEDO et al., 2000; AZEVEDO, 2002; HARDOIM et al., 2008). A presença de endófitos foi constatada em todas as espécies vegetais avaliadas (ARAÚJO et al., 2002), dentre as quais destacam-se inúmeras espécies vegetais de interesse econômico, como a cana-de-açúcar (BODDEY et al., 1991). As interações que os endófitos podem desenvolver com as plantas podem ser classificadas como simbiose, mutualismo, comensalismo ou trofobiose (RYAN et al., 2008). Trofobiose quer dizer que todo e qualquer ser vivo só sobrevive se houver alimento adequado à disposição dele. A palavra *‘trofo’* quer dizer *‘alimento’* e *‘biose’* quer dizer *‘existência de vida’* (CHABOUSSOU, 1999).

A comunidade endofítica, constituída principalmente por fungos e bactérias (PEIXOTO NETO et al., 2003), apresenta um importante papel no desenvolvimento da planta hospedeira, por isso o estudo dessa comunidade tem aumentado substancialmente (ARAÚJO et al., 2002). Devido à íntima associação entre os endófitos e espécies vegetais, tem sido sugerido que estes microrganismos co-evoluíram com os seus hospedeiros (MISAGHI; DONNDELINGER, 1990), podendo hoje, ser por vezes parte fundamental do ecossistema planta. Os endofíticos distinguem-se dos organismos patogênicos, que causam doenças nas plantas, e dos epifíticos, que vivem na superfície dos vegetais. No entanto, vale lembrar que estas distinções são apenas de natureza didática, pois um endofítico pode tornar-se um patógeno dependendo das variações nas condições do ambiente ou equilíbrio com outros endofíticos; e um microrganismo epifítico pode penetrar em uma planta e lá permanecer por determinado período, tornando-se assim endofítico (AZEVEDO, 1999).

Os microrganismos endofíticos entram na planta hospedeira principalmente pelo sistema radicular, mas também podem entrar pela parte aérea das plantas, como as flores e caules, ou pelo cotilédone. Ainda, pode-se considerar uma das formas de entrada a inoculação por vetores, de maneira similar como ocorre com patógenos. A transmissão dos endófitos tem como principal mecanismo a transferência via semente ou por propagação vegetativa das plantas, mas outros mecanismos também podem ser importantes, como a dispersão pelo vento, implementos agrícolas, insetos ou partes mortas das plantas (BALDANI, 1997). Uma vez dentro das plantas, os endófitos podem se localizar em local próximo ao ponto de entrada ou disseminar-se de forma

sistêmica (HALLMANN et al., 1997; ZINNIEL et al., 2002), ocupando espaços intercelulares, intracelulares e interior de tecidos vasculares das plantas.

O potencial dos endófitos para o controle biológico de pragas e doenças, e para a promoção do crescimento da planta hospedeira é relatado em diversos trabalhos (ARAÚJO et al., 2002; PEIXOTO NETO et al., 2003; AZEVEDO, 1998; SILVA et al., 2006, 2008; BENCHIMOL et al., 2000). Algumas espécies de microrganismos endofíticos são produtoras de compostos de interesse, como fármacos (antitumorais e antibióticos), toxinas e enzimas, o que pode levar ao controle biológico de doenças bacterianas, fúngicas ou causadas por nematóides em plantas, além de demonstrarem a capacidade de controlar alguns insetos-pragas (ARAÚJO, 2002). Em relação à promoção do crescimento vegetal, temos que um endófito pode atuar sobre a planta por meio de mecanismos diretos (fixação de nitrogênio e/ou produção de fitohormônios), ou por mecanismos indiretos (antagonismo contra patógenos ou resistência a drogas) (PEIXOTO NETO et al., 2003).

Dentre as funções atribuídas aos microrganismos promotores do crescimento vegetal, pode-se considerar que as bactérias endofíticas podem suprir a planta nutricionalmente por meio da fixação biológica do nitrogênio (RYAN et al., 2008), auxiliar o desenvolvimento vegetal devido a produção de hormônios vegetais ou de substâncias análogas (ARSHAD; FRANKENBERGER, 1991), ou atuarem como agentes de controle biológico de fitopatógenos ou pragas, seja pelo antagonismo direto ou pela indução de resistência sistêmica (HALLMANN et al., 1997). Competição por colonização também é um importante mecanismo pelo qual as bactérias protegem as plantas contra fitopatógenos (DUFFY, 2001). Considerando a cana-de-açúcar, sabe-se que esta planta está associada a bactérias fixadoras de nitrogênio, dentre as quais se destacam a *Gluconacetobacter diazotrophicus* (CAVALCANTE; DÖBEREINER, 1988), *Herbaspirillum seropedicaea* (BALDANI et al., 1996; GILLIS et al., 1991) e *Acetobacter diazotrophicus* (GILLIS et al., 1989).

Esta capacidade dos endófitos em produzirem compostos de interesse para a planta hospedeira é considerada por alguns autores como o resultado da íntima co-evolução existente entre endófitos e plantas. É muito explorado neste contexto o fato de que certos fungos endofíticos produzem compostos igualmente produzidos pelas plantas hospedeiras, como algumas enzimas (celulases e ligninases) encontradas em *Xylaria* sp., alguns fatores de crescimento vegetal como a giberelina, descrita em *Fusarium moniliforme*, substâncias antitumorais como o taxol, encontrada em *Taxomyces andreanae*, entre outros. Tudo parece

indicar uma transferência de genes entre plantas e fungos possam ocorrer, em uma verdadeira engenharia genética feita totalmente *in vivo* (AZEVEDO, 1998). No entanto, pouco foi comprovado em relação a isto no que diz respeito à comunidade de bactérias endofíticas.

Numa potencialidade adicional do uso de endófitos, estes podem servir como vetores para introdução de genes em plantas hospedeiras (PEIXOTO NETO et al., 2003). A possibilidade destes organismos manterem os genes inseridos em plasmídios, e a partir disso alterarem a comunidade microbiana associada a planta já foi demonstrada (ANDREOTE et al., 2004).

2.4 Endofíticos em plantas micropropagadas

Os efeitos dos microrganismos endofíticos são pouco conhecidos em plantas mantidas sob condições *in vitro*, porém a presença deles é uma das mais importantes causas de perda de material vegetal, onde atuam como contaminantes do processo. Os endófitos mais frequentemente isolados em laboratórios de micropropagação como contaminantes são fungos filamentosos, leveduras e bactérias (LEGGATT et al., 1988; LEIFERT; WOODWARD, 1998). Quando os endofíticos deixam o tecido das plantas e passam a colonizar o meio de cultura eles são responsáveis pela maior parte da perda dos materiais micropropagados. No entanto, é importante destacar que as bactérias endofíticas são prejudiciais apenas neste momento, sendo que dentro das plantas, ainda é pouco conhecido o papel destes organismos, e nada se sabe de como estas podem interferir ou mesmo determinar o sucesso na micropropagação do material.

Comparando o desenvolvimento dos microrganismos endofíticos, que tornam-se contaminantes, temos que fungos filamentosos e leveduras formam colônias facilmente em meios de cultivo sólidos, podendo ser assim detectada rapidamente sua presença logo no início do cultivo. No entanto, as contaminações bacterianas podem ter o seu desenvolvimento retardado, ocasionando um problema sério quando detectadas somente na fase de multiplicação, quando surgem em culturas originalmente consideradas axênicas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Se considerarmos tais contaminações tardias como provenientes desta planta, temos que o termo axênica não tem exatidão quando aplicado para plantas utilizadas na micropropagação. Tarazi et al. (2010), concluíram que plantas de abacaxi (*Ananas comosus*) cultivadas *in vitro* durante 5 anos sem qualquer evidência de contaminação, sendo consideradas axênicas. No entanto, foi detectada nestas plantas a presença de endófitos em seus tecidos vegetais, sem causar qualquer sintoma externo visível.

Segundo Almeida et al. (2009), foi observada a presença intracelular de uma comunidade bacteriana endofítica em células de microplantas axênicas de pupunha (*Bactris gasipaes*), provenientes de embriões excisados a partir de sementes, onde espera-se que exista uma densidade de células microbianas muito baixa. Dessa forma, a presença desses endófitos com comportamento endossimbionte, denominados bacteriossomos, levanta a questão sobre como estes foram adquiridos no processo de evolução, e como eles podem beneficiar o processo de micropropagação de plantas. Estas questões são baseadas no fato de que a manutenção destas bactérias durante esse processo indica que eles são estáveis e, dessa forma, possivelmente importantes para o desenvolvimento das plantas. Num trabalho posterior do mesmo grupo, Tarazi et al. (2010) constatou que esta comunidade não é idêntica quando comparados diferentes tecidos de plantas de abacaxi propagadas *in vitro*, existindo maior similaridade entre folhas maduras e folhas jovens, do que tecidos de raiz. Cassells (2001) demonstrou que algumas bactérias endofíticas podem atuar durante a micropropagação, competindo com os explantes pelos nutrientes ou acidificando o meio, afetando assim o desenvolvimento vegetal.

Apesar de bem estudadas como produtos biológicos para controle biológico de doenças e pragas para plantas comuns, o estudo de bactérias promotoras do crescimento vegetal na produção de mudas micropropagadas ainda é praticamente inicial. Os efeitos benéficos destes organismos sobre mudas micropropagadas podem ser de grande importância, como aumento de área foliar, diâmetro de pseudocaule, número de folhas e incremento de matéria seca. A melhoria destes fatores pode ter como consequência à redução do tempo de aclimatização e maior sobrevivência das mudas após o transplante. Sob condições de campo, sabe-se que a seleção de bactérias diazotróficas endofíticas, com alto potencial de associação com as plantas e alta taxa de fixação biológica de nitrogênio, pode ser um fator diferencial para diminuir a dependência da cultura do nitrogênio derivado do solo ou da fertilização nitrogenada (CANUTO et al., 2003). No entanto, como tal mecanismo poderia contribuir sob condições *in vitro* é algo ainda não determinado.

Tendo em vista o exposto, a contaminação persistente em algumas culturas, como a cana-de-açúcar, pode ser explicada pela presença de microrganismos endofíticos, que apresentam relação simbiótica com o vegetal no campo, que permanece durante o processo da introdução *in vitro*. Assim sendo, quando ocorre um estresse e os microrganismos presentes internamente nos tecidos encontram condições propícias para seu desenvolvimento, estes passam a colonizar o meio de

cultivo (PEIXOTO NETO et al., 2003). Desta forma, do ponto de vista da micropropagação, torna-se necessário buscar alternativas para o controle destes microrganismos, incluindo o incremento das medidas de assepsia e o cultivo de ápices caulinares, associado ao uso de controle químico (CAPÓ, 1998). Dentro deste contexto, a utilização de antibióticos é interessante para o controle de contaminações bacterianas, as quais freqüentemente representam sério problema no estabelecimento da cultura *in vitro* (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

2.5 Antibióticos

Agente antimicrobiano é o termo genérico utilizado para fazer referência ao antibiótico ou ao agente quimioterapêutico. A diferenciação destes termos se dá em suas definições, onde antibiótico é o termo usado para referir-se estritamente a substâncias que são de origem biológica, enquanto que o termo quimioterapêutico refere-se apenas a um agente químico sintético. Porém, de maneira usual, o termo antibiótico é comumente usado para referir-se a todos os tipos de agentes antimicrobianos (MAYER, 2006). Dentro desta definição mais abrangente, antibióticos são substâncias que matam os microrganismos ou previnem o seu crescimento. Tais compostos são categorizados como bactericida (os que atuam matando a bactéria susceptível) ou bacteriostático (os que inibem reversivelmente o crescimento da bactéria). Por definição, devido a sua ação específica, essas substâncias devem atuar em estruturas encontradas nas bactérias, mas não nos hospedeiros (FOX, 2006).

Os possíveis mecanismos de combate à vida microbiana estão associados com os principais aspectos estruturais de uma célula bacteriana, como a parede celular, a membrana citoplasmática ou substâncias presentes no citoplasma. O citoplasma de uma célula viva normalmente está em um estado coloidal, contendo DNA, ribossomos que sintetizam proteínas e centenas de enzimas. A membrana citoplasmática que envolve a célula mantém a integridade do conteúdo celular. A parede celular promove uma proteção que previne o rompimento das células após a absorção de água. A perda de uma dessas funções – alteração do estado físico do citoplasma, inativação de enzimas, ou rompimento da membrana ou parede celular – pode levar à morte da célula. Dessa forma, os diferentes agentes antimicrobianos atuam sobre estas estruturas, sendo o conhecimento do mecanismo de ação de um agente antimicrobiano de grande valor para a tomada de decisões em aplicações práticas (PELCZAR, 1997).

Os antibióticos podem ser classificados em diversas classes: β -lactâmicos, glicopeptídios, polimixina B, macrolídeos, lincosamidas, cloranfenicol, tetraciclina, aminoglicosídeos, sulfonamidas + trimetoprim, quinolonas, metronidazol e ansamicina (MEDGRUPO, 2008). Nesta dissertação serão destacados os grupos dos aminoglicosídeos, β -lactâmicos, tetraciclinas, quinolonas e ansamicina.

Os aminoglicosídeos são moléculas hidrofílicas, formadas por um anel aminociclitol ligado a um ou mais aminoaçúcares através de ligação glicosídica. O termo aminociclitol é mais apropriado que aminoglicosídeo, já que todos são aminociclitóis. A maioria dos antibióticos deste grupo é produzida pelas espécies de microrganismos *Streptomyces griseus*, *S. kanamyceticus*, *S. fradiae* e *Micromonospora purpúrea*, contudo, há também os compostos desta classe de origem semi-sintética. Vários aminoglicosídeos estão atualmente no mercado, sendo os mais utilizados dentro deste grupo os: estreptomicina, netilmicina, tobramicina, amicacina, neomicina e gentamicina. A gentamicina é um antibiótico complexo de largo espectro, produzido por actinobactérias do gênero *Micromonospora*. Todos os aminoglicosídeos são bactericidas rápidos, tendo espectro de ação relativamente estreito, com atividades predominantes sobre bactérias Gram-negativas. Estes antibióticos interferem na síntese protéica bacteriana, promovendo a formação de proteínas defeituosas. Os aminoglicosídeos ligam-se à subunidade 30S do ribossomo bacteriano, provocando a leitura incorreta do código genético e, conseqüentemente, permitem a incorporação de aminoácidos incorretos na cadeia polipeptídica que está sendo formada. Estes erros na síntese proteica danificam funções essenciais bacterianas, levando as células à morte (LACAZ, 1975; SPINOSA, 1996; SADER; PEREIRA, 2005; MAGNET; BLANCHARD, 2005).

A estrutura básica dos β -lactâmicos tem três componentes: anel β -lactâmico, anel tiazolidínico (penicilinas) ou diidrotiazinan (cefalosporinas) e cadeia lateral, sendo esta última responsável pela maior parte das características farmacodinâmicas e do espectro de ação destas drogas. O mecanismo de ação dos β -lactâmicos está relacionado com a síntese e destruição do peptidoglicano, componente da parede celular de bactérias, induzindo a lise de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Há basicamente três mecanismos de resistência a estas drogas: produção de β -lactamase, alteração estrutural dos receptores (proteínas de ligação às penicilinas-PBPs) onde atuam as β -lactamases e barreira à penetração do composto antimicrobiano. Inicialmente, a alteração das cadeias laterais das penicilinas e cefalosporinas acarretou transformações bastante significativas na atividade antimicrobiana e nas características

farmacodinâmicas destes compostos, resultando em gerações mais recentes destas drogas. Os antibióticos β -lactâmicos são classificados em: penicilinas, penicilinas mais inibidores de β -lactamases (Amoxicilina-clavulanato), cefalosporinas, carbapenêmicos (Imipenem) e monobactâmicos (Aztreonam). As penicilinas podem ainda ser divididas em: Penicilina G (Penicilina G benzatina), Penicilina V, Penicilina Penicilinase-Resistente (Oxacilina), Aminopenicilinas (Amoxicilina), Carboxipenicilinas (Ticarciclina) e Ureidopenicilinas (Piperacilina), e as cefalosporinas são divididas em Cefalosporinas de 1ª geração (Cefalexina), 2ª geração (Cefuroxime), 3ª geração (Cefotaxima) e 4ª geração (Cefpiroma). A associação de antibióticos β -lactâmicos com inibidores de β -lactamase (clavulanato, sulbactam e tazobactam) tem ampliado significativamente o espectro desses antibióticos tanto para bactérias Gram-positivas quanto para Gram-negativas (MEDGRUPO, 2008; SADER; PEREIRA, 2005).

As tetraciclinas são antibióticos produzidos por diversas espécies do gênero *Streptomyces* e são classificados como antibióticos de largo espectro de ação antimicrobiana, atuando de maneira bacteriostática sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (LACAZ, 1975; SPINOSA, 1996). O mecanismo de ação das tetraciclinas baseia-se na inibição da síntese de proteínas, bloqueando a união de tRNA (RNA transportador) ao complexo ribossomo-RNA_m (RNA mensageiro). Esta união reversível se produz na subunidade ribossômica 30S dos microrganismos sensíveis (MISODOR, 2011). As principais tetraciclinas do mercado são: tetraciclina e oxitetraciclina (derivados hidrofílicos), e doxiciclina e minociclina (derivados lipofílicos) (MEDGRUPOS, 2008).

O grupo das quinolonas, onde se insere a ciprofloxacina e o ácido nalidíxico, são antibacterianos obtidos por síntese, caracterizadas por um anel 3-carboxipirido-4-ona N-1-alquilado, fundido a outro anel aromático. A primeira quinolona, o ácido nalidíxico, começou a ser comercializada em 1965 (MITSCHER, 2002). As quinolonas penetram no citoplasma das bactérias através dos canais de porinas ou da camada fosfolipídica. No interior da célula, estes antibióticos atuam sobre a replicação dos ácidos nucleicos através de mecanismos complexos que intervêm no enrolamento do DNA. Os alvos destes antibióticos são a DNA girase e a Topoisomerase IV, ambas topoisomerases do tipo II (WALSH, 2003). Estas moléculas apresentam reconhecida atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (PATRICK, 2005), onde a inibição da topoisomerase IV leva à atividade em Gram-positivas e a inibição da DNA girase atua contra Gram-negativas (MITSCHER, 2002).

A rifampicina é uma versão semi-sintética da rifamicina B, um produto natural da classe das ansamicinas, isoladas originalmente de uma actinobactéria descrita inicialmente como *Streptomyces mediterranei* e depois reclassificada como *Nocardia mediterranei* (WALSH, 2003). Esta classe de compostos é caracterizada por moléculas com uma cadeia alifática interligando duas posições não-adjacentes de uma porção aromática (LEMKE, 2002). A rifampicina possui um amplo espectro de ação, atuando sobre bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, micobactérias, além de estafilococos produtores de penicilinases. As rifamicinas interferem na RNA-polimerase, impedindo a transcrição de informações genéticas. Estes antibióticos formam complexos estáveis com a RNA polimerase dos microrganismos sensíveis, sendo a inibição da atividade enzimática proporcional à quantidade de complexo formado. As rifamicinas têm ação primariamente bacteriostática, porém observa-se efeito bactericida devido ao fato dos microrganismos apresentarem sensibilidade a concentrações muito baixas destes antibióticos (LACAZ, 1975; SPINOSA, 1996).

Considerando o enfoque deste trabalho, para ser eficaz, o antibiótico ideal deve ser bactericida em meio de cultura de tecidos vegetais, não-tóxico para as células vegetais, ter um amplo espectro de atividade microbiológica (POLLOCK, 1983), apresentar características como estabilidade frente às variações de pH, ser sistêmico, ser solúvel em água e não ser afetados pela presença de íons, ânions ou cátions (FALKINER, 1990). Além disso, devido à necessidade do rápido processamento dos materiais de um laboratório de micropropagação, a resistência do antibiótico ao processo de autoclavagem é altamente desejável.

2.6 Metodologias para antibiograma

O teste de suscetibilidade de isolados bacterianos aos antimicrobianos é uma das provas mais importantes do laboratório de microbiologia clínica influenciando diretamente na escolha da terapêutica antimicrobiana (SEJAS et al., 2003).

Atualmente, o método de diluição é usado para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de um agente para inibir ou matar um microrganismo (ALVES et al., 2008). Segundo Andrews (2001), a concentração inibitória mínima é definida como a menor concentração do antibiótico que irá inibir o crescimento visível do organismo após incubação de um dia para o outro (o prazo é estendido para organismos como os anaeróbios, que exigem prolongado período de incubação para o crescimento). Esta metodologia é considerada uma excelente ferramenta para

determinar a susceptibilidade dos organismos aos antimicrobianos e, portanto, usada para julgar o desempenho de todos os outros métodos de susceptibilidade. Nos laboratórios de diagnóstico, as CIM's são também usadas como uma ferramenta de pesquisa para determinar a atividade *in vitro* de novos antimicrobianos.

O método de diluição consiste em se fazer diluições seriadas do antibiótico em meio de cultura líquido adequado ao crescimento do microrganismo cuja sensibilidade ou resistência deseja-se conhecer. O tubo de menor concentração do antibiótico capaz de impedir o aparecimento de turvação do meio (indicador de desenvolvimento microbiano) após um determinado tempo de incubação é considerado como o poder bactericida do antibiótico (PETERSDORF; PLORDE, 1963; FAVA NETTO, 1975). Este método considera a relação entre a proporção de crescimento do microrganismo desafiado no meio líquido e a concentração da substância ensaiada. O método fornece resultados quantitativos e não é influenciado pela velocidade de crescimento dos microrganismos. Dentro deste contexto, duas metodologias podem ser empregadas: macrodiluição e microdiluição. A macrodiluição envolve testes em tubos de ensaio, com volume de meio de cultura variando de 1 e 10 mL. e a microdiluição utiliza microplacas com 96 poços, com volume de meio de cultura entre 0,1 e 0,2 mL (OSTROSKY, 2008).

Outra metodologia que busca suprir informações sobre a suscetibilidade de microrganismos a agentes antimicrobianos é o teste de difusão em ágar, no qual um microrganismo é desafiado contra uma substância biologicamente ativa em meio de cultura sólido e relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo desafiado com a concentração da substância ensaiada. Consiste essencialmente no preparo de placas contendo meio de cultura sólido previamente inoculado com microrganismo sensível e distribuído em placas. A solução teste é então aplicada sobre a superfície deste meio, em uma área restrita, e as placas são então incubadas. O crescimento do microrganismo ocorre respeitando, porém, áreas onde ocorreu a difusão do antibiótico, gerando contraste e resultando na chamada zona de inibição de crescimento (PINTO et al., 2003). Esse método é qualitativo e permite classificar a amostra bacteriana em suscetível, intermediária ou resistente ao agente antimicrobiano (SEJAS, 2003).

O teste de difusão pelo método do disco é o mais utilizado, não só pela facilidade como pela rapidez do resultado obtido. Em 1966, Bauer et al., publicaram uma técnica (método Kirby-Bauer), a qual além de buscar consolidar o emprego de um único disco para cada composto

antibacteriano, procurou apresentar uma metodologia simples, cujo os resultados ofereçam melhor correlação com o método da concentração mínima inibitória (TAVARES, 1988).

O princípio deste método é baseado na difusão, através do ágar, de um antimicrobiano impregnado em um disco de papel-filtro. A difusão do antimicrobiano leva à formação de um halo de inibição do crescimento bacteriano, cujo diâmetro é inversamente proporcional à concentração inibitória mínima (MIC). Esse método é qualitativo e permite classificar a amostra bacteriana em suscetível, intermediária ou resistente ao antimicrobiano (SEJAS, 2003).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal e cultivo *in vitro*

Colmos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) de diversos genótipos indexados para as principais doenças, provenientes do jardim de matrizes, foram coletados, cortados em minitoletes, tratados termicamente a 52,5°C durante 30 minutos, plantados em bandejas e acondicionados à 35°C para o rápido brotamento das gemas. Após 15 dias de plantio, as brotações foram retiradas dos minitoletes, cortadas e desinfetadas. Os ápices caulinares foram extraídos e transferidos para tubos de ensaio contendo meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescido de reguladores de crescimento, vitaminas, e sacarose, como descrito por Lee (1987). Este meio serviu para promover a regeneração e multiplicação da cana-de-açúcar.

Após 60 dias de cultivo em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz, a planta matriz, quando totalmente diferenciada, proveniente do ápice caulinar isolado foi multiplicada sucessivamente a cada 15 dias até o quinto subcultivo e depois foi enraizada.

3.2 Isolamento dos contaminantes

Em cada etapa do processo de micropropagação de cana-de-açúcar *in vitro* (Figura 6) foram selecionados tubos e frascos com contaminação microbiana visível através da turvação e coloração do meio de cultura MS (Figura 7). Os contaminantes microbianos foram coletados e isolados em meio de cultura LB (Luria-Bertani) (Tryptona - 10g/L, Extrato de Levedura - 5g/L e NaCl - 10g/L, pH 7,0), incubados por até 72 horas a 28°C. A purificação dos organismos foi feita pela técnica de esgotamento por estrias, que consiste em isolar o contaminante desejado por arrastamento sucessivo do inóculo com a alça de platina, fazendo várias estrias na superfície do meio de cultura. Após o isolamento dos contaminantes, estes foram cultivados em 10 mL de meio LB líquido e posteriormente uma alíquota foi usada para extração de DNA.

Figura 6 – Tubos e frasco contendo microplantas de cana-de-açúcar sem contaminação

Figura 7 – Tubo e frasco contendo microplantas de cana-de-açúcar com contaminantes bacterianos

3.3 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada pelo método descrito no artigo “*A Simple Extration Method Suitable for PCR-Based Analysis of Plant, Fungal, and Bacterial DNA*”, segundo Mahuku, 2004.

3.4 Amplificação da região do 16S

O DNA extraído foi utilizado para reação de amplificação (PCR) do gene 16S rRNA de bactéria com os *primers* R1387 (5' GCC CGG GAA CGT ATT CAC CG 3') descrito por Heuer et al. (1997) e PO27F (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') descrito por Lane et al. (1985).

A reação de PCR foi feita em solução contendo: 5 µL de tampão para PCR 10x, 0,2 mM de cada dNTP (0,5 µL), 2,5 mM de MgCl₂ (2,5 µL), 0,4 µM de cada *primer* (1 µL), 1 U de *GoTaq® Flexi DNA Polimerase* (Promega) (0,25 µL), 5% de DMSO (1,25 µL), 0,1 µg de BSA (1 µL), 2 µL da amostra de DNA (~20ng) e água ultrapura (Milli-Q) esterilizada, para um volume final de 25 µL. A PCR foi realizada nas seguintes condições: um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 50°C por 45s e extensão a 72°C por 1 min, com uma extensão final a 72°C por 10 min. Ao final do programa as amostras permaneceram no termociclador a 4°C. Para cada amostra, uma alíquota de 12 µL do produto da PCR mais 3 µL de azul de bromofenol (1%) e foi avaliada em comparação com o marcador *1Kb Plus* (Invitrogen) nas duas extremidades, após corrida eletroforética a 100 V por 1 h e 30 min em gel de agarose 1,5% usando tampão TBE 0,5x.

3.5 Identificação por comparação de seqüências

Após a realização da eletroforese, a banda foi cortada e os produtos foram purificados com o *Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) conforme as instruções do fabricante e quantificados em espectrofotômetro *NanoDrop ND-8000* (Uniscience).

As amostras purificadas foram submetidas a reações de seqüenciamento utilizando-se, separadamente, 1 µL (5 pmol) de cada um dos *primers* R1387 (Heuer et al., 1997) e PO27F (Lane et al., 1985), 200 ng de DNA, 0,5 µL de *BigDye® Terminator Kit 3.1* (Applied Biosystems), 3,5 µL de tampão de diluição 2,5x (400mM Tris-HCL pH 9,0; 10 mM MgCl₂) e água ultrapura (Milli-Q) esterilizada para um volume final de 10 µL. As reações foram conduzidas nas seguintes condições: 30 ciclos com desnaturação a 95°C por 20 s, anelamento a 55°C por 15 s, extensão a 60°C por 60 s. Ao final do programa as amostras permaneceram no termociclador a 4°C.

Após as reações as amostras foram precipitadas da seguinte maneira: adicionou-se 2 µL de tampão acetato de sódio 3M e 60 µL de etanol absoluto. O material foi misturado em agitador

automático (*vortex*) e centrifugado a 3220 x g por 15 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e adicionou-se 150 µL de etanol 70%. Foi realizada nova mistura em *vortex* e centrifugação a 3220 x g por 5 min. O sobrenadante foi removido e as amostras levadas ao tubo por 10 min. Depois de secas as amostras foram ressuspensas em 10 µL de *Hi-Di Formamide* (Applied Biosystems) e agitadas em *vortex* por 10 min. O seqüenciamento foi realizado no seqüenciador capilar automático modelo *ABI PRISM 3730 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

As amostras tiveram seus cromatogramas analisados e posteriormente foram editadas utilizando o pacote de programas *Phred/Phrap* (EWING; GREEN, 1998; EWING et al., 1998; GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998) a fim de remover as bases com baixa qualidade. O nível de exigência foi de Phred com qualidade de base acima de 20 (1 erro a cada 100 bases lidas). As sequências de alta qualidade foram comparadas por similaridade com sequências de nucleotídeos disponibilizadas no banco de dados *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), utilizando o programa *nucleotide blast* do *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (ALTSCHUL et al., 1990).

3.6 Determinação do efeito da autoclavagem sobre a atividade dos antibióticos

Este ensaio consistiu em avaliar a ação dos antibióticos esterilizados por filtração ou autoclavagem sobre o desenvolvimento do microrganismo escolhido como padrão, *Escherichia coli* DH5alfa.

Esta bactéria foi cultivada em 100 mL de meio de cultura LB líquido por 16h a 37 °C sob agitação de 300 rpm. Após este período foi realizada a leitura da densidade óptica (DO) da bactéria a 600 nm, ajustando esta concentração para um valor de DO = 0.3.

Os antibióticos utilizados neste teste foram: rifampicina (ansamicina), tetraciclina (tetraciclina), gentamicina (aminoglicosídeo), agrimicina (tetraciclina + aminoglicosídeo), clavulin (penicilinas mais inibidores de β-lactamases), cefalexina (cefalosporina), ciprofloxacina (quinolona), levofloxacina (quinolona), e amoxilina (penicilina). Para cada um deles foram avaliadas as concentrações de 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 25, 50 e 100 µg/mL.

Para cada concentração dos antibióticos citados, foram avaliados os tratamentos filtrados e autoclavados, resultando em um fatorial de 9 (antibióticos) x 8 (concentrações) x 2 esterilizações (filtrado e autoclavado), totalizando 144 tubos.

Para o feitiço da solução estoque dos antibióticos, pesou-se 500 mg de cada antibiótico e adicionou-se 10 mL de água destilada (apenas a rifampicina foi diluída em DMSO), resultando na concentração final de 50 mg/mL de cada solução estoque. Todas as soluções estoque foram feitas em duplicata, onde metade foi autoclavada a uma temperatura de 121°C, com 1 atm de pressão relativa durante 15 minutos e a outra foi filtrada com filtro de 0,2 micras.

Para o tubo com concentração final de 100 µg/mL de antibiótico (tubo 1), distribuiu-se 10 mL do meio de cultura LB, adicionou-se 20 µL da solução estoque filtrada e foi realizada a agitação. Para os tubos com concentração de 10 (tubo 2) e 1 µg/mL (tubo 3), distribuiu-se 9 mL do meio de cultura LB. Foi retirada uma alíquota de 1 mL do tubo 1 e adicionou-se no tubo 2 e foi retirado uma alíquota de 1 mL do tubo 2 que foi adicionada no tubo 3. Após a adição do antibiótico no tubo 3 foi retirada uma alíquota de 1 mL e descartada para todos os tubos ficarem com 9 mL de meio de cultura LB mais antibiótico (Figura 8).

Figura 8 – Esquema ilustrativo das diluições para concentração final de 100, 10 e 1 µg/mL dos antibióticos

Para o tubo com concentração final de 50 µg/mL de antibiótico (tubo 3), distribuiu-se 10 mL do meio de cultura LB, adicionou-se 10 µL da solução estoque filtrada e foi realizada a agitação. Para os tubos com concentração de 5 (tubo 4) e 0,5 µg/mL (tubo 5), distribuiu-se 9 mL do meio de cultura LB. Foi retirado uma alíquota de 1 mL do tubo 3 e adicionou-se no tubo 4 e foi retirado uma alíquota de 1 mL do tubo 4 que foi adicionada no tubo 5. Após a adição do antibiótico no tubo 5 foi retirada uma alíquota de 1 mL e descartada para todos os tubos ficarem com 9 mL de meio de cultura LB mais antibiótico (Figura 9).

Figura 9 – Esquema ilustrativo das diluições para concentração final de 50, 5 e 0,5 µg/mL dos antibióticos

Para o tubo com concentração final de 25 µg/mL de antibiótico (tubo 7), distribuiu-se 10 mL do meio de cultura LB, adicionou-se 5 µL da solução estoque filtrada e foi realizada a agitação. Para o tubo com concentração de 2.5 (tubo 8), distribuiu-se 9 mL do meio de cultura LB. Foi retirada uma alíquota de 1 mL do tubo 7 e adicionou-se no tubo 8. Após a adição do antibiótico no tubo 8 foi retirada uma alíquota de 1 mL e descartada para todos os tubos ficarem com 9 mL de meio de cultura LB mais antibiótico (Figura 10).

Figura 10 – Esquema ilustrativo das diluições para concentração final de 25 e 2,5 µg/mL dos antibióticos

Com as diluições preparadas, adicionou-se em todos os tubos o inóculo (10 µL de uma suspensão celular com DO = 0,3 de *Escherichia coli*) (Figura 11). Os tubos foram então incubados por 16h a 37°C sob agitação de 150 rpm. Além dos tubos com antibiótico foram usados tubos controle, sem antibiótico, porém inoculados, além de tubos contendo apenas o meio de cultura LB. Após o desenvolvimento da bactéria foram realizadas as leituras da densidade óptica de cada tubo, inclusive dos controles.

Figura 11 – Esquema ilustrativo dos tubos com inóculo + antibiótico + meio de cultura LB

3.7 Antibiograma

Este ensaio foi realizado com o intuito de avaliar a resistência dos contaminantes bacterianos frente aos antibióticos autoclavados selecionados de acordo com os resultados obtidos com o teste descrito no item anterior.

Foram utilizadas 74 bactérias isoladas de todas as etapas do processo produtivo da Biofábrica de diferentes clones e diferentes fases de cultivo (regeneração, multiplicação e enraizamento). As bactérias isoladas foram inoculadas em 10 mL de meio de cultura LB líquido e colocadas para crescer por 24h a 28°C sob agitação de 150 rpm, depois foram diluídas em meio de cultura LB (1:100) e submetidas ao desenvolvimento contendo os diferentes antibióticos.

Os antibióticos utilizados foram rifampicina (ansamicina), tetraciclina (tetraciclina), gentamicina (aminoglicosídeo), agrimicina (tetraciclina + aminoglicosídeo), clavulin (penicilinas mais inibidores de β -lactamases), ciprofloxacina (quinolona), levofloxacina (quinolona), nas concentrações de 50 $\mu\text{g/mL}$, com exceção do clavulin que foi utilizado a concentração de 50 e 250 $\mu\text{g/mL}$.

Para o efeito da solução estoque dos antibióticos, pesou-se 500 mg de cada antibiótico e adicionou-se 10 mL de água destilada, apenas a rifampicina foi diluída em DMSO, resultando em 50 mg/mL a concentração final de cada solução estoque.

Preparou-se 8 L do meio de cultura MS e adicionou-se 1 mL da solução estoque de cada antibiótico em frascos contendo 1 L do meio de cultura MS, resultando em uma concentração final de 50 $\mu\text{g/mL}$ para cada antibiótico. Para o clavulin também foi adicionado em 1 L de meio de cultura MS 2,5 mL da solução estoque para obter-se uma concentração final de 250 $\mu\text{g/mL}$. Após a autoclavagem foi distribuído 30 mL de meio de cultura em placas de Petri.

Nas placas de Petri já solidificadas, contendo os antibióticos, foram adicionados 5 μL de cada bactéria (suspensão DO = 0,3). Foram colocadas de 10 a 15 cepas de bactérias em cada placa (Figura 12), que foram posteriormente acondicionadas em incubadora por 48 horas a 28°C. Após este período as placas foram retiradas da estufa e foi realizada a avaliação do crescimento dos isolados.

A avaliação do ensaio foi realizada visualmente, através da observação do desenvolvimento das colônias, tomando-se como padrão as colônias crescidas no meio sem antibiótico (controle). As diferenças observadas no crescimento das colônias das bactérias

pertencentes aos diversos gêneros, nos meios contendo diferentes concentrações de antibióticos, foram evidenciadas como resistentes as que cresceram e susceptíveis as que não cresceram.

Figura 12 - Placa de Petri com meio de cultura LB sem antibiótico com crescimento de todas as colônias bacterianas

3.8 Antibioticoterapia

Este ensaio consistiu em avaliar a porcentagem de descarte devido a contaminação bacteriana e a fitotoxicidade das plântulas frente à adição do antibiótico ao meio de cultura MS. Foi feito um levantamento destes dados em todas as etapas do processo produtivo de quatro clones da Biofábrica (regeneração, multiplicação e enraizamento).

O antibiótico empregado neste ensaio foi o que demonstrou menor resistência por parte dos isolados, de acordo com os resultados obtidos no antibiograma.

A partir de amostras de cada um dos quatro clones, foram extraídos quarenta e oito ápices caulinares, onde metade foi transferido para tubos de ensaio contendo meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescido de reguladores de crescimento, vitaminas, e sacarose, descrito por Lee (1987) (tratamento 1); e a outra metade para tubos de ensaio contendo o mesmo meio de cultura citado acima acrescido de 50 µg/mL de antibiótico (tratamento 2). O antibiótico foi adicionado ao meio de cultura antes da autoclavagem, seguindo as observações feitas ao longo deste estudo. Os tubos foram acondicionados em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz. Durante todo o processo de regeneração, multiplicação e

enraizamento foram mantidos os meios de cultura sem e com antibiótico para os respectivos tratamentos 1 e 2.

Durante todo o processo os tubos foram avaliados em relação à fitotoxicidade e foram contabilizados os descartes provenientes de contaminação bacteriana. Além disso, os frascos gerados, devido à multiplicação do material inicial foram determinados, permitindo um levantamento da eficiência deste material em se multiplicar.

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção da coleção de isolados

A partir da seleção de contaminantes presentes em todo o processo de multiplicação dos clones utilizados na Biofábrica, foi possível obter um total de 185 isolados bacterianos. Estes isolados foram submetidos aos testes posteriores de identificação filogenética e resistência a antibióticos

4.2 Identificação por comparação de seqüências

Dentro da coleção de isolados, 112 tiveram o gene 16S RNAr parcialmente sequenciados, permitindo a comparação por similaridade com seqüências de nucleotídeos disponíveis no banco de dados *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Esta análise permitiu identificar os gêneros das bactérias contaminantes das plântulas presentes em todas as etapas da micropropagação de cana-de-açúcar.

As bactérias identificadas pertencem a dois filos bacterianos: Firmicutes e Proteobacteria. Das 112 bactérias identificadas, 19% revelaram similaridade a membros de Firmicutes, de maneira mais específica com a classe Bacilli; enquanto que os outros 81% pertencem ao filo das Proteobacterias, onde foram encontrados isolados pertencentes às classes Alphaproteobacteria (28%), Betaproteobacteria (25%) e Gammaproteobacteria (28%) (Tabela 1). De maneira mais detalhada, foi observado um total de 18 gêneros de bactéria, com maior frequência do gênero *Gluconacetobacter* (20% dos isolados), seguido de *Burkholderia* (16%) e *Alicyclobacillus* (11%) (Figura 13).

Tabela 1 – Taxonomia de isolados bacterianos, contaminantes do processo de micropropagação de cana-de-açúcar, determinada pelo sequenciamento parcial do gene 16S RNAr

Filo	Classe	Ordem	Familia	Gênero
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Alicyclobacillaceae	<i>Alicyclobacillus</i>
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>
Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>
Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Leuconostocaceae	<i>Leuconostoc</i>
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Acetobacteraceae	<i>Acidisoma</i>
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Acetobacteraceae	<i>Acidomonas</i>
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Acetobacteraceae	<i>Gluconacetobacter</i>
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	<i>Rhizobium</i>
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	<i>Achromobacter</i>
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	<i>Burkholderia</i>
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	<i>Herbaspirillum</i>
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	<i>Ralstonia</i>
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter</i>
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella</i>
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Pantoea</i>
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas</i>

Nota: Os dados apresentados na tabela foram obtidos no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>.

Figura 13 - Porcentagem dos gêneros de bactérias coletadas em cada etapa do processo de micropropagação de cana-de-açúcar, determinados pelo sequenciamento parcial do gene 16S

4.3 Determinação do Efeito da Autoclavagem sobre a Atividade dos Antibióticos

No ensaio da determinação de concentração inibitória mínima (CIM) dos antibióticos foi avaliado inicialmente a atividade dos antibióticos filtrados ou autoclavados. Neste teste, foi usado como modelo a estirpe *Escherichia coli* DH5α.

Foram testados 9 antibióticos, 8 concentrações e 2 tratamentos (antibiótico filtrado e autoclavado). A partir dos resultados obtidos (Tabela 2) na leitura da absorbância em 600 nm, podemos dizer que estes antibióticos mostraram três tipos de respostas: *i*) alguns antibióticos são inativados totalmente quando autoclavados, *ii*) outros são inativados apenas em algumas das concentrações usadas; *iii*) alguns continuam com a mesma eficiência mesmo após o processo de autoclavagem.

A amoxicilina e a cefalexina são totalmente inativadas quando autoclavadas, já a ciprofloxacina, a levofloxacina e a agrimicina não sofrem nenhum efeito após a autoclavagem.

Dentro do grupo que é afetado pela autoclavagem de maneira dependente da concentração, algumas observações mais específicas podem ser feitas. A agrimicina começa a apresentar atividade sobre o organismo modelo quando autoclavada em concentrações maiores do que 25 $\mu\text{g/mL}$. O clavulin na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ autoclavado começa a inibir o crescimento da bactéria, porém a inibição não é total mesmo com concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. A tetraciclina autoclavada inibe totalmente o crescimento da bactéria com concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, a gentamicina autoclavada inibe nas concentrações superiores a 25 $\mu\text{g/mL}$ e a rifampicina com valores maiores de 50 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 2 – Valores da leitura da absorbância em 600nm de tubos após 16 horas de inoculação em meio de cultura LB com a bactéria *Escherichia coli* DH5 α , e contendo diferentes concentrações dos antibióticos filtrados ou autoclavados

Antibióticos	Concentração do antibiótico em $\mu\text{g/mL}$							
	100	50	25	10	5	2,5	1	0,5
Agrimicina A	0,00	0,00	0,00	0,95	1,40	1,46	1,45	1,31
Agrimicina F	0,00	0,00	0,00	1,55	1,62	1,44	1,53	1,51
Amoxicilina A	1,51	1,55	1,71	1,38	1,70	1,45	1,69	1,53
Amoxicilina F	0,00	0,00	0,00	0,00	0,51	1,40	1,65	1,76
Cefalexina A	1,75	1,38	1,36	1,46	1,45	1,53	1,54	1,44
Cefalexina F	0,00	0,02	1,04	1,58	1,45	1,43	1,71	1,77
Ciprofloxacina A	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ciprofloxacina F	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Clavulin A	0,04	0,56	0,52	1,59	1,75	1,61	1,69	1,61
Clavulin F	0,00	0,00	1,21	1,26	1,71	1,46	1,46	1,64
Gentamicina A	0,00	0,00	0,00	1,37	1,58	1,46	1,34	1,15
Gentamicina F	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,18	1,27
Levofloxacina A	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Levofloxacina F	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Rifampicina A	0,00	0,00	1,29	1,42	1,70	1,21	1,54	1,56
Rifampicina F	0,00	0,00	0,00	0,00	1,22	1,64	1,64	1,85
Tetraciclina A	0,00	0,00	0,00	0,00	0,53	1,37	1,55	1,63
Tetraciclina F	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,55	1,27

Nota: A = autoclavado; F = filtrado

Controles foram realizados com tubos apenas com meio de cultura LB e tubos com o meio de cultura LB contendo o mesmo inóculo (leituras de 1.35, 1.54 e 1.70).

4.4 Antibiograma

No ensaio do antibiograma foi avaliada a resistência dos contaminantes bacterianos frente aos antibióticos autoclavados selecionados com base no ensaio descrito acima. Para tanto, foram usados 74 isolados e sete antibióticos.

Os resultados, evidenciados pelo desenvolvimento de colônias em meios de cultivo indicou a maior resistência dos isolados a agrimicina (100% dos isolados) e tetraciclina (78%). Para as placas com concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ de clavulin (Cla 1) ou 250 $\mu\text{g/mL}$ de clavulin (Cla

2) não foi notada diferença em relação à inibição do crescimento bacteriano, onde valores de 49% e 43%, respectivamente, dos isolados foram resistentes a esse antibiótico. Os antibióticos que se mostraram com maior eficiência no controle dos isolados bacterianos foram a ciprofloxacina com apenas 34% dos isolados resistentes, a gentamicina com 32%, a levofloxacina com 31% e a rifampicina com 28% (Figuras 14 e 15).

Apenas 19% dos isolados foram resistentes a todos os antibióticos e nenhum isolado foi suscetível a tudo, pois a agrimicina não foi eficiente, no entanto se a agrimicina for desconsiderada, podemos observar a suscetibilidade de 18% dos isolados ao restante dos antibióticos.

Figura 14 – Crescimento dos isolados bacterianos obtidos em cada etapa do processo de micropropagação de cana-de-açúcar em meio de cultura MS frente ao controle e aos antibióticos após 48 h de incubação

Figura 15 – Porcentagem de isolados bacterianos resistentes aos antibióticos adicionados ao meio de cultura MS antes da autoclavagem após 48 h de incubação. Agr – agrimicina; Tet – tetraciclina; Cla 1 – clavulin 50µg/mL; Cla 2 - clavulin 250µg/mL; Cip – ciprofloxacina; Gen – gentamicina; Lev – levofloxacina; Rif – rifampicina

4.5 Antibioticoterapia

Neste ensaio foi avaliada a contaminação bacteriana e o desenvolvimento das plântulas frente ao antibiótico adicionado ao meio de cultura em todas as etapas da micropropagação (regeneração, multiplicação e enraizamento). Com base nos resultados anteriores, o antibiótico selecionado para este ensaio foi a rifampicina, usada na concentração de 50 µg/mL (que mostrou menor número de isolados resistentes), e autoclavada junto ao meio de cultivo (a concentração não mostrou efeito da autoclavagem sobre a atividade antibacteriana).

Inicialmente, observa-se que a ocorrência natural de contaminação é diferente entre os clones, onde os clones 1 e 2 apresentaram valores muito maiores (32 e 27%, respectivamente) do que os clones 3 e 4 (5 e 6%). Em relação ao efeito da adição do antibiótico ao sistema de

micropropagação, observa-se a diminuição de frascos descartados por contaminação bacteriana (Figura 16). De forma geral, temos uma redução da contaminação para todos os clones em mais de 70%.

Figura 16 – Porcentagem de frascos descartados por contaminação bacteriana para cada clone de cana-de-açúcar avaliado durante o processo de micropropagação

Este ensaio também permitiu a avaliação do efeito da adição do antibiótico no desenvolvimento da planta ao longo do processo de micropropagação. Numa primeira avaliação, realizada visualmente durante todas as etapas do processo de micropropagação, as plântulas não apresentaram diferenças com as micropropagadas sem antibióticos em relação à oxidação, necroses, mal desenvolvimento e enraizamento.

Outra análise realizada, de forma mais quantitativa, buscou quantificar o número de frascos que foram gerados nos tratamentos com e sem antibióticos durante o processo. Esta análise revelou o efeito do antibiótico sobre a taxa de multiplicação dos clones avaliados, sendo tal efeito dependente do genótipo do clone. Todos os gráficos indicam um aumento expressivo no número de frascos gerado ao longo do processo de multiplicação, o que se justifica pela menor

perda de frascos ao longo do processo, devido à inibição do desenvolvimento de contaminantes. Vale também destacar, que clones com maiores taxas de multiplicação (clone 4, por exemplo), também apresentaram maiores ganhos no número de frascos gerados quando o antibiótico foi adicionado (Figura 17).

Figura 17 – Número de frascos obtidos para cada clone de cana-de-açúcar nas etapas da micropropagação sem antibiótico e com o antibiótico rifampicina na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$

5 DISCUSSÃO

A cana-de-açúcar ocupa posição de destaque no cenário econômico internacional, sendo o Brasil o maior produtor desta cultura (APTA, 2011). Para suprir a necessidade das usinas com mudas de plantas de cana-de-açúcar em quantidade e com qualidade é utilizado o processo de micropropagação, onde ápices caulinares são utilizados como material inicial de multiplicação em estruturas conhecidas como biofábricas.

No entanto, dentro das biofábricas, muitos ápices caulinares que são introduzidos no processo não chegam a formar mudas, pois morrem durante a micropropagação devido a fatores químicos (meio de cultura, pH) e físicos (temperatura, luminosidade). Porém, a maior causa de perda de material dentro de uma biofábrica é ocasionada pela contaminação das culturas por microrganismos, onde se destaca a perda por contaminação bacteriana (PEREIRA et al., 2003). Algumas vezes, a presença das bactérias pode ser evidenciada logo no início do processo, porém na maioria das vezes ela não é detectada de imediato, sendo observada somente após algum tempo de cultivo, onde um grande número de plantas já está propagado. Uma possível explicação para esta característica é o fato da origem de tais contaminações não ser o meio externo, como pensado inicialmente. Uma vez que bactérias vivem em tecidos internos das plantas, estas podem passar a colonizar o meio de cultura no momento em que as condições ambientais internas e externas são alteradas. Dentro deste contexto, o presente trabalho identificou muitas bactérias encontradas como contaminantes do processo de micropropagação, mas que já foram descritas como bactérias endofíticas de muitas plantas, dentre as quais, a cana-de-açúcar. Considerando os gêneros descritos neste trabalho, pode-se correlacionar suas descrições em outros trabalhos. Segundo Hallmann et al. (1997), dentre os gêneros de bactérias endofíticas mais comumente isolados em plantas se destacam *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*. Outros autores também encontraram alguns gêneros compondo a comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja, como *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pantoea* e *Pseudomonas* (ASSUMPÇÃO, 2009). O gênero *Stenotrophomonas* foi encontrado como endófito de plantas de cana-de-açúcar e trigo (FAGES & ARSAC, 1991). *Klebsiella* é um endófito comum de milho (CHELIUS E TRIPLETT, 2000). Os gêneros *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* e *Azospirillum* foram encontrados como endófitos de plantas de cana-de-açúcar, arroz, trigo, sorgo, milho e algumas forrageiras (JAMES & OLIVARES, 1997; BALDANI et al., 1997; JAMES 2000; BODDEY et al. 2003).

De forma mais detalhada, os dois gêneros mais abundantes dentre os isolados classificados são *Gluconacetobacter* (20% dos isolados), seguido de *Burkholderia* (16%), amplamente descritas como associadas às plantas. A espécie *Gluconacetobacter diazotrophicus*, anteriormente denominada *Acetobacter diazotrophicus*, é uma bactéria endofítica, Gram negativa, aeróbia, (BODDEY et al., 1991), fixadora de nitrogênio atmosférico (CAVALCANTE & DOBEREINER, 1988) e produz hormônios de crescimento, como o ácido indol acético (AIA) (FUENTES-RAMÍREZ et al., 1993). Está principalmente associada a plantas ricas em açúcar, como a cana-de-açúcar, batata doce e capim camerrom (DOBEREINER et al., 1995). O gênero *Burkholderia* engloba bactérias na forma de bacilos Gram negativos, aeróbios e móveis (SAVOIA, ZUCCA, 2001). Espécies pertencentes ao gênero *Burkholderia* foram isoladas como endofíticas ou associadas à rizosfera de cana-de-açúcar (LUVIZOTTO et al., 2010). Este gênero também é descrito como atuante na fixação biológica de nitrogênio, controle biológico de doenças em plantas, biorremediação, produção de plásticos biodegradáveis e como promotores de crescimento de plantas (MEDAU, 2007). Estas evidências permitem determinar que a maior fonte de contaminação na biofábrica é o material vegetal e não o manipulador ou o meio externo. Esta hipótese foi abordada recentemente em dois trabalhos, que caracterizam a presença de bactérias em tecidos de plantas mantidas sob condições de cultivo *in vitro* por longos períodos de tempo (ALMEIDA et al. 2009; TARAZZI et al. 2010). Estes autores demonstram a existência de tais bactérias, mostram sua longa permanência dentro das plantas hospedeiras, e discutem sobre a essencialidade destas bactérias para o funcionamento da planta.

Dessa maneira, considerando a própria planta a fonte de contaminação no processo, torna-se necessário o desenvolvimento de estratégias de controle baseadas na inibição do desenvolvimento bacteriano, e não na assepsia do processo. O controle deve ser além de eficiente, também de fácil aplicação. De acordo com a literatura é conhecido que os antibióticos são comumente esterilizados por filtração e adicionados ao meio de cultura somente após autoclavagem do mesmo (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Esta característica torna o emprego de antibiótico muito trabalhoso e de difícil aplicação em grande escala (necessidade de maior espaço, mais fluxos laminares e maior número de pessoas envolvidas no processo). No entanto, neste trabalho, com o intuito de conter o crescimento dos contaminantes nos tubos e frascos onde plantas estão sendo micropropagadas, foi realizado um estudo para determinar o efeito da autoclavagem sobre a atividade de diversos antibióticos. Os resultados mostraram que

existem antibióticos mais resistentes a autoclavagem, sendo ativos sobre o desenvolvimento bacteriano após tal processo. Ainda, alguns antibióticos mostraram-se mais resistentes a autoclavagem, apenas quando usados acima de determinadas concentrações, possivelmente indicando uma inativação parcial do composto ativo. Como resultado final do antibiograma, foi determinado que o uso da rifampicina na concentração de 50 ug/mL resultou na inibição do crescimento do maior número de contaminantes. Considerando que tal antibiótico tem ação bacteriostática (LACAZ, 1975; SPINOSA, 1996), deve-se destacar que os organismos associados às plantas não são eliminados, mas apenas tem seu crescimento inibido no meio de cultura. Neste ponto, retomando a discussão proposta na literatura (ALMEIDA et al. 2009; TARAZZI et al., 2010), onde a eliminação de tais microrganismos podem comprometer o desenvolvimento das plantas, o uso de uma bacteriostático seria preferencial ao uso de um composto bactericida. Ainda, comparando os resultados obtidos com a literatura, existem relatos do uso da rifampicina para o controle da contaminação endofítica em cultura de tecidos de algumas espécies de plantas (PHILLIPS et al., 1981; POLLOCK et al., 1983). Dentre tais trabalhos, Reuveni et al. (1990) determinou que, para o mamoeiro, além de reduzir o nível de contaminação, a rifampicina não prejudicou o desenvolvimento do explante. Segundo Vianna et al. (1997), a rifampicina, por tratamento de imersão ou introdução em meio de cultura, controlou as contaminações de endófitos do mamoeiro, obtendo-se 70% de explantes saudáveis e sem sinais de fitotoxicidade. Em explantes de *Helianthus tuberosus*, entre seis antibióticos analisados, apenas a rifampicina controlou a contaminação bacteriana sem alterar a taxa de divisão celular vegetal (PHILLIPS et al., 1981). Estes dados mostram que o uso da rifampicina é indicado.

Tendo em vista tais resultados, foi realizada a antibioticoterapia, com o intuito de verificar a ausência de danos à multiplicação da cana-de-açúcar, corroborando com os dados obtidos para outras espécies e já discutidos. A utilização de quatro clones de cana-de-açúcar foi feita para verificar possíveis efeitos dependentes do genótipo das plantas. Os resultados mostraram o esperado, redução de até 70% as perdas por contaminação e não influência no desenvolvimento das plantas. Como resultado desta menor perda, o ganho na produção foi observado, não pelo estímulo da multiplicação, mas pelo menor descarte de tubos e frascos ao longo do processo. É importante destacar que não há estudos similares em grande escala, medindo a produtividade de tais sistemas dentro de uma ótica do controle de desenvolvimento de endófitos.

Concluindo, este trabalho determinou o melhor antibiótico a ser usado no controle do desenvolvimento de endófitos e avaliou sua viabilidade de utilização. Estudos futuros podem ainda melhorar tal processo, baseando os controles de tais organismos em outros compostos, de menor custo, ou ainda encontrando condições de cultivo mais inibitórias ao crescimento destas bactérias.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS – APTA. **Cana-de-açúcar – Anexos – Termo de referência**. Disponível em: <<http://www.apta.sp.gov.br>>. Acesso em: 10 jan. 2011.
- AGUIRRE JUNIOR, J.M. de. **Criação de novas variedades de cana-de-açúcar no estado de São Paulo**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1936. 64 p. (IAC. Boletim Técnico, 34).
- ALMEIDA, C.V.; ANDREOTE, F.D.; YARA, R.; TANAKA, F.A.O.; AZEVEDO, J.L.; ALMEIDA, M. Bacteriosomes in axenic plants: endophytes as stable endosymbionts. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 25, p. 1757-1764, 2009.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 215, p. 403-410, 1990.
- ALVES, E.G.; VINHOLIS, A.H.C.; CASEMIRO, L.A.; FURTADO, N.A.J.C.; ANDRADE E SILVA, M.L.; CUNHA, W.R.; MARTINS, C.H.G. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.
- ANDREOTE, F.D.; GULLO, M.J.M.; LIMA, A.O.S.; MACCHERONI JUNIOR, W.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Impact of genetically modified *Enterobacter cloacae* on indigenous endophytic community of *Citrus sinensis* seedlings. **Journal of Microbiology**, Seoul, v. 42, p. 169-173, 2004.
- ANDREWS, J.M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 48, n. 1, p. 5-16, 2001.
- ARAÚJO, W.L.; LIMA, A.O.S.; AZEVEDO, J.L.; MARCON, J.; SOBRAL, J.K.; LACAVA, P.T. **Manual: isolamento de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: CALQ, 2002. 86 p.
- ARSHAD, M.; FRANKENBERGER, W.T. Microbial production of plant hormones. In: KEISTER, D.L.; CREGAN, P.B. (Ed.). **The rhizosphere and plant growth**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p. 327-334.
- ASSUMPÇÃO, L de C.; LACAVA, P.T.; DIAS, A.C.F.; AZEVEDO, J.L.; MENTEN, J.O.M. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 5, p. 503-510, 2009.
- AZEVEDO, J.L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. de. (Ed.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA, CNPMA, 1998. p. 117-137.
- _____. Botânica: uma ciência básica ou aplicada? **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 22, supl. 2, p. 225-229, 1999.

_____. Biologia molecular de microrganismos endofíticos e o controle de doença em citrus. In: REUNIÃO DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, 23., 2002, Pirenópolis. Pirenópolis: Universidade Estadual de Goiás, 2002. p. 32.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaiso, v. 3, p. 40-65, 2000. Disponível em: <<http://ejbiotechnology.info/content/vol3/issue1/index.html>>. Acesso em: 02 dez. 2010.

BALDANI, J.I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DÖBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of (*Pseudomonas*) *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb.nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **Internacional Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 14, p. 263-279, 1996.

BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, p. 911-922, 1997.

BENCHIMOL, R.L.; CHU, E.Y.; MUTO, R.Y.; DIAS-FILHO, M.B. Controle da fusariose em plantas de pimenta-do-reino com bactérias endofíticas: sobrevivência e respostas morfofisiológicas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 7, p. 1343-1348, 2000.

BIODIESELBR. **Energia/Álcool/Etanol, 2010**. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com>>. Acesso em: 15 out. 2010.

BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B.J.R.; REIS, V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 252, p. 139-149, 2003.

BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S.; REIS, V.; DOBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 137, p. 111-117, 1991.

CANAVIALIS. **Newsletter/Results Report**. 9th ed. Disponível em: <<http://www.canavialis.com.br>>. Acesso em: 15 out. 2010.

CANUTO, E.L.; SALLES, J.F.; OLIVEIRA, A.L.M.; PERIN, L.; REIS, V.M.; BALDANI, J.L. Respostas de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar à inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas. **Agrochimica**, Seropédica, v. 37, p. 67-72, 2003.

CAPÓ, Y.A. Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. In: PONCE, J.N.P. (Ed.). **Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología**. Villa Clara: Instituto de Biotecnología de las Plantas, 1998. p. 80-102.

CARROLL, G. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, Brooklyn, v. 69, p. 2-9, 1988.

CASSELLS, A.C. Contamination and its impact in tissue culture. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 560, p. 353-359, 2001.

CAVALCANTE, V.A.; DÖBEREINER, J. A new acid tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 108, p. 23-31, 1988.

CHABOUSSOU, F. **Plantas doentes pelo uso de agrotóxicos: a teoria da trofobiose**. Trad. de M.J. Guazzelli. 2. ed. Porto Alegre: L&PM, 1999. 272 p.

CHELIUS, M.K.; TRIPLETT, E.W. Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumoniae* in association with *Zea mays* L. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 783-787, 2000.

CLAYTON, W.D.; DANIELS, C.A. Geographical, historical and cultural aspect of origin of the Indian and Chinese sugarcane *S. barberi* and *S. sinensis*. **ISSCI Sugarcane Breeding Newsletter**, Mackknade, v. 36, p. 4-23, 1975.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Imprensa/Notícias e Levantamento de Safras**. 2010. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 02 set. 2010.

CORREIO BRAZILIENSE. **Economia**. 2010. Disponível em: <<http://www.correiobraziliense.com.br>>. Acesso em: 27 ago. 2010.

CRONQUIST, A. An integrated system of classification of flowering plants. New York: **Columbia University Press**, 1981. 1262 p.

DANIELS, J.; SMITH, P.; PATON, N. The origin of sugarcane and centers of genetic diversity in *Saccharum*. **Sugarcane Breeder's Newsletter**, Queensland, v. 35, p. 4-18, 1975.

DOBEREINER, J.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**. Brasília: EMBRAPA – SPI, 1995, v. 1, 60 p.

DUFFY, B.K. Competition. In: MALOY, O.C.; MURRAY, T.D. (Org.). **Encyclopedia of plant pathology**. New York: John Wiley, 2001. p. 243-244.

EMBRAPA. **Agroecologia da cana-de-açúcar**. 2010. Disponível em: <<http://www.cana.cnpm.embrapa.br>>. Acesso em: 14 out. 2010.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 186-194, 1998.

EWING, B.; HIJJER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 175-185, 1998.

FAGES, J.; ARSAC, J.F. Sunflower inoculation with *Azospirillum* and other plant growth promoting rhizobacteria. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 137, p. 87-90, 1991.

FALKINER, F.R. The criteria for choosing an antibiotic for control of bacteria in plant tissue culture. **IAPTC Newsletter**, Calgary, n. 60, p. 13-23, 1990.

FAVA NETTO, C. Antibiograma. In: LACAZ, C.S. (Org.). **Antibióticos**. 3. ed. São Paulo: Edgard Blucher; EDUSP, 1975. p. 221-233.

FERREIRA, M.E.; CALDAS, L.S.; PEREIRA, E.A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, A.J. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação de plantas**. Brasília: EMBRAPA, SPI; CNPH, 1998. v. 1, p. 21-44.

FOX, A. **Antibiotics that affect the cell envelope**. 2006. Disponível em: <<http://pathmicro.med.sc.edu/fox/antibiotics1.htm>>. Acesso em: 05 jan. 2011.

FUENTES-RAMÍREZ, L.E.; JIMÉNEZ-SALGADO, T.; ABARCA-OCAMPO, I.R.; CABALERO-MELLADO, J. *Acetobacter diazotrophicus*, an indole-acetic producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 154, p. 145-150, 1993.

GILLIS, M.; KARSTERS, K.; HOSTE, B.; JANSSENS, D.; KROPPRENTSTEDT, R.M.; STEPHAN, M.P.; TEIXEIRA, K.R.S.; DÖBEREINER, J.; DE LEY, J. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v. 39, n. 3, p. 361-364, 1989.

GILLIS, M.; DÖBEREINER, J.; POT, P.; GOOR, M.; FALSSEN, E.; HOSTE, B.; REINHOLD, B.; KERSTERS, K. Taxonomy relationship between *Pseudomonas rubrisubalbicans*, some clinical isolates (EF group I), *Herbaspirillum seropedicae* and *Aquaspirillum autotrophicum*. In: POLSINELLI, M.; MATERASSI, R.; VICENZINI, M. (Ed.). **Nitrogen fixation**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p. 292-294.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a geographical tool for sequence finishing. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 195-202, 1998.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, A.J. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação de plantas**. Brasília: EMBRAPA, SPI; CNPH, 1998. v. 1, p. 183-260.

HALMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 895-914, 1997.

HARDOIM, P.R.; VAN OVERBEEK, L.S.; VAN ELSAS, J.D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 16, p. 463-471, 2008.

HEUER H., KRSEK, M., BAKER, P., SMALLA, K., WELLINGTON, E.M.H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3233-3241, 1997.

JAMES, E.K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research**, v. 65, p. 197-209, 2000.

JAMES, E.K.; OLIVARES, F.L. Infection and colonization of sugarcane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 17, n. 1, p. 77-119, 1997.

KNEIFEL, W.; LEONHARDT, W. Testing of different antibiotics against gram-positive and gram-negative bacteria isolated from plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 29, p. 139-144, 1992.

LACAZ, C.S. Antibióticos. Conceituação. Agentes produtores. Aspectos microbiológicos. Classificação. Súmula dos principais antibióticos utilizado na prática médica. In: _____. (Ed.). **Antibióticos**. 3. ed. São Paulo: Edgard Blucher; EDUSP, 1975. p. 1-54.

LANE, D.J.; PACE B.; OLSEN, G.J.; STAHL, D.A.; SOGIN, M. L.; PACE, N.R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 82, p. 6955-6959, 1985.

LEE, T.S.G. Micropropagação de cana-de-açúcar através de cultura de meristema apical. **Saccharum APC**, São Paulo, v. 7 p. 36-39, 1984.

_____. Micropropagation of sugarcane (*Saccharum spp.*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 10, p. 47-55, 1987.

LEGGATT, I.V.; WAITES, W.M.; LEIFERT, C.; NICHOLAS, J. Characterization of micro organisms isolated from plants during micropropagation. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 225, p. 93-102, 1988.

LEIFERT, C.; WOODWARD, S. Laboratory contamination management: the requirement for microbiological quality assurance. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 52, p. 83-88, 1998.

LEMKE, T.L. Antimycobacterial agents. In: WILLIAMS, D.A.; LEMKE, T.L. (Ed.). **Foye's principles of medicinal chemistry**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002. p. 904-923.

LUVIZOTTO, D.M.; MARCON, J.; ANDREOTE, F.D.; ANDREOTE, F.D.; NEVES, A.A.C. ARAUJO, W.L. Genetic diversity and plant-growth related features of *Burkholderia* spp. from sugarcane roots. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 26, n.10, p. 1829-1836, 2010.

MAGNET, S.; BLANCHARD, J.S. Molecular insights into aminoglycosides action and resistance. **Chemical Reviews**, Weinheim, v. 105, p. 477-498, 2005.

MAHUKU, G.S. A Simple Extration Method Suitable for PCR-Based Analysis of Plant, Fungal, and Bacterial DNA. **Plant Molecular Biology Reporter**, Canada, v. 22, p. 71-81, 2004.

MALHOTRA, S.D. Biotechnology and sugarcane. **International Sugar Journal**, New Orleans, v. 97, p. 160-163, 1995.

MAYER, G. **Antibiotics**: protein synthesis, nucleic acid synthesis and metabolism. 2006. Disponível em: <<http://pathmicro.med.sc.edu/fox/antibiotics1.htm>>. Acesso em: 05 jan. 2011.

MEDAU, R. Diversidade de bactérias *Burkholderia* em solo de Terra Preta Arqueológica da Amazônia por análise em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE) e sequenciamento. 2007. 71p. (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

MEDGRUPO. **Manual de antibioticoterapia**: residência médica. Rio de Janeiro: Medwriters Editora, 2008. 64 p.

MING, R.; MOORE, P.H.; WU, K.; D'HONT, A.; GLAZMANN, J.C.; TEW, T.L.; MIRKOV, T.E.; SILVA, J. da; JIFON, J.; RAI, M.; SCHNELL, R.J.; BRUMBLEY, S.M.; LAKSHMANAN, P.; COMSTOCK, J.C.; PATERSON, A.H. Sugarcane improvement through breeding and biotechnology. **Plant Breeding Reviews**, Brisbane, v. 27, p. 15-118, 2006.

MISAGHI, I.J.; DONNDELINGER, C.R. Endophytic bacteria in symptom free cotton plants. **Phytopathology**, St. Paul, v. 80, p. 808-811, 1990.

MISODOR. **Tetraciclina**. Disponível em: <<http://www.misodor.com/FARMACON/TETRACICLINA.html>>. Acesso em: 05 jan. 2011.

MITSCHER, L.A. Antibiotics and antimicrobial agents. In: WILLIAMS, D.A.; LEMKE, T.L. (Ed.). **Foye's principles of medicinal chemistry**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002. p. 819-866.

MOZAMBANI, A.E.; PINTO, A.S.; SEGATO, S.V.; MATTIUZ, C.F.M. História e morfologia da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S.V.; PINTO, A.S.; JENDIROBA, E.; NÓBREGA, J.C.M. de. **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: CP 2, 2006. p. 11-18.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 26, p. 473-497, 1962.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Taxonomy**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em 10 jan. 2011.

PEIXOTO NETO, P.A de S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Microrganismos endofíticos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 29, p. 70-84, 2003.

PEREIRA, J. E. S.; MATTOS, M.L.T.; FORTES, G.R. de L. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 38, n. 7, p. 827-834, 2003.

PHILLIPS, R.; ARNOTT, S.M.; KAPLAN, S.E. Antibiotics in plant tissue culture: rifampicin effectively controls bacterial contaminants without affecting the growth of short-term explant cultures of *Helianthus tuberosus*. **Plant Science Letters**, Limerick, v. 21, p. 235-240, 1981

POLLOCK, K.; BARFIELD, D.G.; SHIELDS, R. The toxicity of antibiotics to plant cell cultures. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 2, p. 36-39, 1983.

ORTOLAN, M.C.A. Perspectivas para o setor sucroalcooleiro brasileiro. In: SEGATO, S.V.; PINTO, A de S; JENDIROBA, E. (Ed.). **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: ESALQ, 2006. 415p.

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PASQUAL, M. Fases do cultivo “in vitro”. In: PASQUAL, M. **Introdução: fundamentos básicos**. Lavras: UFLA; FAEPE, 2001. p. 32-73.

PASQUAL, M.; CHALFUN, N.N.J.; RAMOS, J.D. Micropropagação. In: PASQUAL, M.; CHALFUN, N.N.J.; RAMOS, J.D. **Aplicações na propagação de plantas**. Lavras: UFLA; FAEPE, 2001. p. 25-72.

PATRICK, G.L. Antibacterial agents. In: PATRICK, G.L. **An introduction to medicinal chemistry**. 3rd ed. New York: Oxford University Press, 2005. p. 428-431.

PELCZAR, M.J.; CHANE, E.C.S.; KRIEG, R.N. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: McGraw-Hill, 1997. v. 2, 517 p.

PETERSDORF, R.G., PLORDE, J.J. The usefulness of “in vitro” sensitivity test in antibiotic therapy. **Annual Review of Medicine**, Palo Alto, v. 14, p. 41-56, 1963.

PINTO T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 325 p.

POLLOCK, K.; BARFIELD, D.G.; SHIELDS, R. The toxicity of antibiotics to plant cell cultures. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 2, p. 36-39, 1983.

RAMALHO, M.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.B. **Genética na agropecuária**. 7. ed. São Paulo: Globo, 2000. 359 p.

REUVENI, O.; SHLESINGER, D.R.; LAVI, U. In vitro clonal propagation of dioecious Carica papaya. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 20, p. 41-46, 1990.

RYAN, R.P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D.J.; DOWLING, D.N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 268, p. 1-9, 2008.

SADER, H.S.; PEREIRA, C.A.P. Antibióticos. In: BORGES, D.R.; ROTHSCILD, H.A. (Ed.). **Atualização terapêutica**: manual prático de diagnóstico e tratamento. 22. ed. São Paulo: Artes Médica, 2005. p. 368-390.

SANGUINO, A. Situação atual da pesquisa em doenças de cana-de-açúcar. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 24, p. 90-91, 1998.

SAVOIA, D.; ZUCCA, M. Clinical and environmental Burkholderia strains: biofilm production and intracellular survival. **Current Microbiology**, New York, v. 54, p. 440-444, 2007

SCARAMUCCI, J.A.; PERIN, C.; PULINO.; ORLANDO, F.J.G.; BORDONI, M.P.C.; CORTEZ, L.A.B. Energy from sugarcane bagasse under electricity rationing in Brazil: a computable general equilibrium model. **Energy Policy**, Londres, v. 34, p. 986-992, 2006.

SCARPARI, M.S.; BEAUCLAIR, E.G.F. Anatomia e botânica. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. (Ed.). **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2008. v. 1, p. 45-56.

SEJAS, L.M.; SILBERT, S.; REIS, A.O.; SADER, H.S. Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 1, p. 27-35, 2003.

SILVA, J.R.C.; SOUZA, R.M.; ZACARONE, A.B.; SILVA, L.H.C.P.; CASTRO, A.M.S. Bactérias endofíticas no controle e inibição *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv *tomato*, agente da pinta bacteriana do tomateiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 4, p. 1062-1072, 2008.

SILVA, R.L.O.; LUZ, J.S.; SILVEIRA, E.B.; CAVALCANTE, U.M.T. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). **Acta Botânica. Brasilica**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 649-655, 2006.

SPINOSA, H.S.; GORNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. Agentes antimicrobianos. Rio de Janeiro. Guanabara-Koogan, p. 333-386, 1996.

SUGARCANECROPS. **Introduction**. 2010. Disponível em: <<http://www.sugarcane crops.com>>. Acesso em: 13 out. 2010.

TARAZI, M.F.A.; NAVARRETE, A.A.; ANDREOTE F.D.; ALMEIDA C.V.; TSAI S.M.; ALMEIDA M. Endophytic bacteria in long-term in vitro cultivated “axenic” pineapple microplants revealed by PCR–DGGE. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 26, n. 3, p. 555-560, 2010.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos para o estudante de medicina**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1988. 348 p.

TORRES, A.C.; TEIXEIRA, S.L.; POZZEWR, L. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, A.J. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação de plantas**. Brasília: EMBRAPA, SPI; CNPH, 1998. v. 1, p. 183-260.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DA CANA-DE-AÇÚCAR. **Setor Sucroenergético – Mapa da Produção, 2010**. Disponível em: <<http://www.unica.com.br>>. Acesso em: 15 out. 2010.

VIANNA, G.R.; COUTO, F.A.A.; OLIVEIRA, A B.; ZAMBOLIM, L.; MARIA, J. A rifampicina na descontaminação bacteriana de explantes de mamoeiro provenientes do campo. **Bragantia**, Campinas, v. 56, n. 2, p. 249-254, 1997.

WALSH, C. Antibiotics that block DNA replication and repair: the quinolones. In: _____. (Ed.). **Antibiotics: actions, origins, resistance**. Washington: American Society for Microbiology, 2003. p. 71-78.

_____. Other targets of antibacterial drugs. In: _____. (Ed.). **Antibiotics: actions, origins, resistance**. Washington: American Society for Microbiology, 2003. p. 79-88.

ZINNIEL, D.K.; LAMBRECHT, N.; HARRIS, B.; FENG, Z.; KUEZMARSKI, D.; HIGLEY, P.; ISHIMARU, C.A.; ARUNAKUMARI, A.; BARLETTA, R.G.; VIDAVER, A.K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 2198-2208, 2002.