# MICROBIOLOGIA AMBIENTAL

PROFA. DRA. PATRICIA DALZOTO
PROFA. DRA. IDA CHAPAVAL PIMENTEL
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA BÁSICA
LABMICRO

# Microbiologia

- http://people.ufpr.br/~microgeral/
- http://people.ufpr.br/~labmicro/

# Microbiologia

Departamento de Patologia Básica

UFPR

June 1, 2010

- Home
- Graduação
- Pós-Graduação
- Avisos
- Referências
- Links
- Fotos
- Contato

## Microbiologia Geral

**NOTAS Engenharia Florestal**

**NOTAS BP001** NEW

O Departamento de Patologia Básica da UFPR oferta disciplinas de Microbiologia para todos os cursos de graduação da área Biológica. Também conta com disciplinas nos Programas de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia; Genética e Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental

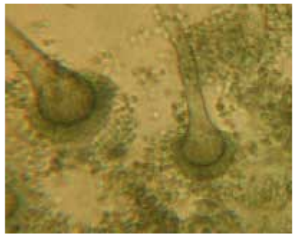
Aqui você encontra informações sobre as

Links relacionados

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia - UFPR
Leia mais >

LabMicro - Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular - UFPR
Leia mais >

Internet | Modo Protegido: Desativado 100%



**Fale conosco:**

**E-mail**: **microgeral@ufpr.br**

**Fone:** 55(41) 33611573 / Fax: 55(41) 32662042

**Endereço**: Universidade Federal do Paraná | Setor de Ciências Biológicas | Departamento de

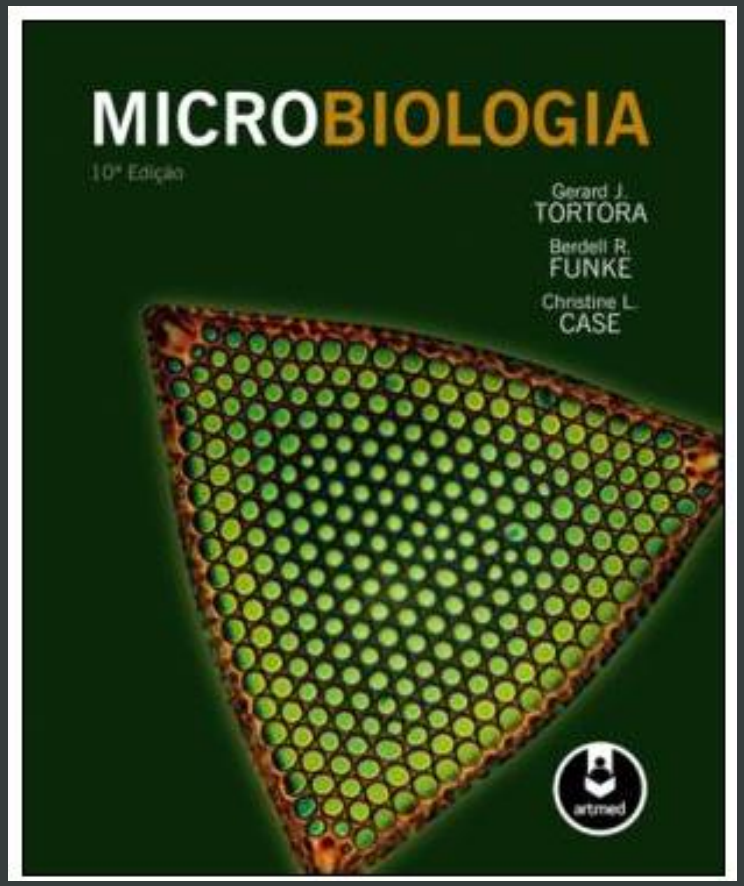
## LabMicro - UFPR

O **LabMicro - UFPR** desenvolve projetos aplicados às diversas áreas da **Microbiologia**, envolvendo desde o isolamento de microrganismos do ambiente (incluindo caracterização por meio de marcadores morfológicos, fisiológicos e genéticos), até o entendimento da epidemiologia e diagnóstico de doenças.

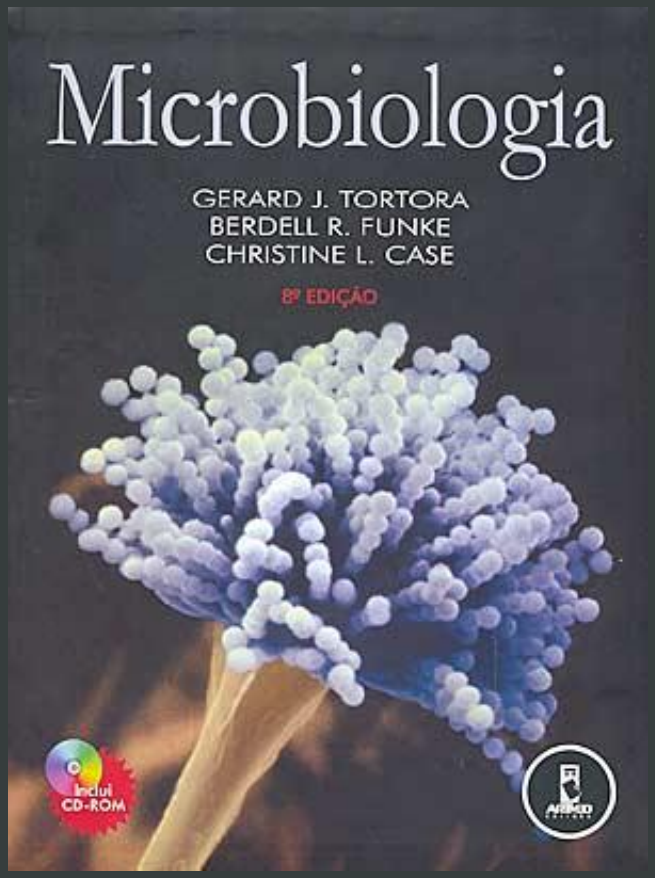
O grupo de pesquisa do **LabMicro - UFPR** é composto por professores do **Departamento de Patologia Básica**, estudantes de pós-graduação e de graduação do **Setor de Ciências Biológicas, Setor de Tecnologia e Setor de Ciências Agrárias**. O desenvolvimento dos projetos resulta em dissertações de mestrado e trabalhos de iniciação científica, publicações em periódicos indexados e, também, em apresentações em congressos nacionais da área.

Os convênios firmados entre UFPR e FUNPAR vêm contribuindo

# Bibliografia recomendada



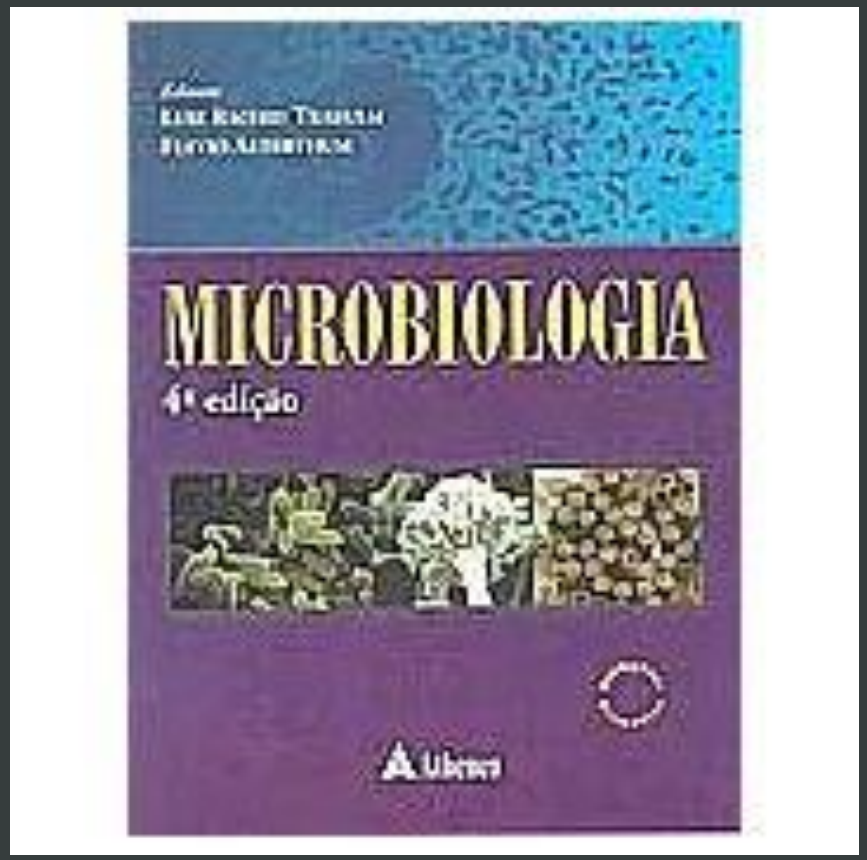

TORTORA, 2011




TORTORA, 2005

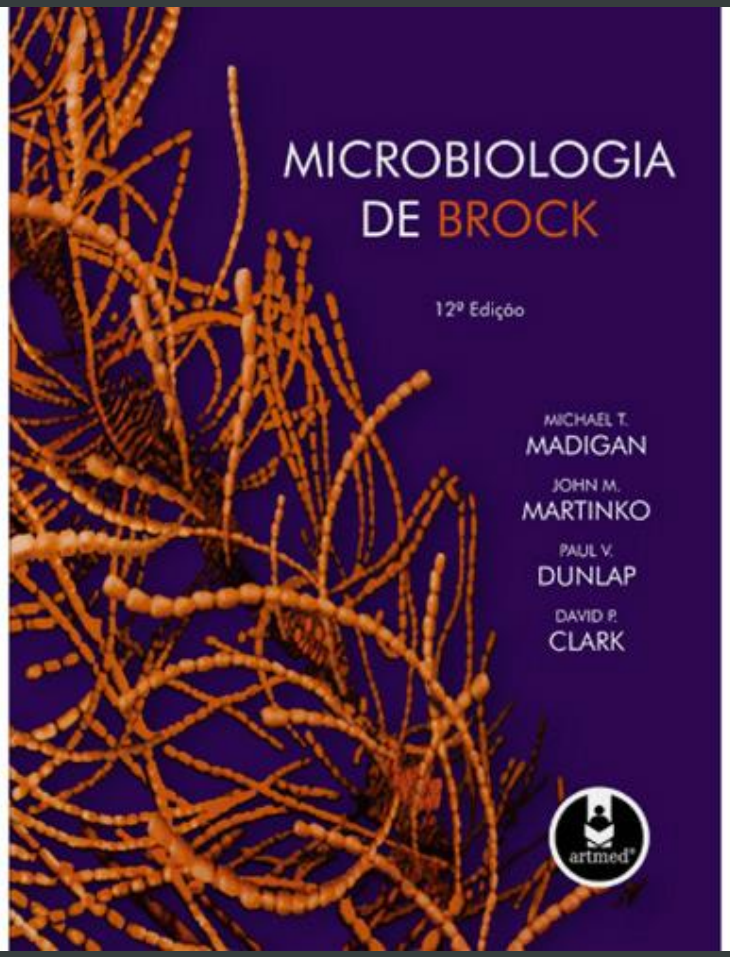
# Bibliografia recomendada

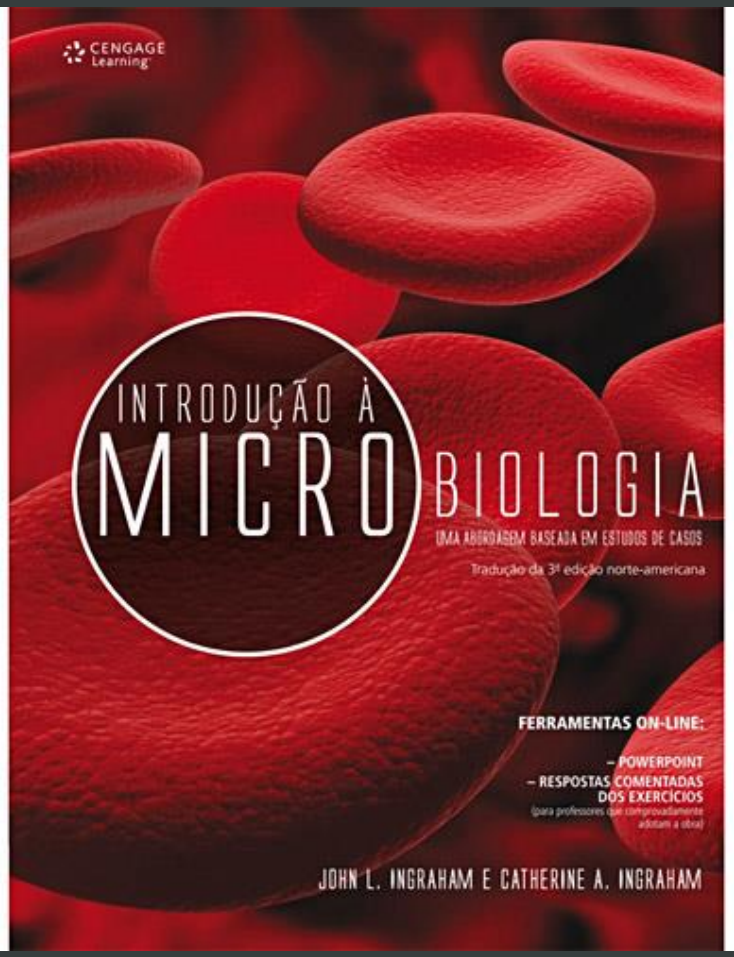
TORTORA, 2008.
Microbiologia




TRABULSI, 2004
Microbiologia

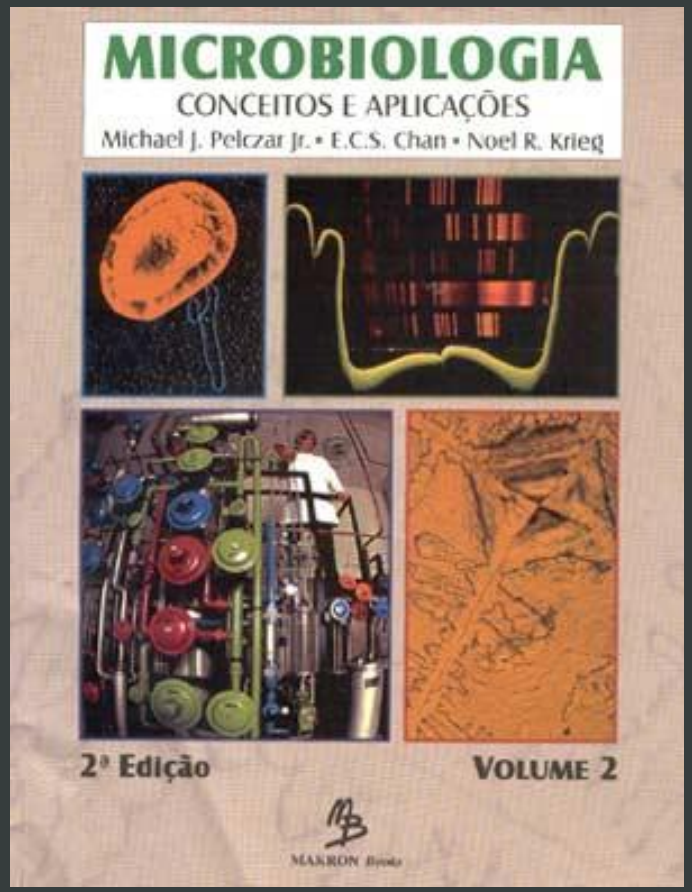
# Bibliografia recomendada




Microbiologia de Brock, 2010 Introdução à Microbiologia, 2011

# Bibliografia recomendada




PELCZAR, 1996. Microbiologia

# Bibliografia recomendada

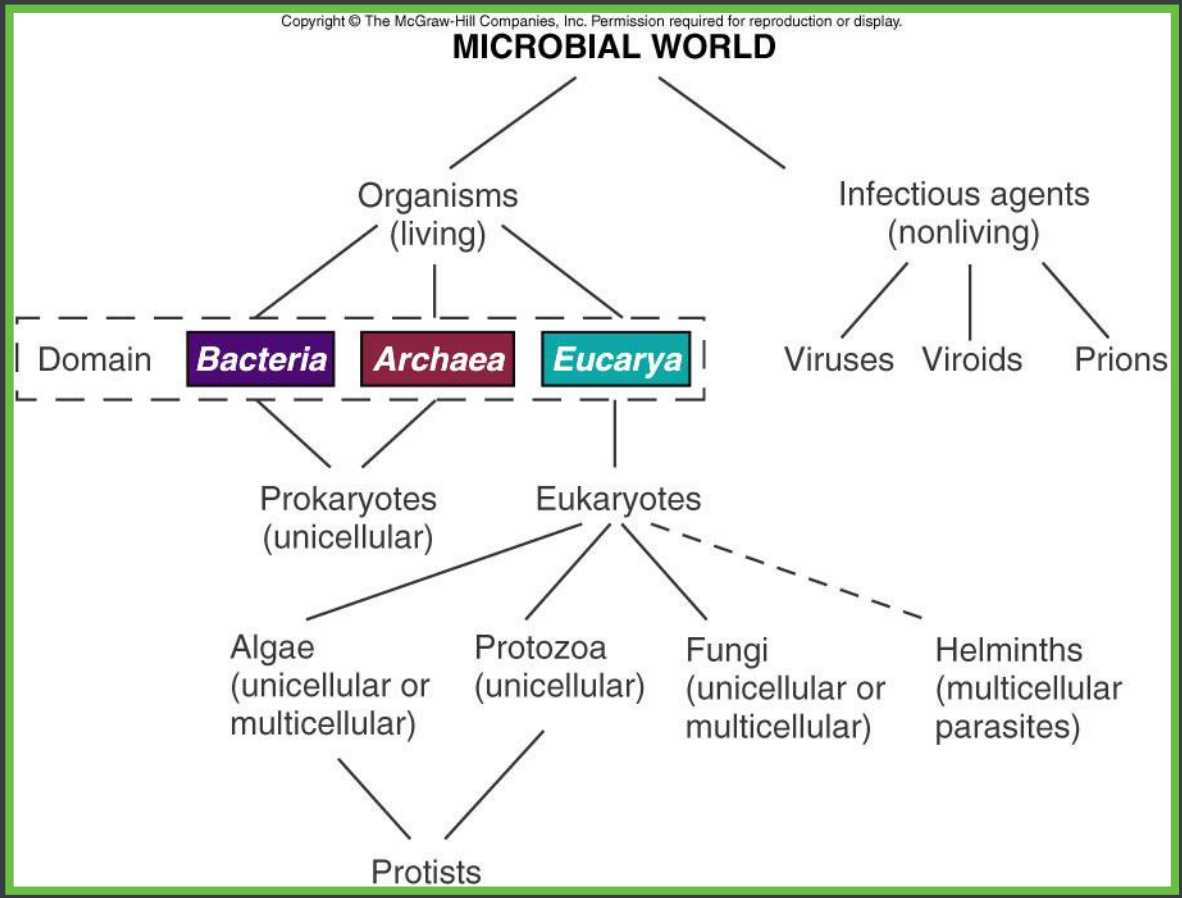
| Data | Assunto |
|---|---|
| 13/02 | Introdução sobre a disciplina<br>Ecologia Microbiana – Fungos Endofíticos<br>Ecologia Microbiana – Micorrizas |
| 20/02 | Microbiologia do solo; Fixação biológica de nitrogênio<br>Isolamento de bactérias fixadoras de nitrogênio |
| 27/02 | Actinobactérias – aplicações biotecnológicas |
| 06/03 | Preparo de seminários – prazo para envio de artigos 13/03 |
| 13/03 | Actinobactérias – aplicações biotecnológicas |
| 20/03 | Microbiologia da água |
| **27/03** | **1ª Avaliação** |
| 03/04 | Identificação de micro-organismos por biologia molecular |
| 10/04 | Identificação de micro-organismos por biologia molecular |
| 17/04 | Controle biológico |
| 24/04 | Biofilmes e quorum sensing |
| **01/05** | **Feriado** |
| 08/05 | Seminários |
| 15/05 | Seminários |
| 22/05 | Visita SENAI |
| **29/05** | **2ª Avaliação** |
| **12/06** | **Recesso** |
| **17/07** | **Exame final** |

## Avaliação

- Prova teórico-prática
- Participação em aulas
- Seminários
  - Cada aluno apresentará um seminário sobre um artigo científico
  - Artigos publicados de **2010 até 2014**
  - **Periódicos**:
    - Environmental Microbiology
    - Applied and Environmental Microbiology
    - Microbes and Environmental
    - Journal of Microbiology and Biotechnology

# Microbiologia

# Microbiologia



# Perspectivas históricas da Microbiologia

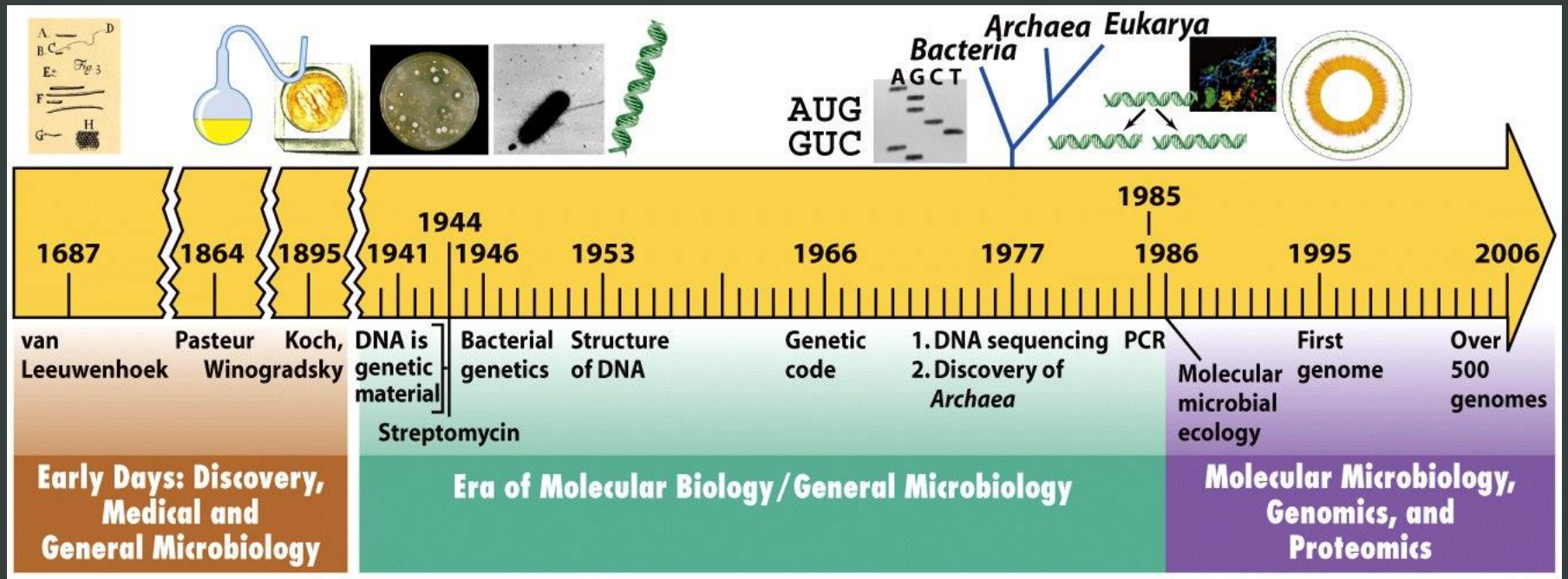
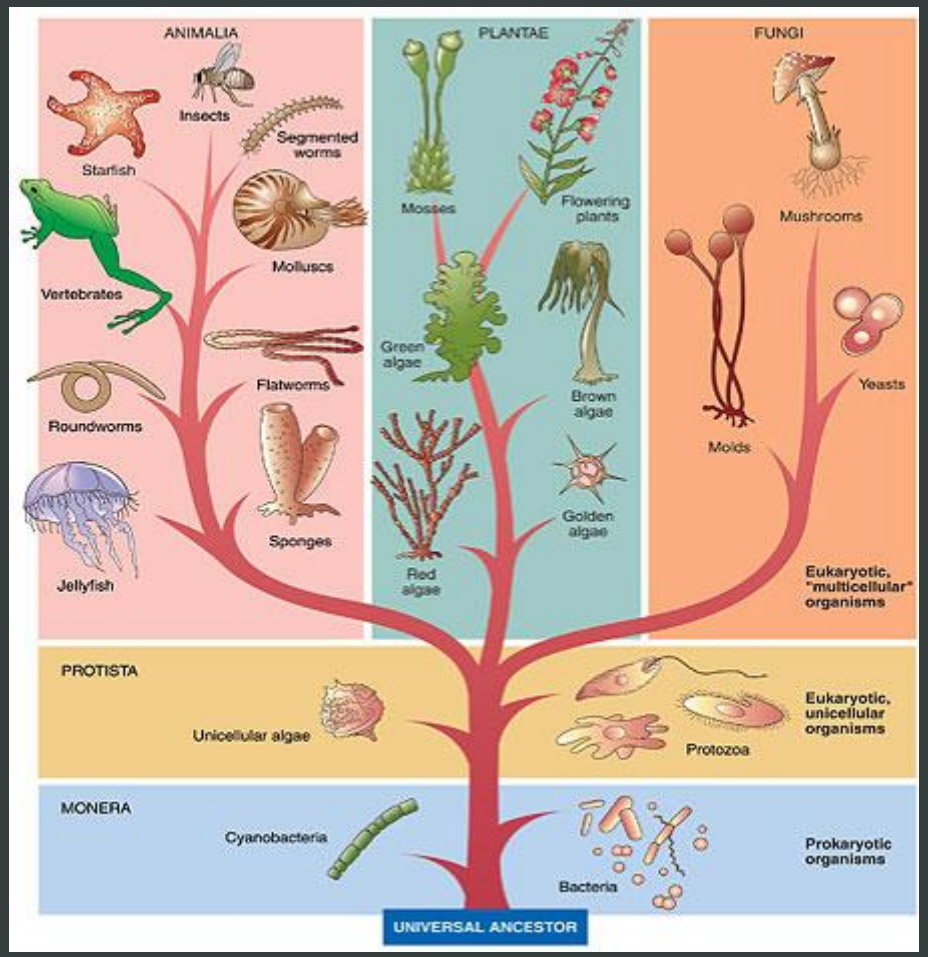



Figure 1-17 Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

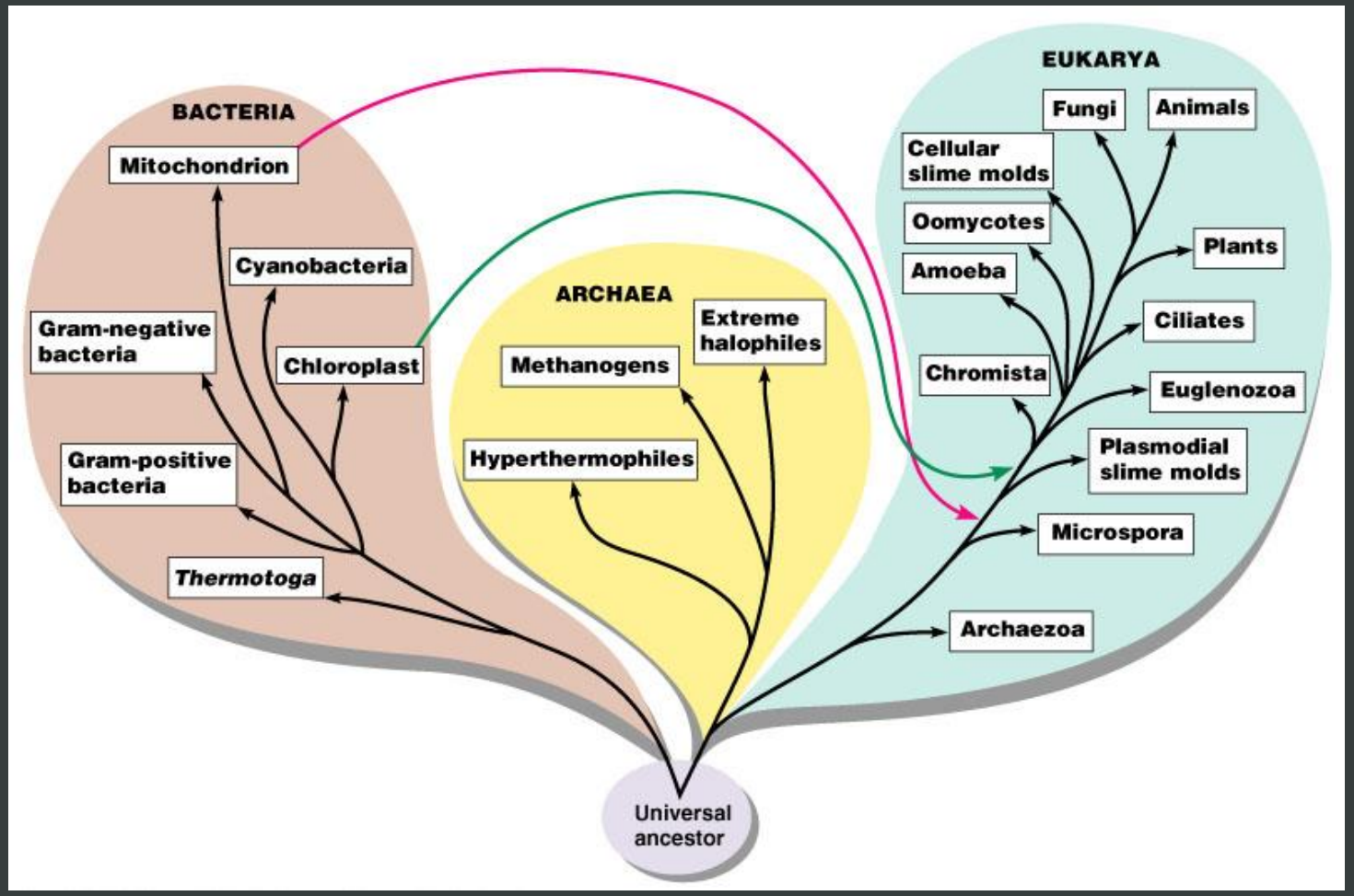
# Classificação dos seres vivos

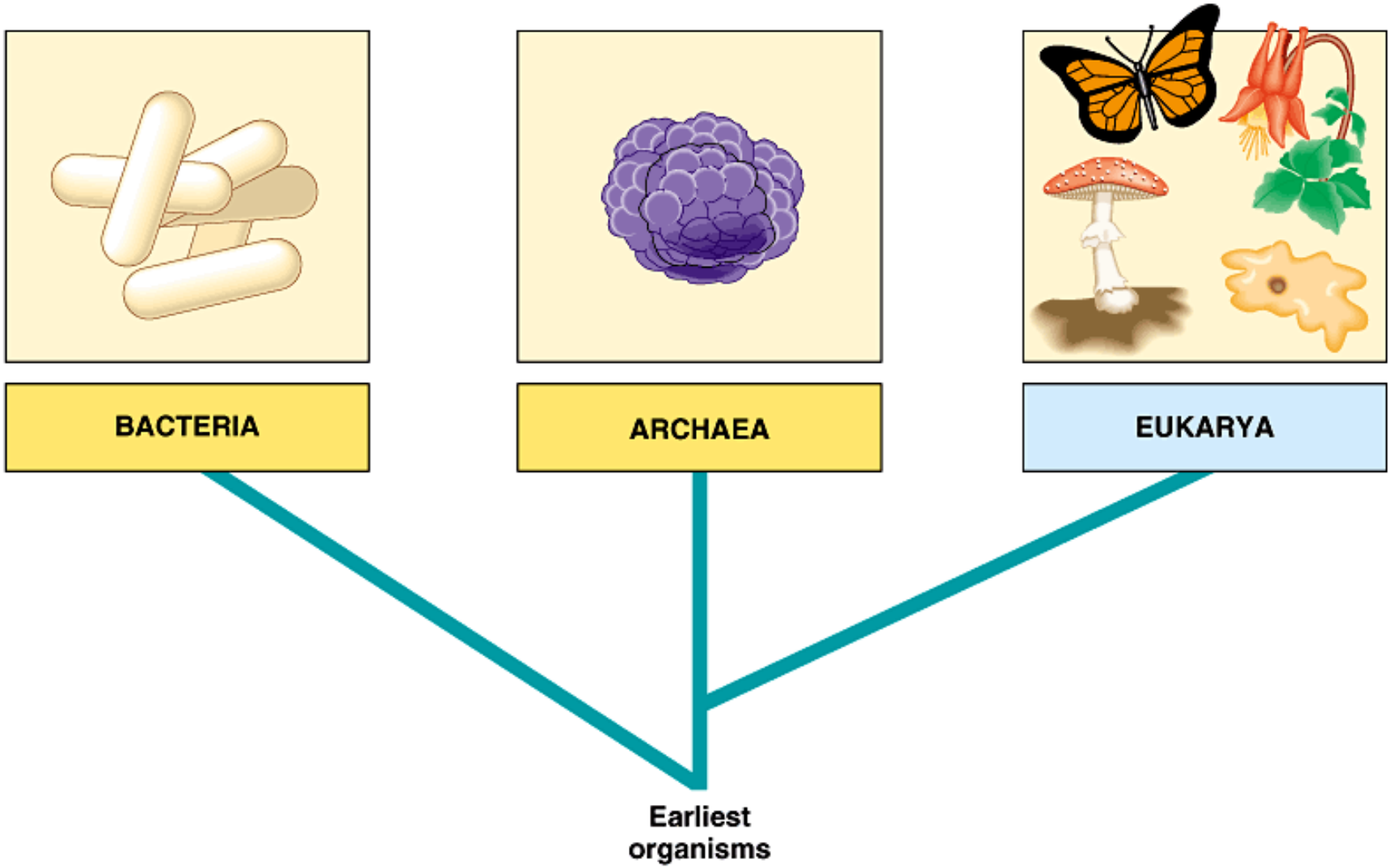
- Whitaker, 1959



# Classificação dos seres vivos

- 1978 – Carl Woese






Copyright © 2003 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

## Importância dos micro-organismos

- Industrial: fermentação – etanol, acetona, ácidos orgânicos.
- Alimentos: Vinho, queijo, iogurte, pão, conservas.
- Biotecnologia: produtos recombinantes – insulina humana, vacinas .

## TABLE 28.5 Microbial Enzymes Produced Commercially

| Enzyme | Microorganism | Use of Enzyme |
|---|---|---|
| α-Amylase | *Aspergillus* spp. (mold) | Laundry detergent |
| β-Amylase | *Bacillus subtilis* | Brewing |
| Cellulase | *Trichoderma viride* (yeast) | Fruit juices, coffee, paper |
| Invertase | *Saccharomyces cerevisiae* (yeast) | Candy manufacture |
| Lactase | *S. fragilis* (yeast) | Digestive aid, candy manufacture |
| Lipase | *Aspergillus niger* | Laundry detergent, tanning leather, cheese production |
| Oxidases | *A. niger* | Paper bleaching and fabrics, glucose test papers |
| Pectinase | *A. niger* | Fruit juice |
| Proteases | *A. oryzae* | Meat tenderizer, digestive aid, tanning leather |
| Rennin (chymosin) | *Mucor* (mold), *Escherichia coli* | Cheese production |
| Streptokinase | Group C beta-hemolytic *Streptococcus* | Lysis of blood clots |

Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

## Importância dos micro-organismos

- Ambiental  e Aplicada
  - Energia para os ecossistemas
  - Fixadores de matéria orgânica
  - Decompositores
  - Simbioses
    - Líquens
    - Endofíticos
    - Micorrizas

## Importância dos micro-organismos

- Ambiental e Aplicada
  - Biorremediação
  - Controle biológico
  - Biocorrosão
  - Qualidade da água
  - Segurança alimentar
  - Biotecnologia
  - Diagnóstico

# Microbiologia Ambiental

## Microbiologia ambiental

- Estudo dos micro-organismos e suas atividades no ambiente para o entendimento do seu papel na manutenção da biosfera e seu uso potencial na remediação de locais que tenham sido modificados.

## Microbiologia aplicada

- Exploração de micro-organismos, suas atividades e seus produtos para o benefício da sociedade.

## Ecologia microbiana

- Estudo das interações entre populações de micro-organismos e entre estas populações e outros organismos de outros níveis tróficos.

## Table 1.3

Selected landmark events in the history of environmental microbiology

- The first visualization of microscopic life by van Leeuwenhoek in 1684
- The role of microorganisms as causative agents of fermentations discovered by Pasteur in 1857
- The use of gelatin plates for enumeration of soil microorganisms by Koch in 1881
- Nitrogen fixation by nodules on the roots of legumes discovered by Hellriegel and Wilfarth in 1885
- The use of elective enrichment methods, by Beijerinck and Winogradsky, in the isolation of single organisms able to carry out ammonification, nitrification, and both symbiotic and nonsymbiotic nitrogen fixation
- Recognition of the diverse populations in soil (e.g., bacteria, fungi, algae, protozoa, nematodes, insect larvae)
- Documentation of anaerobic cellulose decomposition by Omelianskii in 1902
- The study of sulfur-utilizing phototrophic bacteria by van Niel and others
- The specificity of legume-nodulating bacteria (Fred et al., 1932)
- The discovery and development of antibiotics
- Direct microscopic methods of examining environmental microorganisms via staining and contact-slide procedures
- The development of radiotracer techniques
- A diversity of advancements in analytical chemistry for detecting and quantifying biochemically and environmentally relevant compounds
- Developments in molecular phylogeny (Woese, 1987, 1992; Pace, 1997)
- The application of molecular methods to environmental microbiology (Olsen et al., 1986; Pace et al., 1986; Amann et al., 1991, 1995; Ward et al., 1993; White, 1994; van Elsas et al., 1997; Madigan and Martinko, 2006)

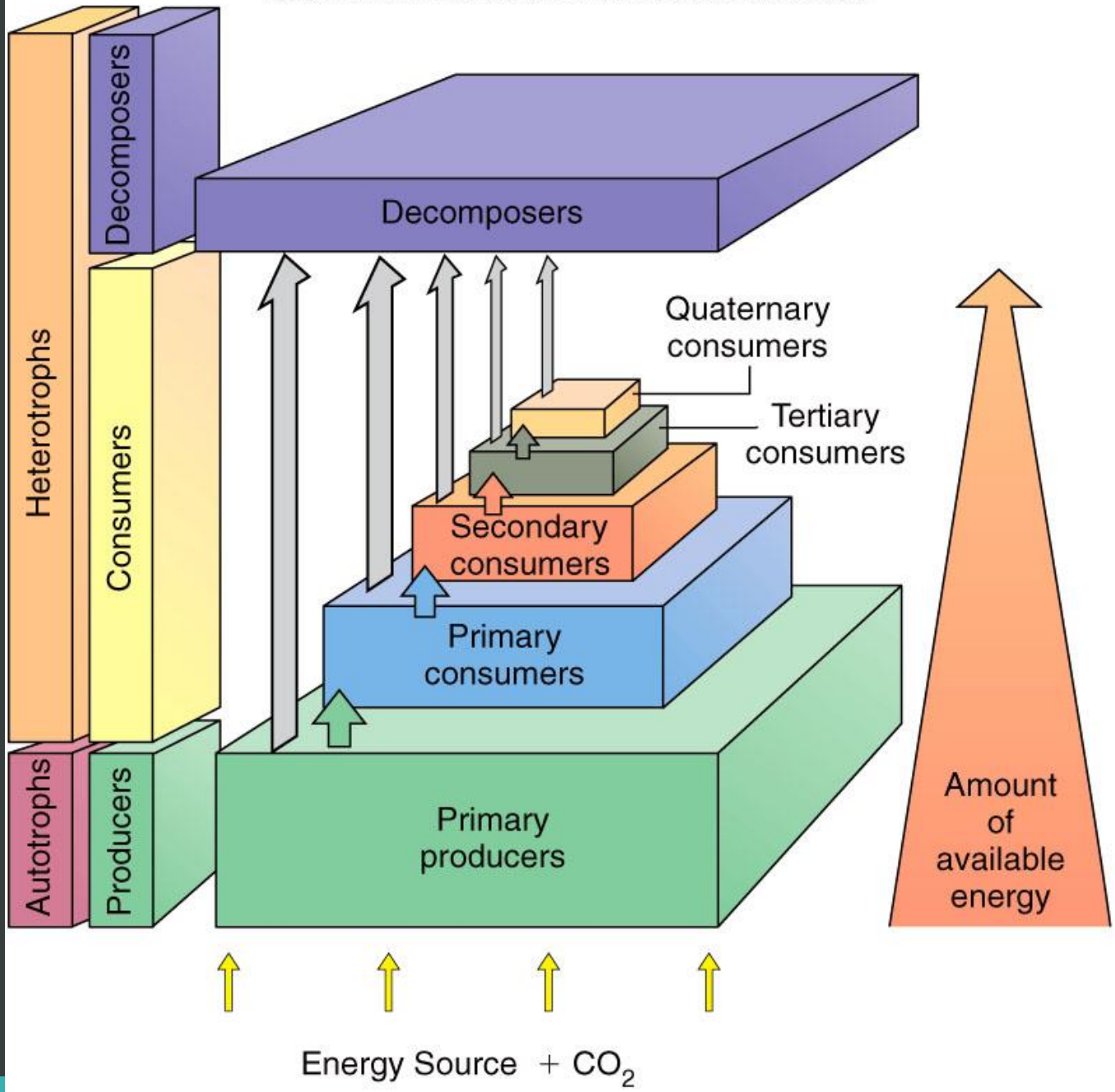
## Diversidade biológica

- 5 milhões de micro-organismos – estimativa
- 100.000 identificados por marcadores (metagenômica)
- Mais de 10.000 espécies de bactérias.
- Estima-se que existam 1,5 milhões de espécies de fungos, porém são conhecidas cerca de 69.000.

Acredita-se que 99% dos micro-organismos não são cultiváveis

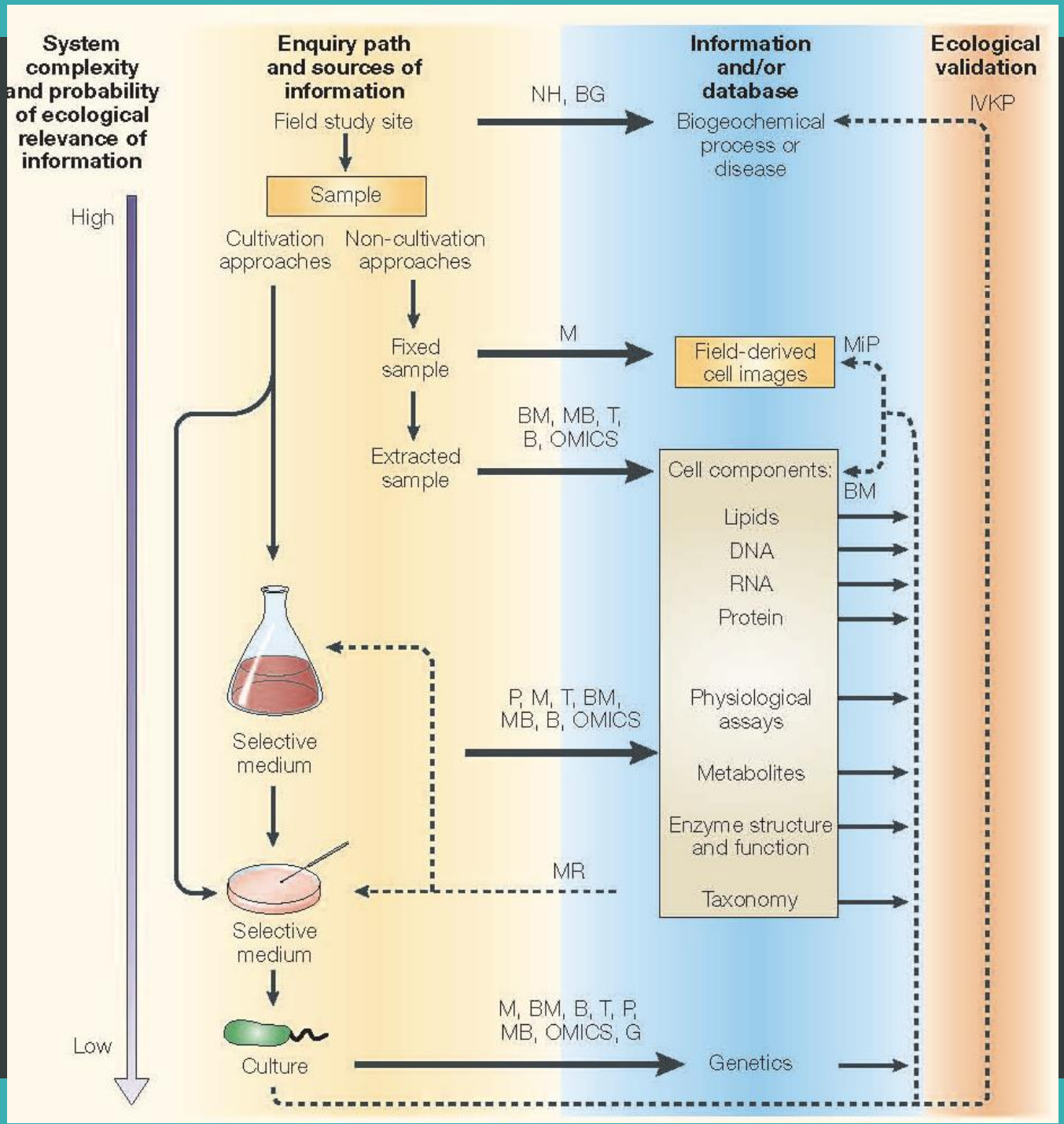
| Habitat | Culturability (%) |
|---|---|
| Seawater | 0.001–0.1 |
| Freshwater | 0.25 |
| Mesotrophic lake | 0.1–1 |
| Unpolluted estuarine waters | 0.1–3 |
| Activated sludge | 1–15 |
| Sediments | 0.25 |
| Soil | 0.3 |

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.



# Microbiologia Ambiental

- Microbiologia do solo
- Descarte de poluentes/ Biorremediação
- Microbiologia industrial
- Segurança alimentar
- Segurança Ocupacional/ Controle da saúde
- Microbiologia diagnóstica
- Biotecnologia
- Qualidade da água
- Microbiologia aquática
- Microbiologia do ar


System complexity and probability of ecological relevance of information
High
Low
Enquiry path and sources of information
Field study site
Sample
Cultivation approaches
Non-cultivation approaches
Fixed sample
Extracted sample
Selective medium
Selective medium
Culture
Information and/or database
Biogeochemical process or disease
Field-derived cell images
Cell components:
Lipids
DNA
RNA
Protein
Physiological assays
Metabolites
Enzyme structure and function
Taxonomy
Genetics
Ecological validation
NH, BG
M
BM, MB, T, B, OMICS
P, M, T, BM, MB, B, OMICS
MR
M, BM, B, T, P, MB, OMICS, G
IVKP
MiP
BM

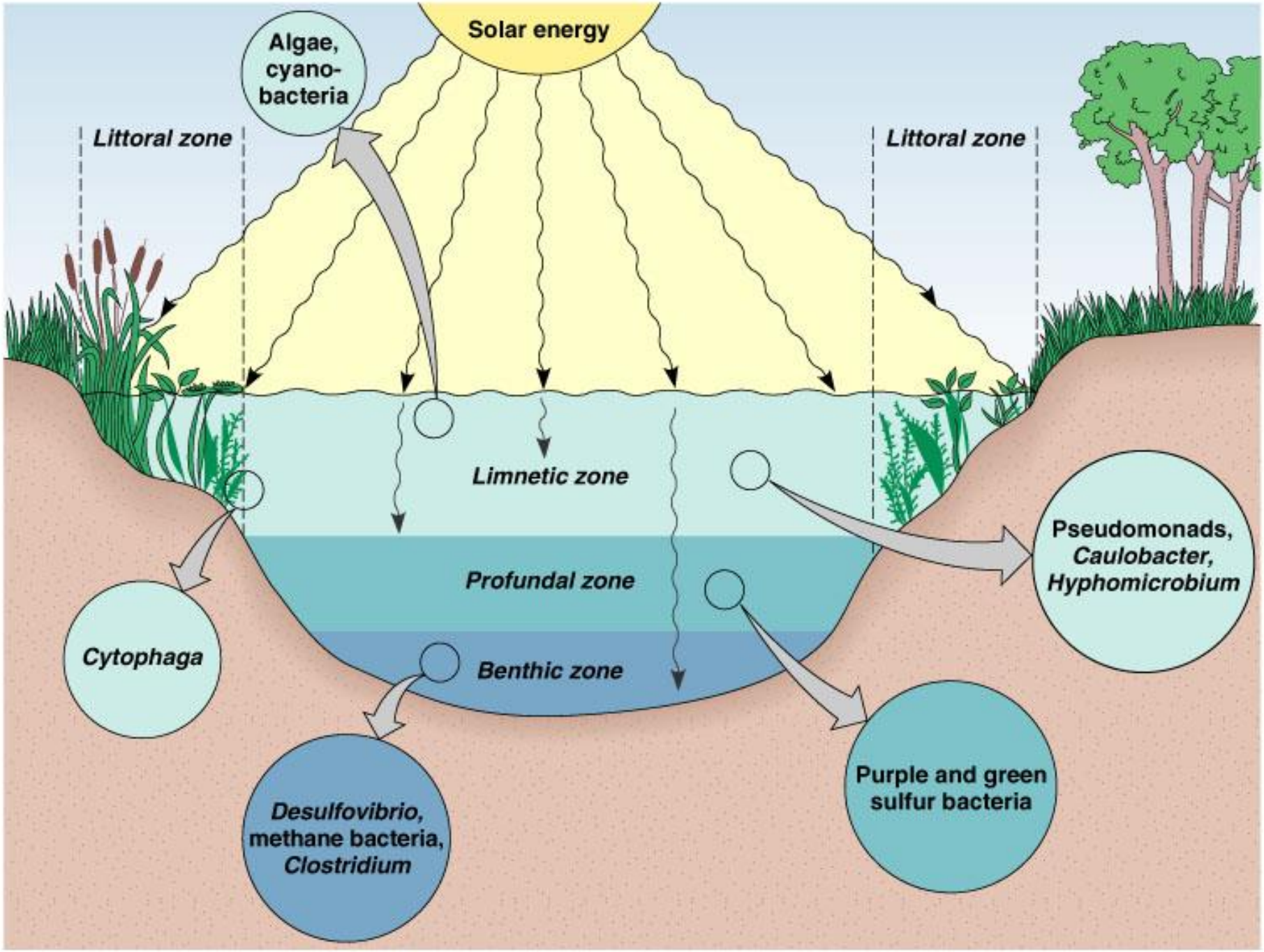
## Micro-organismos e o ambiente

- Micro-organismos estão em todos os lugares.
- Dentro e sobre o corpo de animais.
- Nos objetos que tocamos, usamos, comemos e bebemos.
- Superfícies imersas – biofilmes.
- Plantas.
- No interior da terra.
- Extraterrestres?

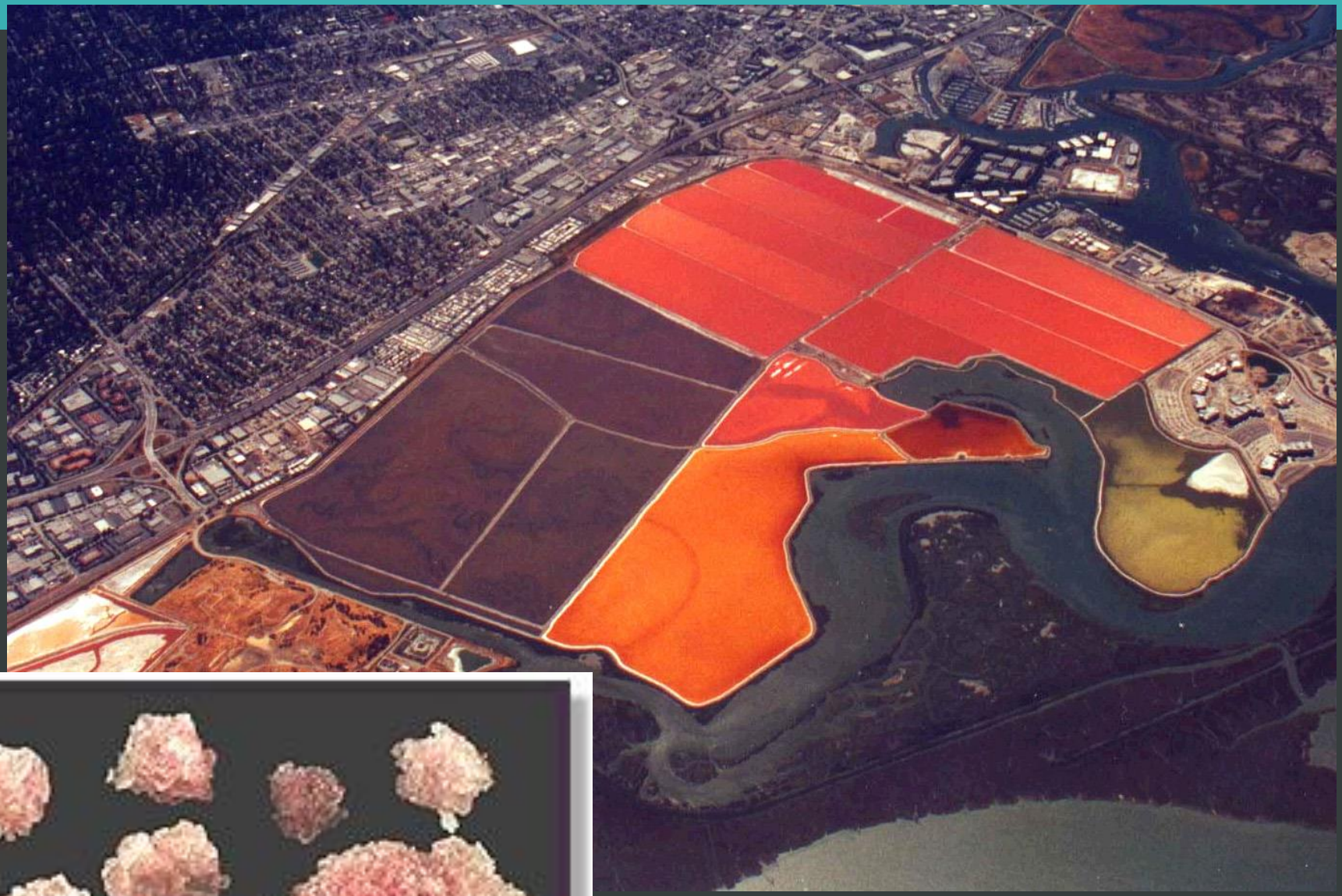
| TABLE 27.1 | Microorganisms per Gram of Typical Garden Soil at Various Depths | | | |
|---|---|---|---|---|
| Depth (cm) | Bacteria | Actinomycetes* | Fungi | Algae† |
| 3–8 | 9,750,000 | 2,080,000 | 119,000 | 25,000 |
| 20–25 | 2,179,000 | 245,000 | 50,000 | 5000 |
| 35–40 | 570,000 | 49,000 | 14,000 | 500 |
| 65–75 | 11,000 | 5000 | 6000 | 100 |
| 135–145 | 1400 | — | 3000 | — |

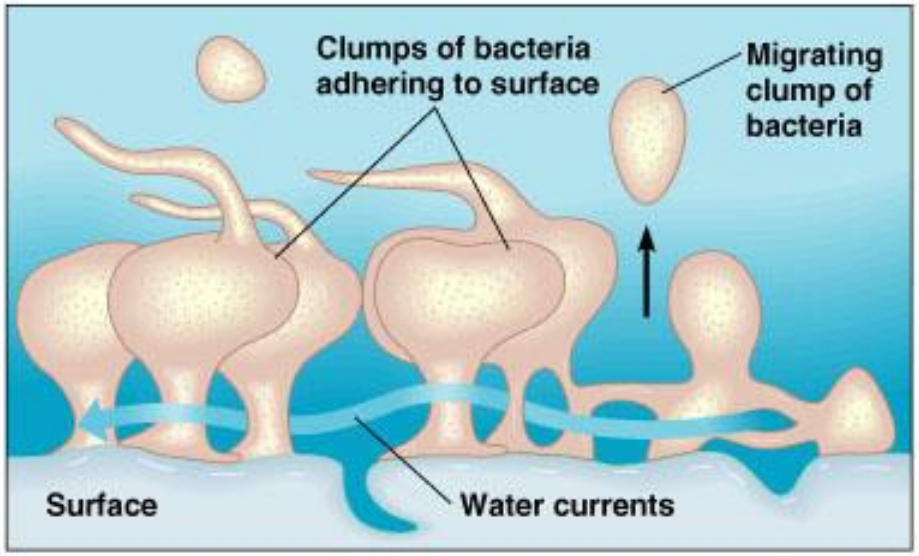
*Filamentous bacteria
†Algae found at lower depths are not metabolically active but were probably introduced by drainage or mechanical movement.
SOURCE: Adapted from M. Alexander, *Introduction to Soil Microbiology*, 2nd ed. New York: Wiley, 1991.

Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

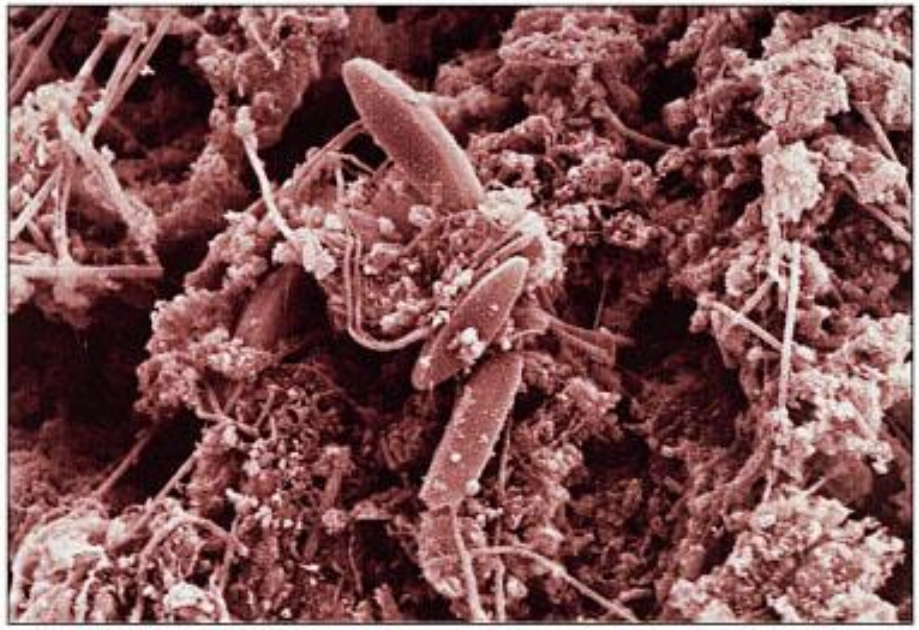



Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.





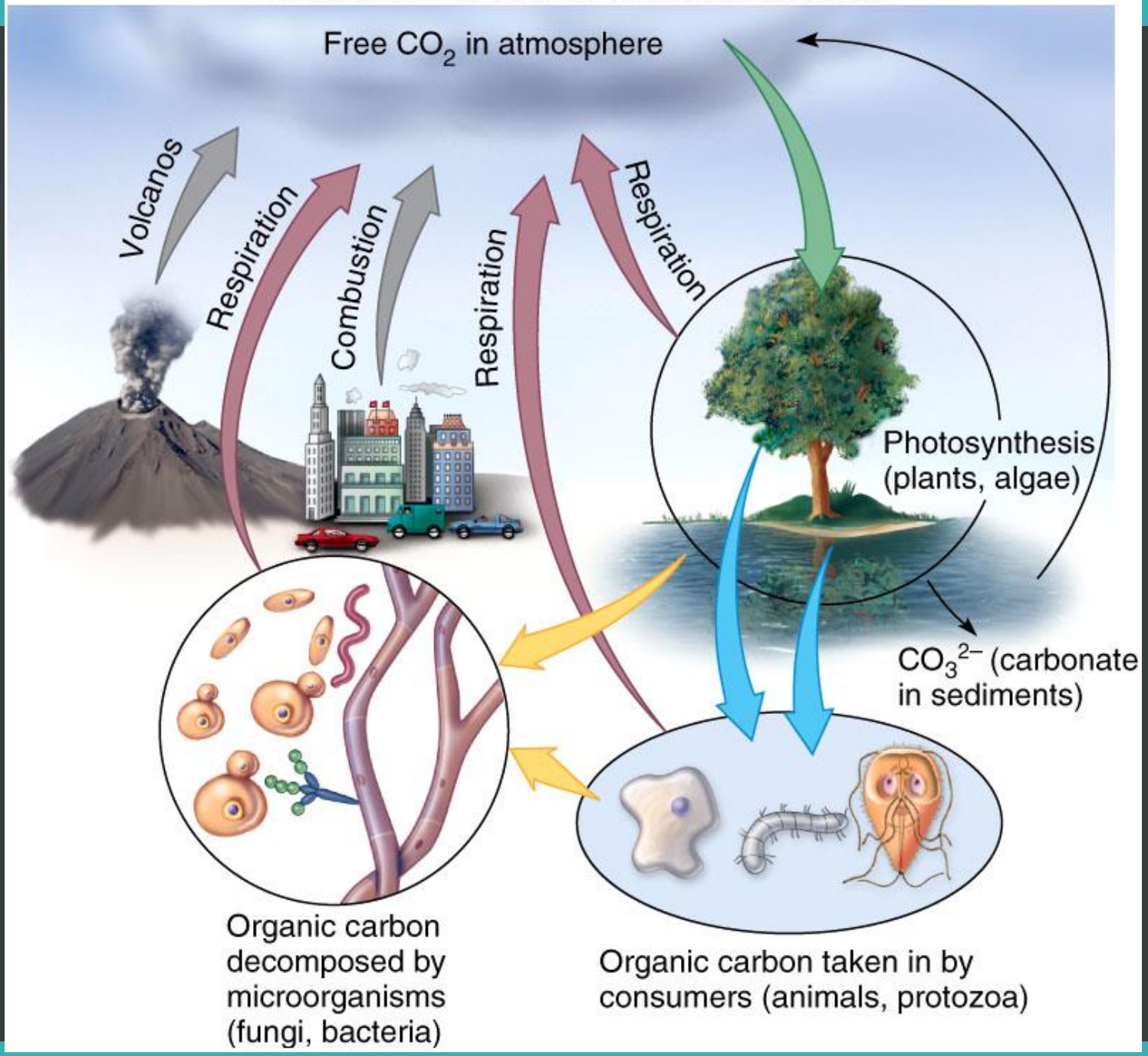

**(a)** Water currents move, as shown by the blue arrow, among pillars of slime formed by the growth of bacteria attached to solid surfaces. This allows efficient access to nutrients and removal of bacterial waste products. Individual slime-forming bacteria or bacteria in clumps of slime detach and move to new locations.



**(b)** A bacterial biofilm that formed on a steel surface over two months in an industrial water system. The large oval bodies are diatoms that became entrapped in the sticky biofilm.

Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.

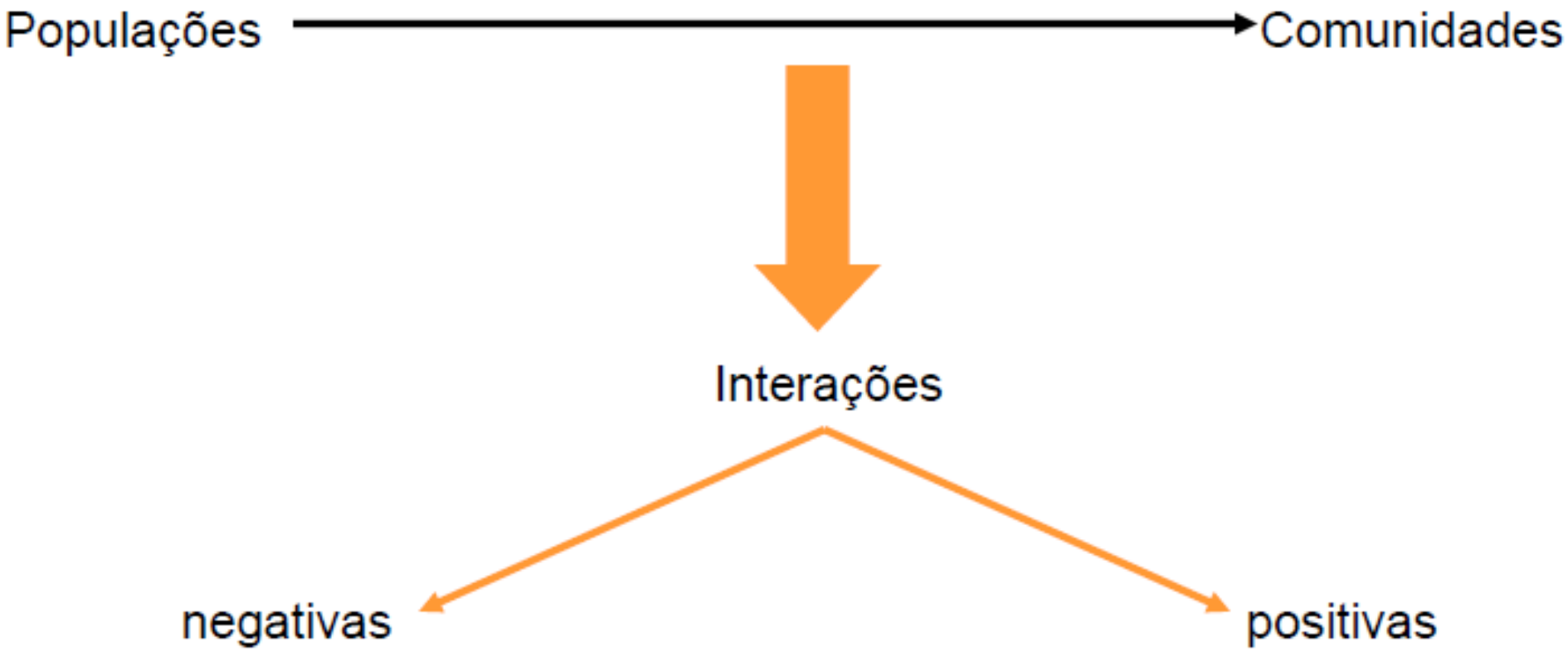


# Ecologia Microbiana

## Ecologia Microbiana

- Relações entre plantas e micro-organismos.
- Relações entre animais e micro-organismos.
- Microbiologia do Solo .
- Microbiologia do Ar.
- Microbiologia da Água.

# Interações



## Interações positivas - cooperação

- *Quorum sensing.*
  - Acesso a novas fontes de nutrientes ou habitats.
  - Mecanismo protetor.
  - Trocas genéticas: conjugação, transformação, transdução.

## Interações negativas - competição

- Substratos, hospedeiros ou presas disponíveis.
- Acumulação de substâncias tóxicas (alta densidade populacional).
- Genes que codificam substâncias inibidoras ou letais ex.: bacteriocinas.

## Interações entre diferentes espécies

- Neutralismo
- Comensalismo
- Competição
- Predação

## Interações entre diferentes espécies

- Simbiose
  - Obrigatoriedade.
  - bi-direcional.
  - proximidade física.
  - Especializada.

## Relações simbióticas

- Líquens
- Micro-organismos do rúmen
- Endofíticos
- Micorrizas

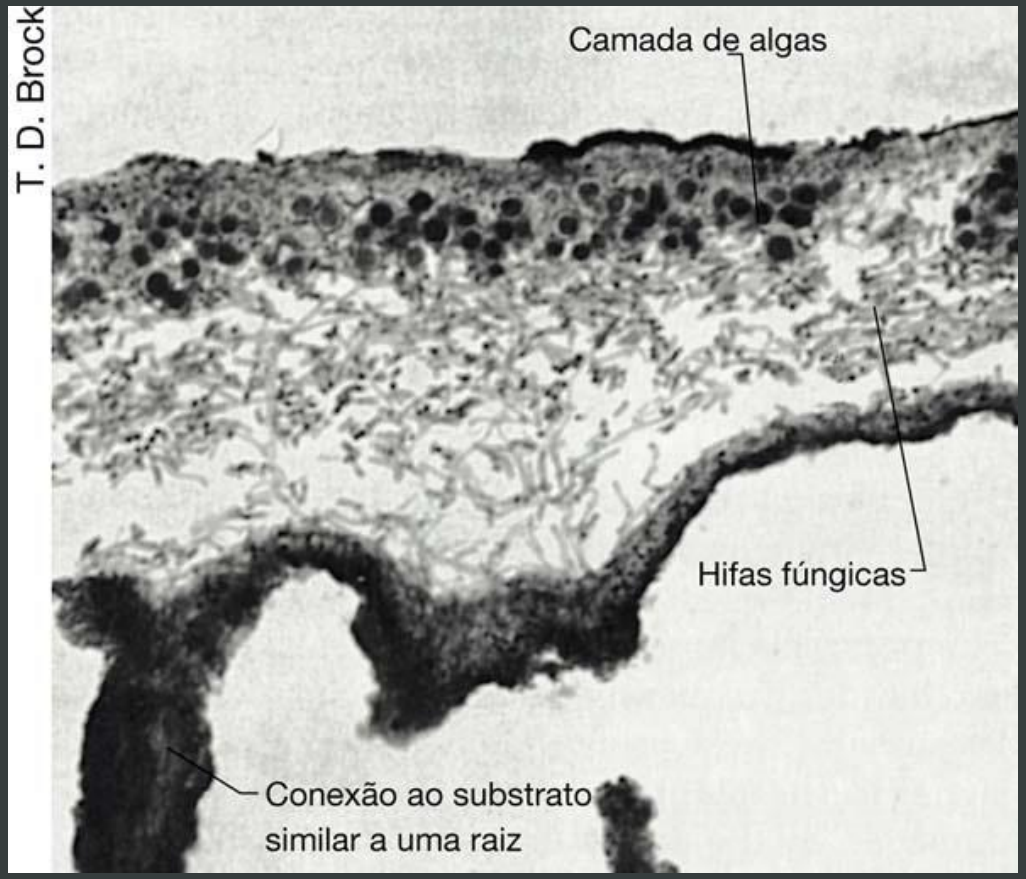
# Líquens

# Líquens

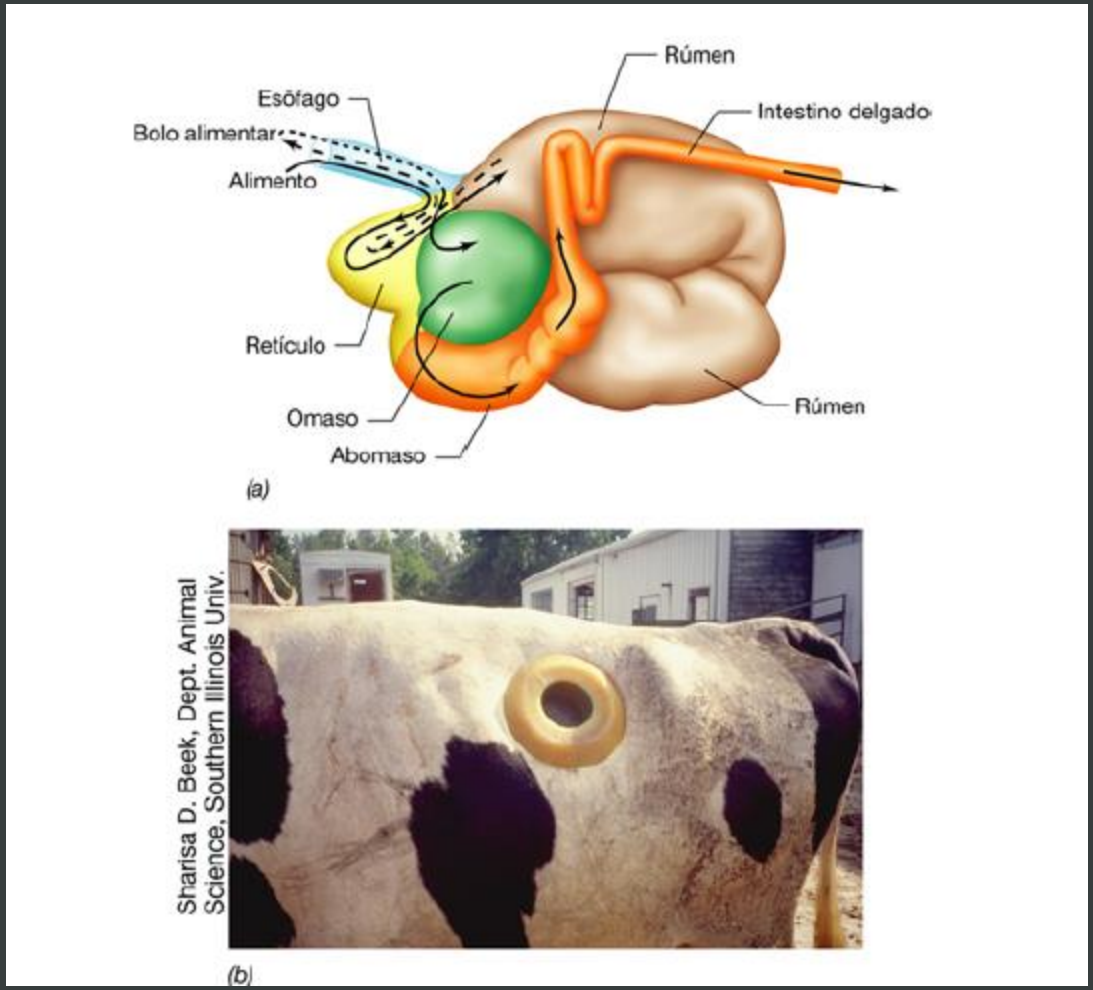
M. T. Madigan

(b)

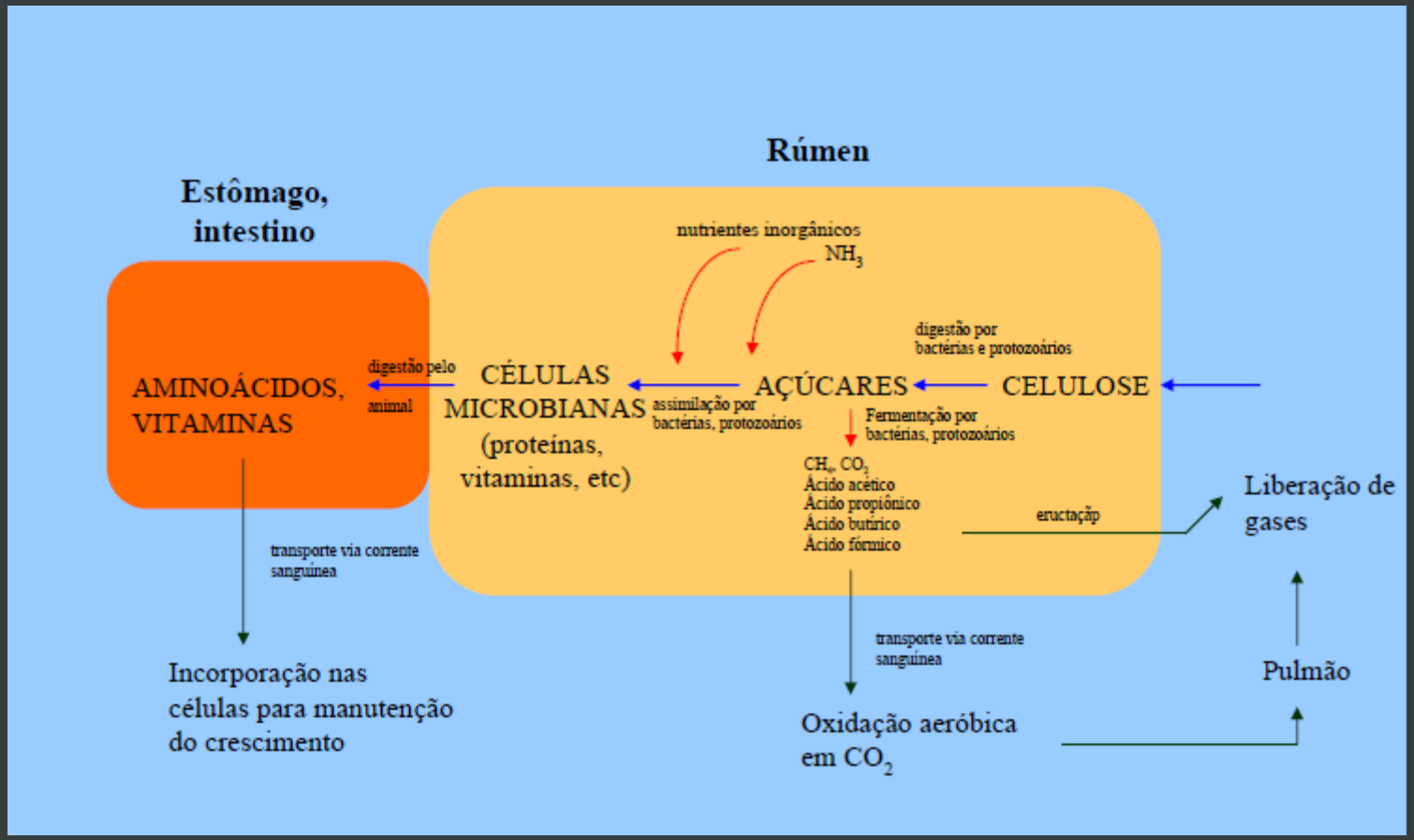
# Líquens


T. D. Brock
Camada de algas
Hifas fúngicas
Conexão ao substrato
similar a uma raiz

# Interações microbianas no rúmen



# Interações microbianas no rumen



| Organismo | Gram/Forma/Motilidade | Produtos Fermentação |
|---|---|---|
| **Decompositores de celulose** | | |
| *Bacteroides succinogenes* | Neg/Bastonete/- | Succinato, acetato, formato |
| *Butyrivibrio fibrisolvens* | Neg/Bastonetes curvos/+ | Acetato, formato, lactato, butirato, $H_2$, $CO_2$ |
| *Ruminococcus albus* | Pos/Cocos/- | Acetato, formato, $H_2$, $CO_2$ |
| *Clostridium lochheadii* | Pos/Bastonetes(esp.)/+ | Acet., form., butirato, $H_2$, $CO_2$ |
| **Decompositores de amido** | | |
| *Bacteroides amylophilus* | Neg/Bastonete/- | Formato, acetato, succinato |
| *Bacteroides ruminicola* | Neg/Bastonete/- | Formato, acetato, succinato |
| *Selenomonas ruminantium* | Neg/Bastonetes curvos/+ | Acetato, propionato, lactato |
| *Succinomonas amylolytica* | Neg/Oval/+ | Acetato, propionato, succinato |
| *Streptococcus bovis* | Pos/Cocos/- | Lactato |
| **Decompositores de lactato** | | |
| *Selenomonas lactilytica* | Neg/Bastonetes curvos/+ | Acetato, succinato |
| *Peptostreptococcus elsdenii* | Pos/Cocos/- | Acetato, propionato, butirato, valerato, $H_2$, $CO_2$ |
| **Decompositores de pectina** | | |
| *Lachnospira multiparus* | Pos/Bastonetes curvos/+ | Acet., form., lactato, $H_2$, $CO_2$ |
| **Metanogênicos** | | |
| *Methanobrevibacter ruminantium* | Pos/Bastonete/- | $CH_4$ (a partir de $H_2$+$CO_2$ ou formato) |
| *Methanomicrobium mobile* | Neg/Bastonete/+ | |

## Interações entre diferentes espécies

- Amensalismo (Antibiose)
  - Antibióticos.

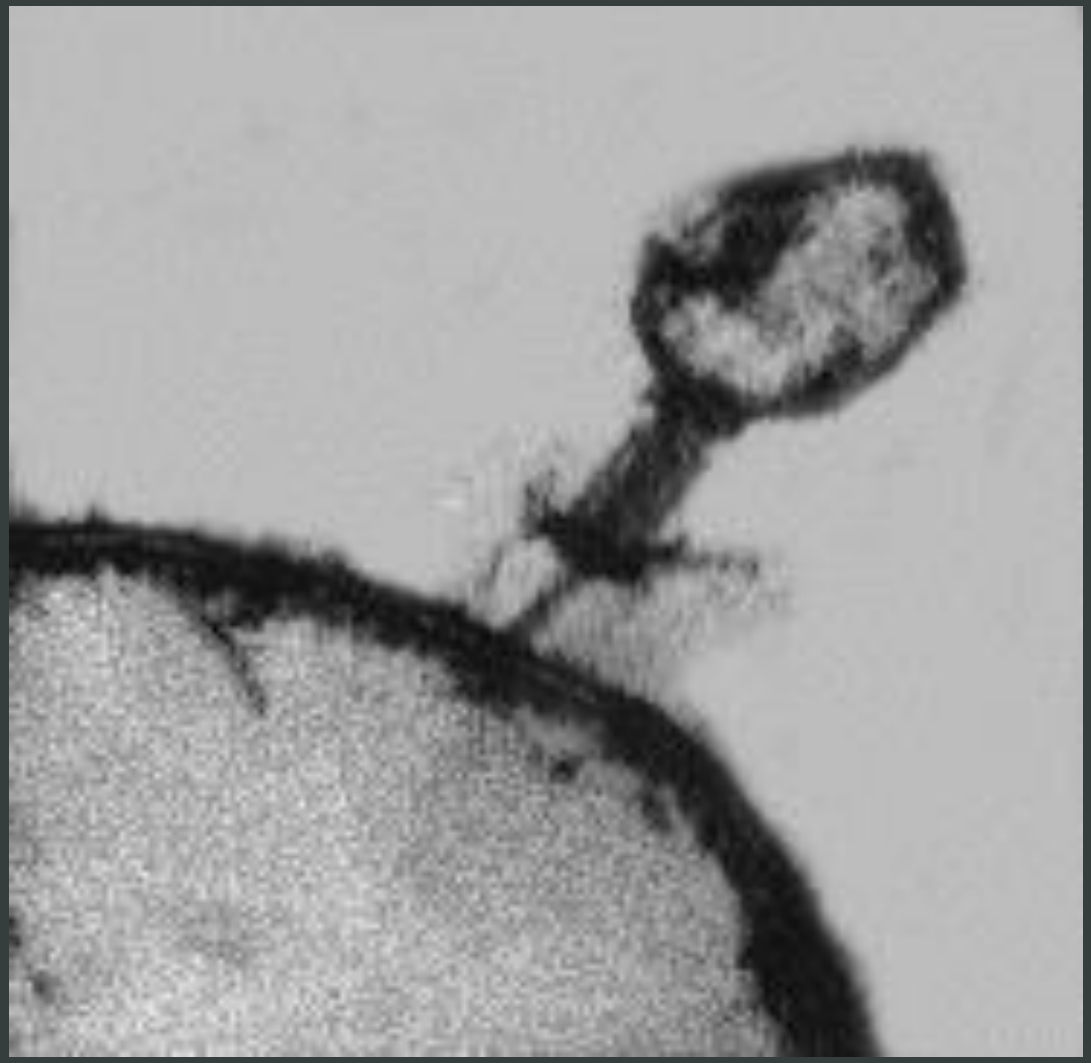
# Antibiose

| Bactéria | Antibiótico | Grau de antibiose | |
|---|---|---|---|
| | | Letal ou forte | Fraco ou nulo |
| *P. fluorescens* | Pirrolnitrina | *Thielaviopsis basicola*<br>*Alternaria* sp.<br>*Verticilium dahliae*<br>*Rhizoctonia solani* | *Pythium ultimun*<br>*Fusarium* sp. |
| | Pioluteorina | *Alternaria* sp.<br>*Fusarium* sp.<br>*Pythium ultimum* | *R. solani* |
| | Pseudobactina | *Pythium ultimum*<br>*Pythium aphanidermatum*<br><br>*R. solani*<br>*Erwinia carotovora*<br>*Bacilllus cereus*<br>*Xanthomonas* sp.<br>*Corynebacterium* sp.<br>*Pseud. marginalis*<br>*Pseud. tomato* | *P. solanacearum*<br>*Agrobacterium tumefaciens* |
| *Pseudomonas* sp. | Tropolone | *Helminthosporium* sp.<br>*Alternaria* sp.<br>*Fusarium* sp.<br>*Diplodia* sp.<br>*Piricularia* sp. | *Aspergillus* sp.<br>*Penicillium* sp.<br>*Trichoderma* sp.<br>*Rhizopus* sp. |

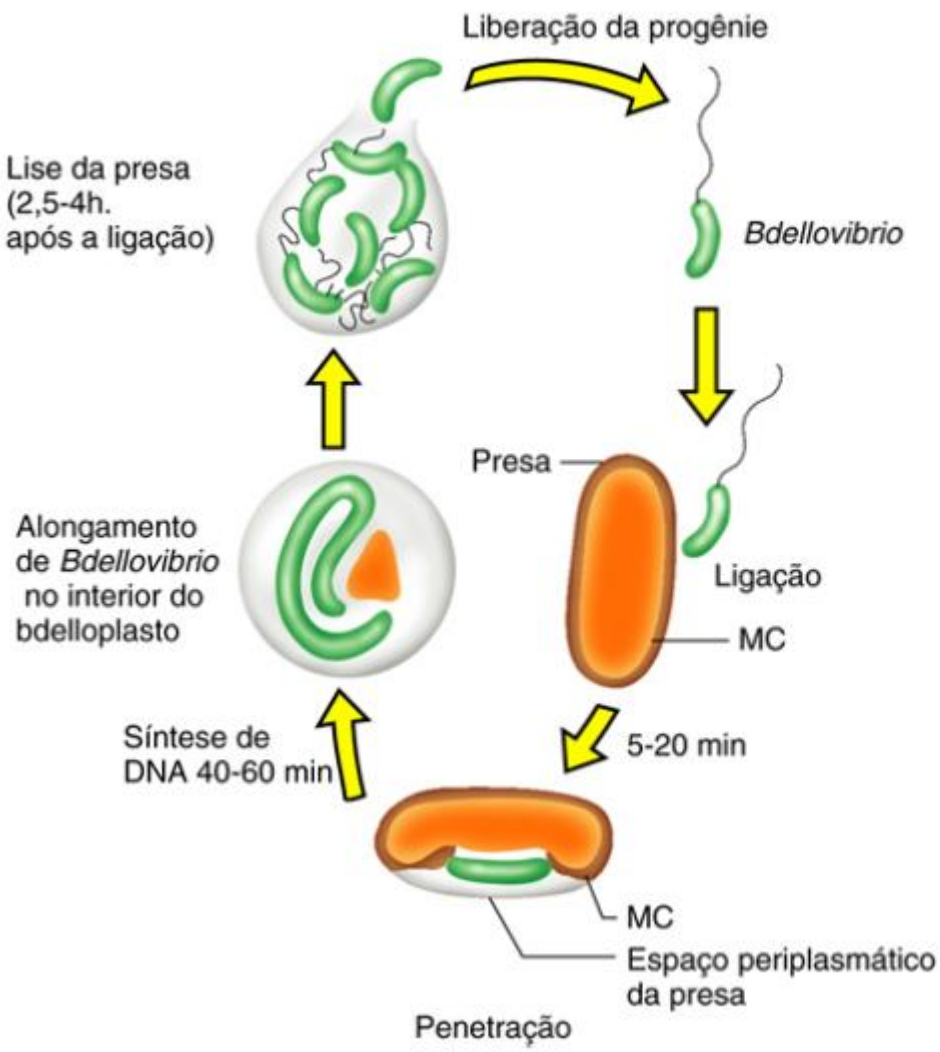
## Interações entre diferentes espécies

- Parasitismo

# Parasitismo – vírus x bactéria

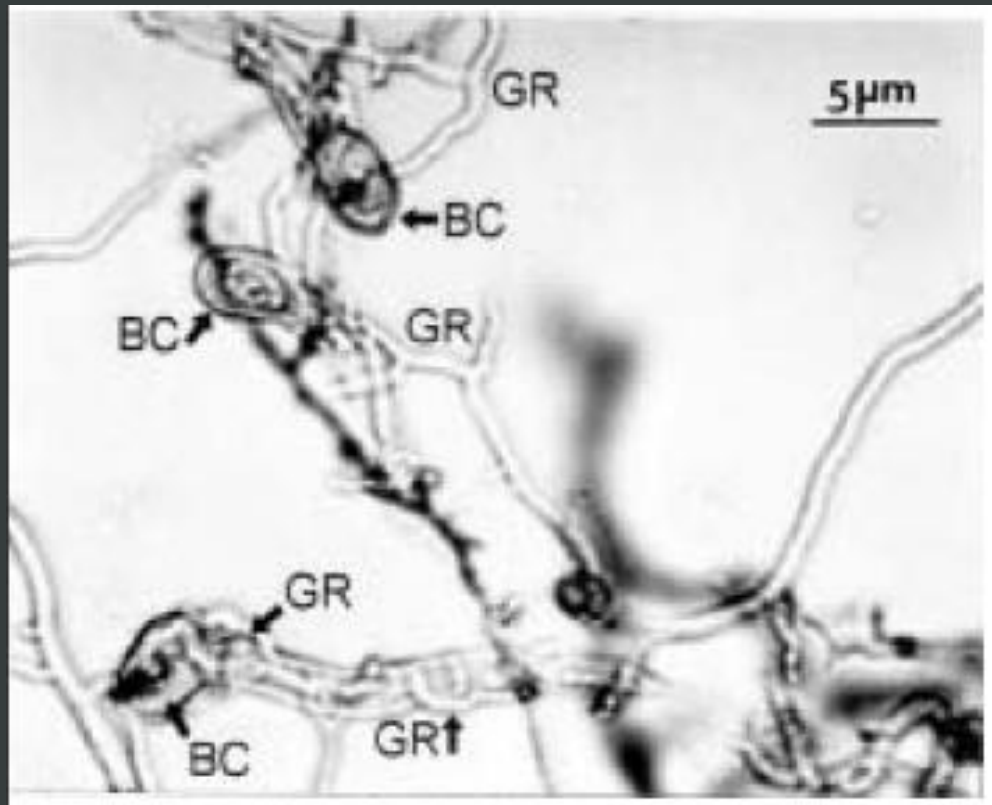


# Parasitismo – bactéria x bactéria



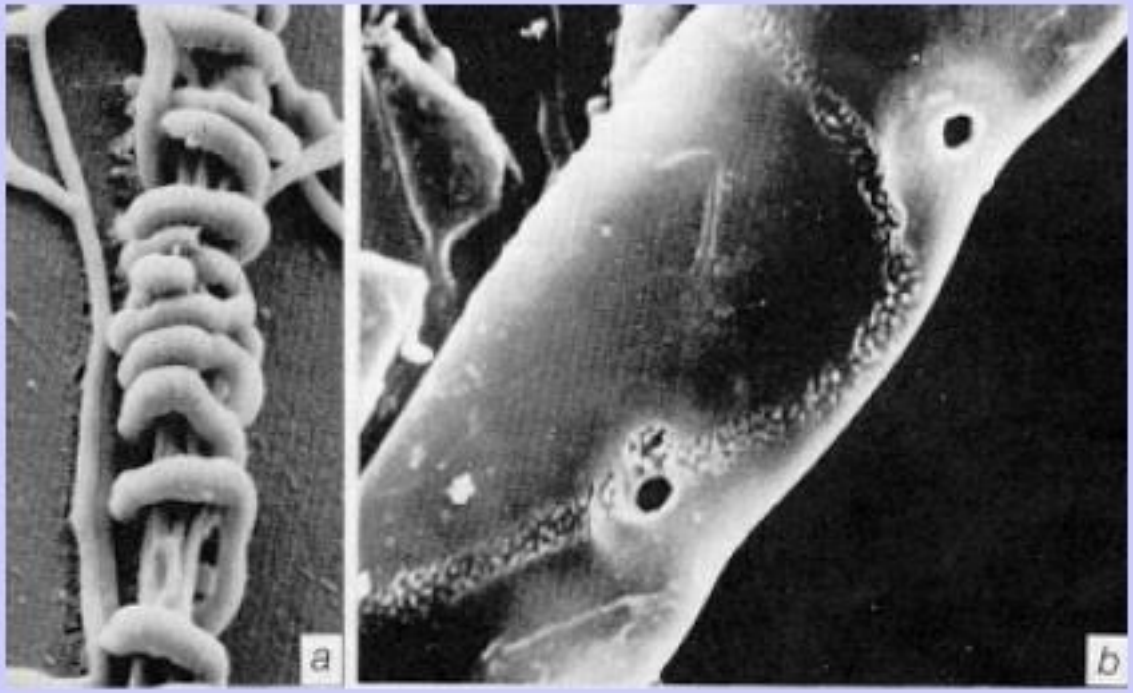

*Bdellovibrio* spp. :
0,2 - 0,5 µm x 0,5 - 1,4 µm
Flagelo polar
Hospedeiros: bactérias Gram negativas do solo
ciclo em cultura: 4 h a 30ºC

# Parasitismo – fungo x fungo



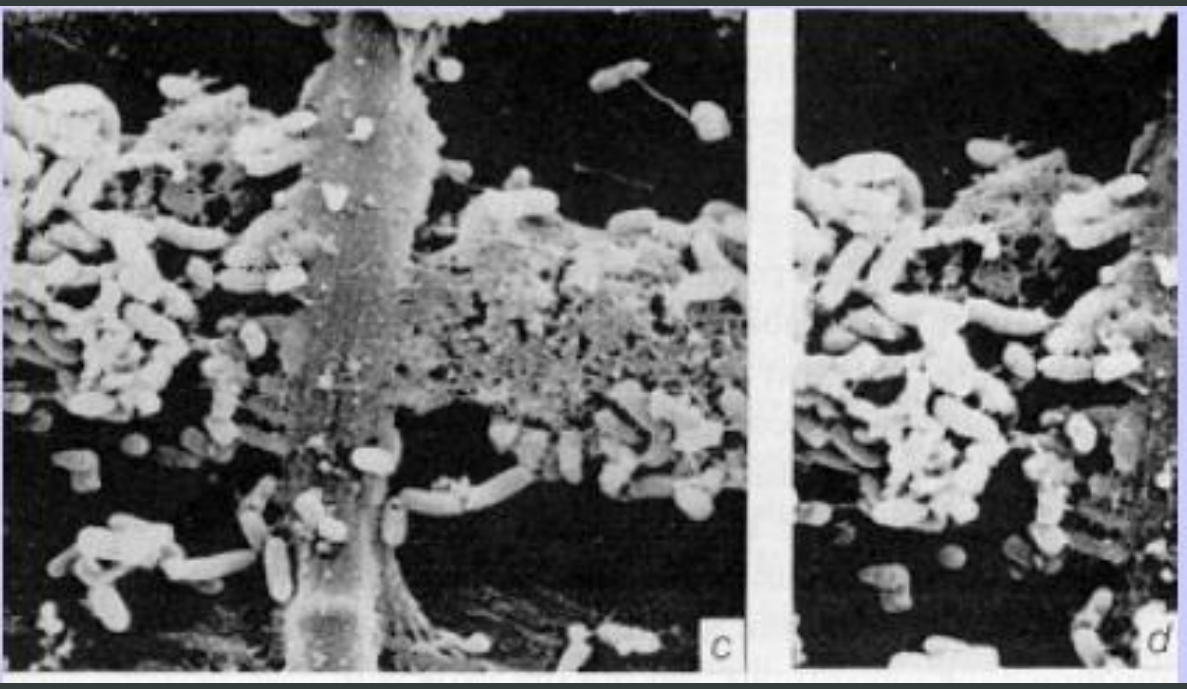

Micrografia mostrando conídios e tubos germinativos de *Botrytis cinerea* (BC) colonizados por hifas de *Gliocladium roseum* (GR)

# Parasitismo – fungo x fungo




Parasitismo entre fungos:
(a) Hifa de *Rhizoctonia solani* colonizada por *Arthrobotrys*;
(b) hifa de *Sclerotium* sp. perfurada por enzimas de *Trichoderma* sp.

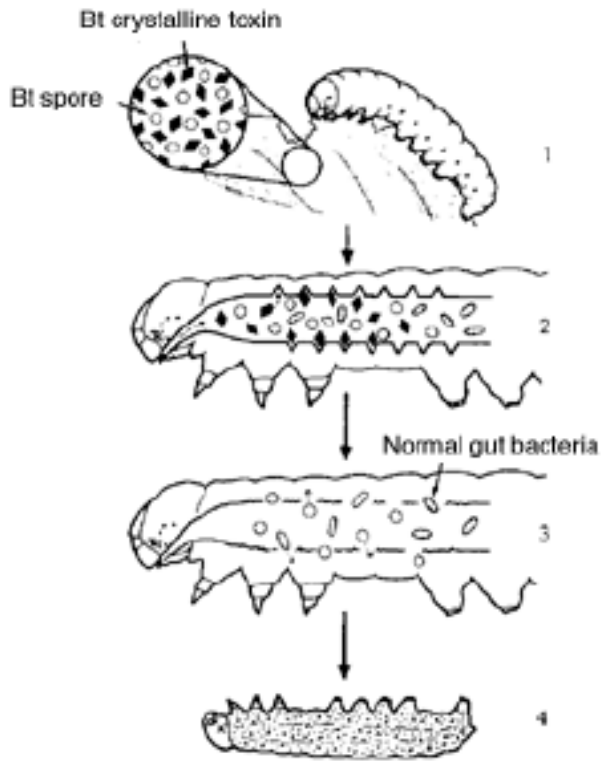
# Parasitismo – bactéria x fungo




Parasitismo entre microrganismos destruição de hifas de *Gaeumanomyces graminis* por bactérias.

# Parasitismo – bactéria x inseto

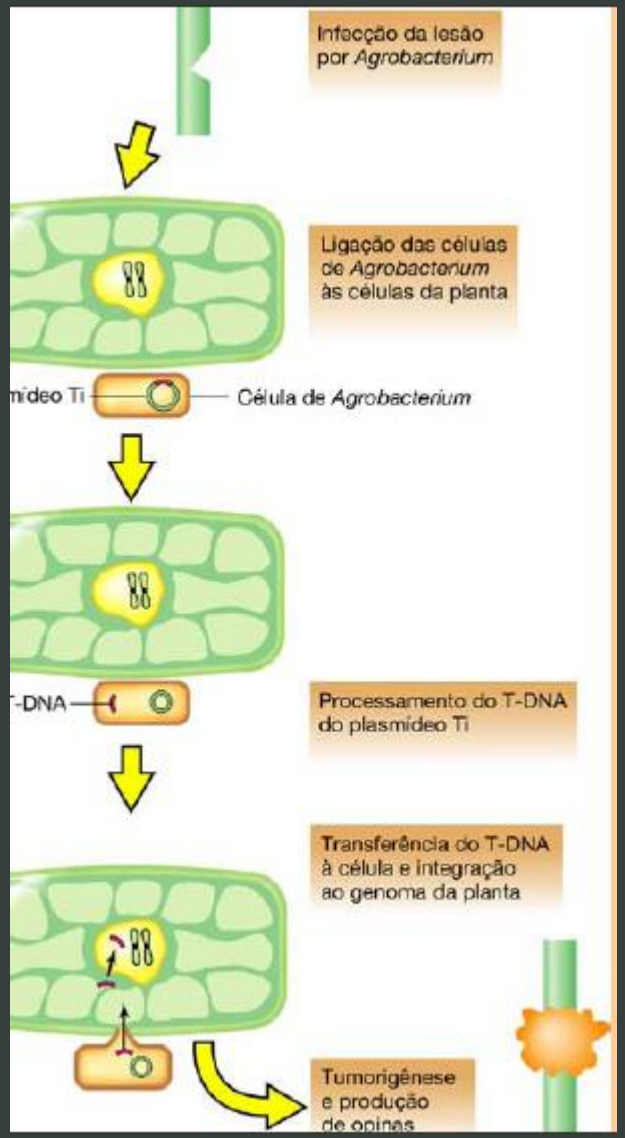
**Action of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* on caterpillars**



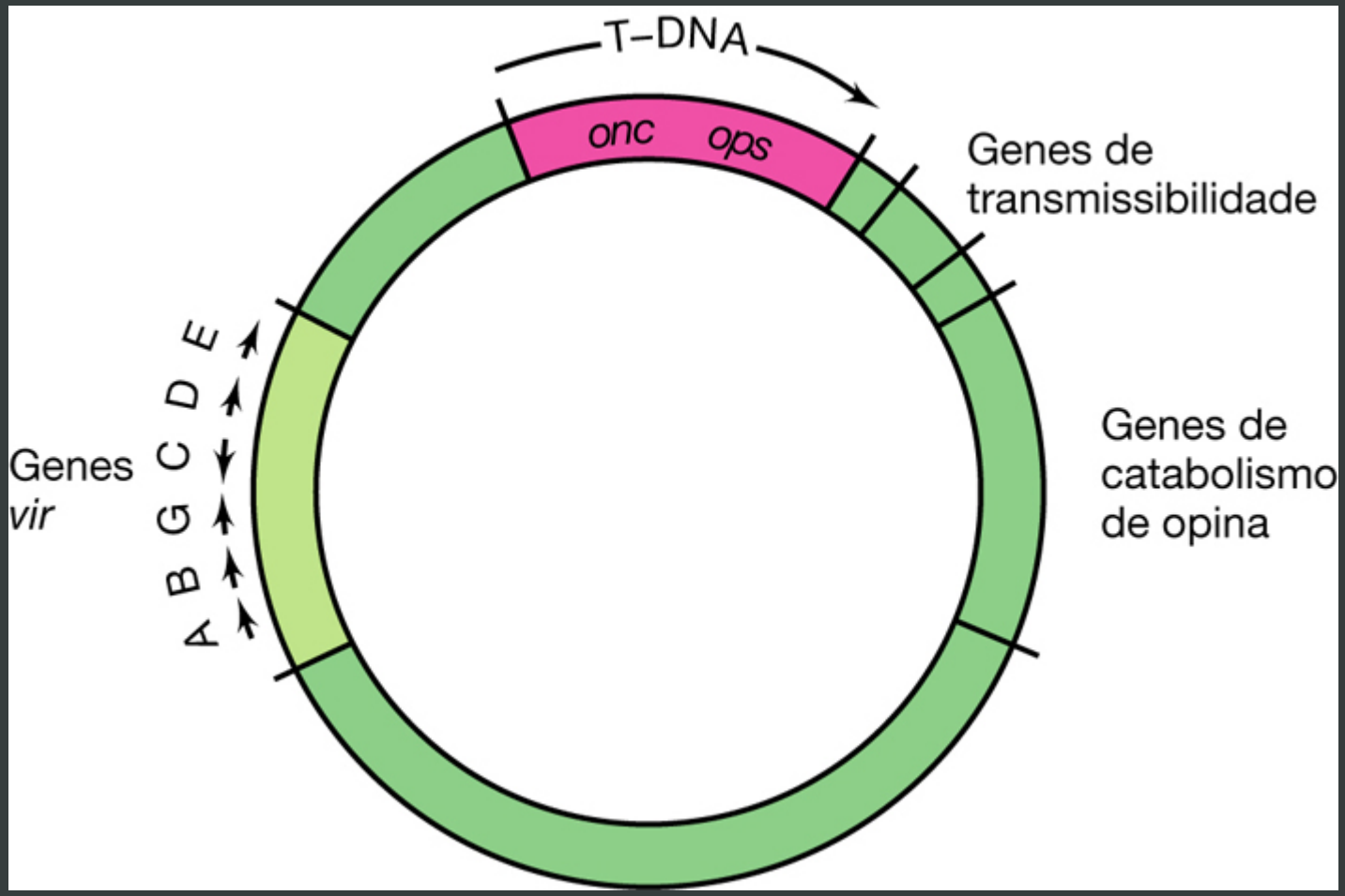

1| Caterpillar consumes foliage treated with Bt (spores and crystalline toxin).
2| Within minutes, the toxin binds to specific receptors in the gut wall, and the caterpillar stops feeding.
3| Within hours, the gut wall breaks down, allowing spores and normal gut bacteria to enter the body cavity; the toxin dissolves.
4| In 1-2 days, the caterpillar dies from septicemia as spores and gut bacteria proliferate in its blood.

Parasitismo – bactéria x planta

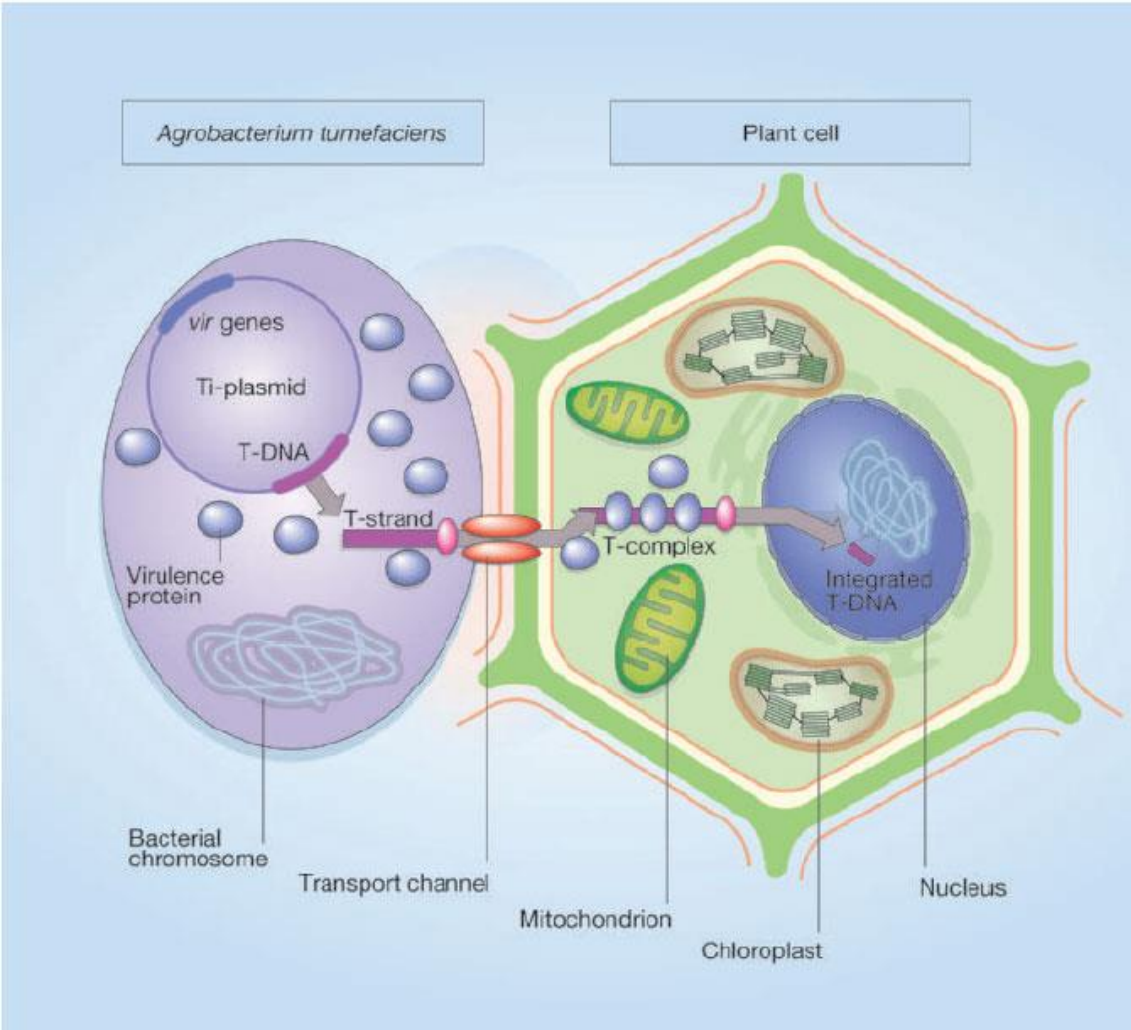
***Agrobacterium tumefasciens***



# Plasmídeo T de *A. tumefasciens*



# Infecção da planta



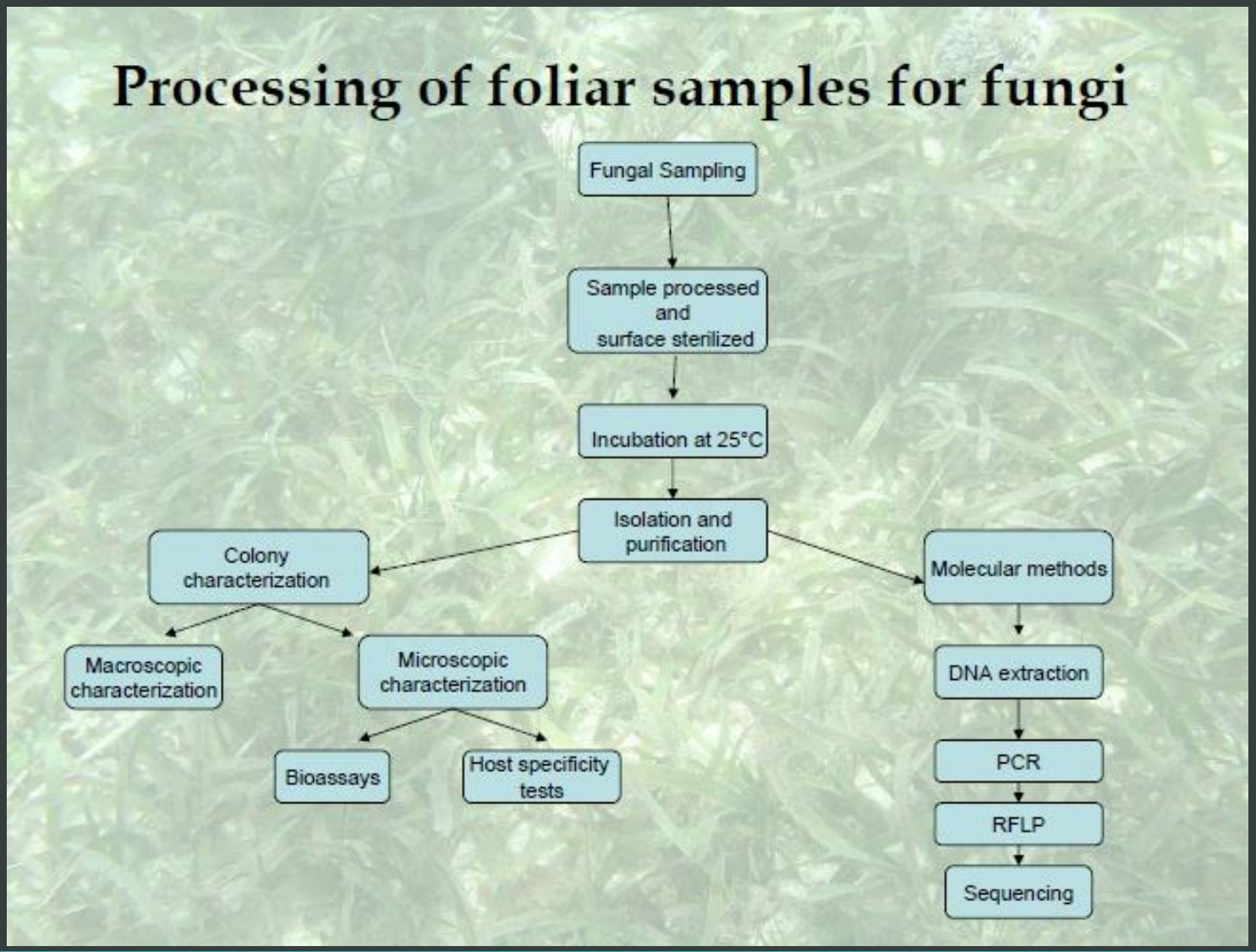

Stanton B. Gelvin *Nature* **433,** 583-584(10 February 2005)

# Micro-organismos endofíticos

## Endofíticos

- Micro-organismos  que vivem no interior de plantas sem causar doenças.
- Todas as plantas têm endófitos.
- Podem ser mutualistas ou patógenos latentes.

# Isolamento de micro-organismos endofíticos

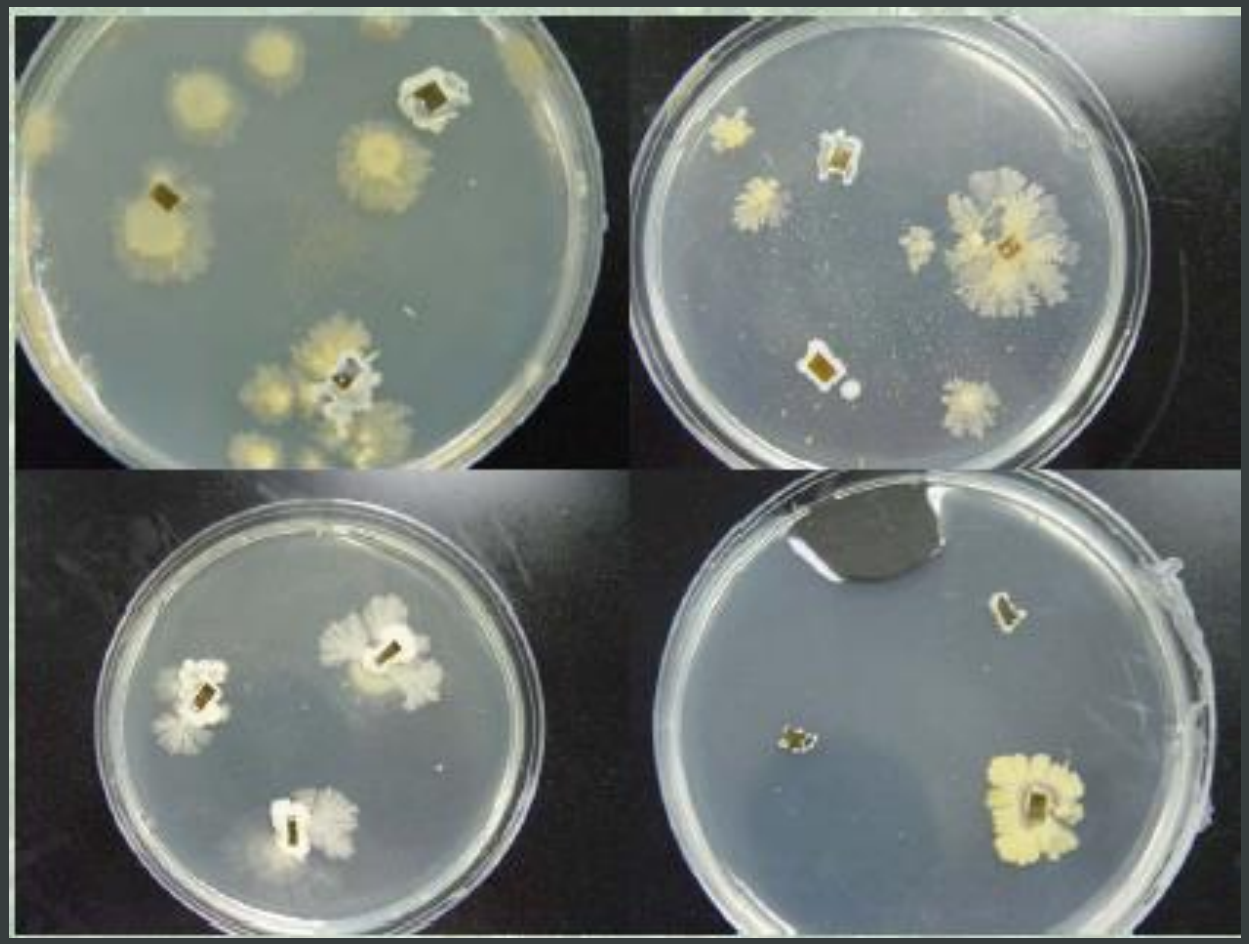



Ramirez *et al.*

# Isolamento de micro-organismos endofíticos

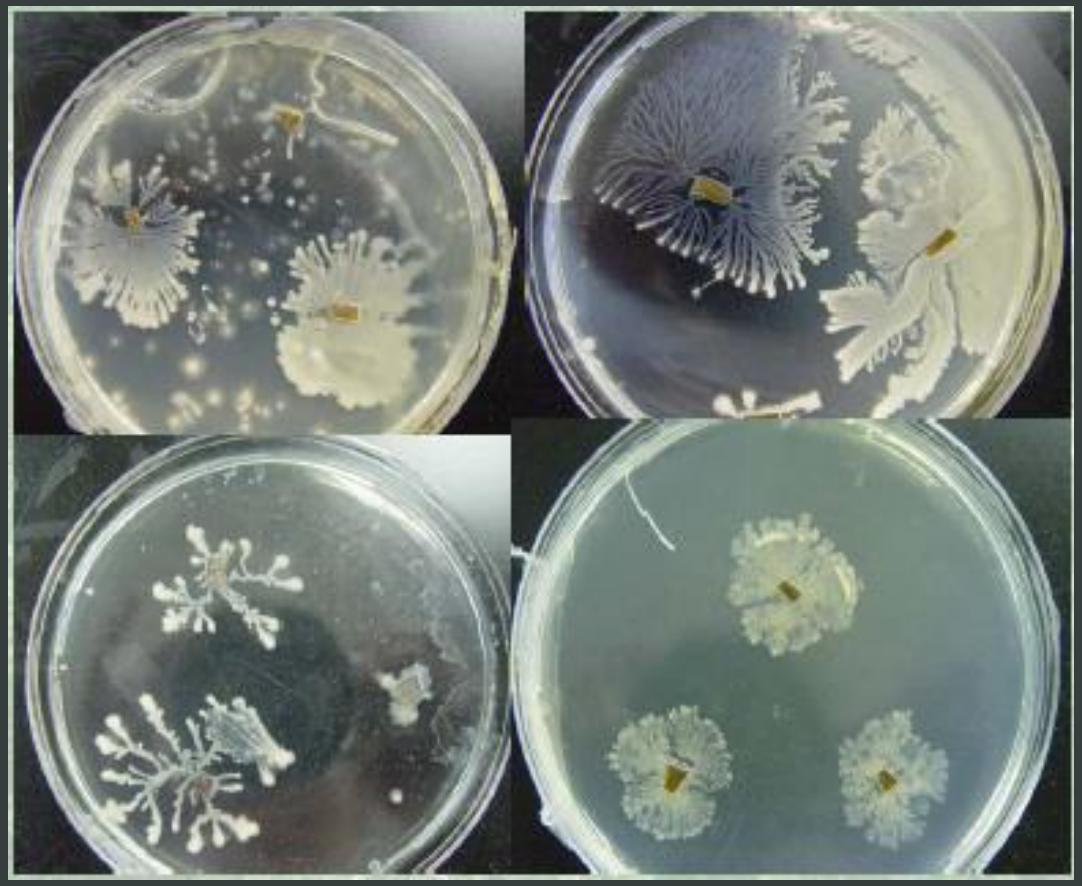
Ramirez *et al.*

# Isolamento de micro-organismos endofíticos



Ramirez *et al.*

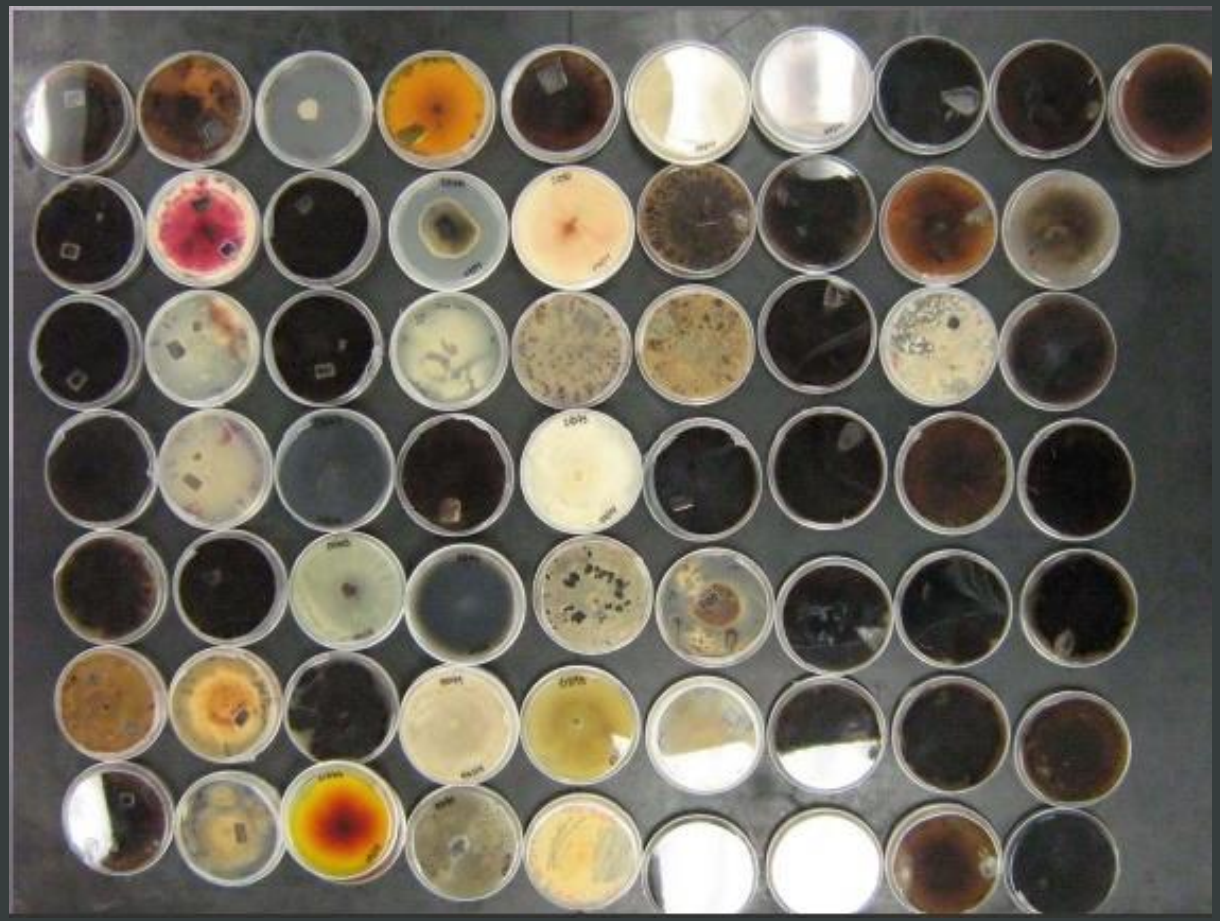
# Isolamento de micro-organismos endofíticos



Ramirez *et al.*

# Endofíticos

Exemplo de fungos endofíticos isolados de *Centaurea* sp.



George Newcombe, 2009

## Potencial biotecnológico dos endófitos

- Proteção da planta contra ataque de insetos
- Produção de substâncias de interesse industrial, farmacológico e médico
  - Enzimas
  - Antibióticos
  - Imunomoduladores
  - Taxol
- Controle biológico

## Bioprospecção

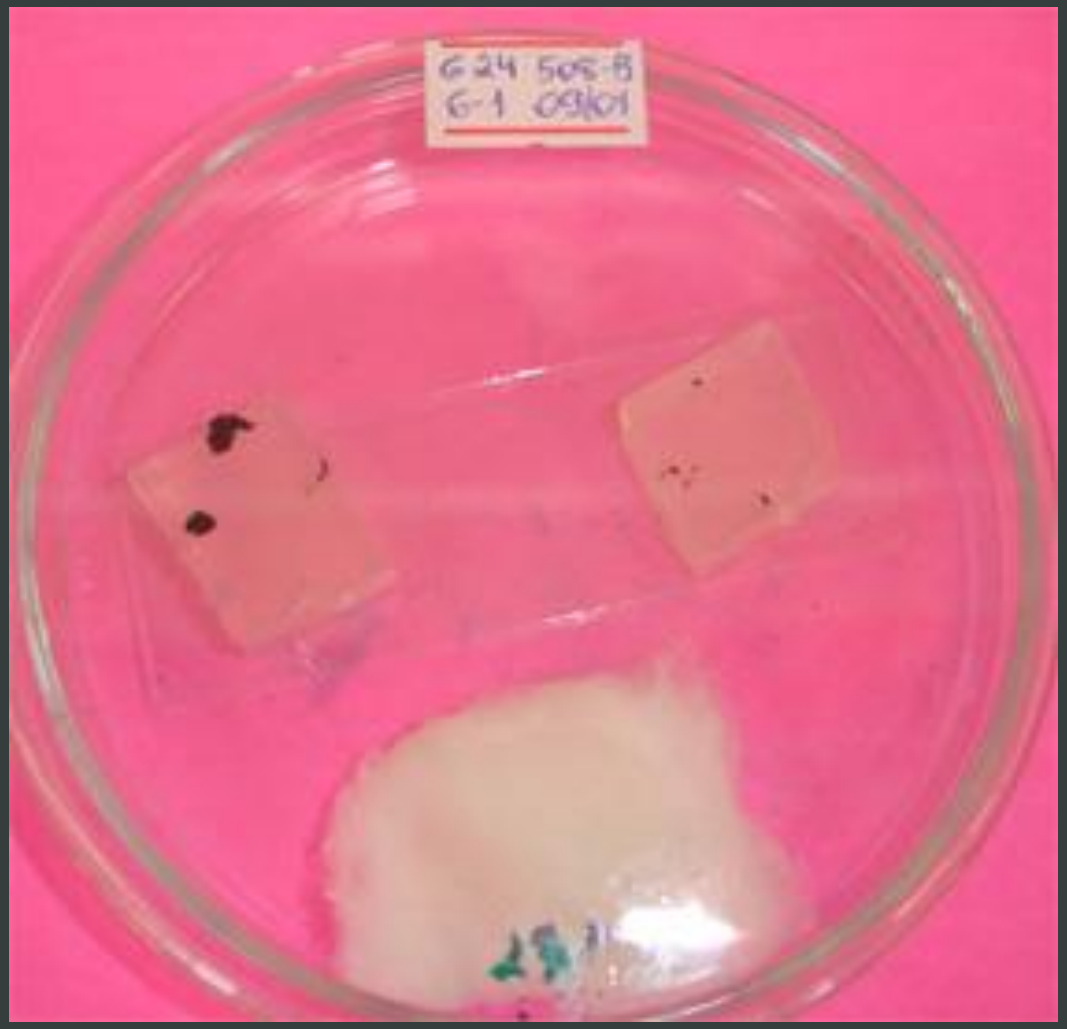
- Busca por novos micro-organismos com propriedades de interesse biotecnológico.
  - Solo
  - Areia
  - Plantas
  - Outros nichos

## Após o isolamento dos micro-organismos

- Caracterização morfológica
  - Macromorfologia
  - Micromorfologia
- Identificação taxonômica
- Testes de atividade antagônica
- Isolamento e caracterização da substância de interesse
- Patente
- Testes de toxicidade
- Comercialização

# Grupos morfológicos

# Identificação - micromorfologia



# Identificação - micromorfologia

G1 *Acremonium* sp



G2 *Curvularia* sp

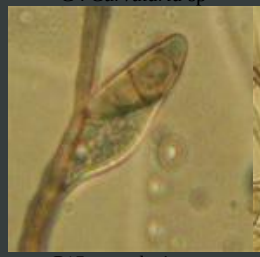


G3 *Curvularia* sp

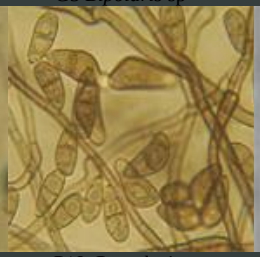
G4 *Curvularia* sp

G5 *Bipolaris* sp

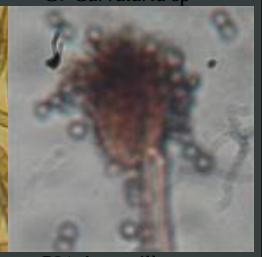
G7 *Curvularia* sp



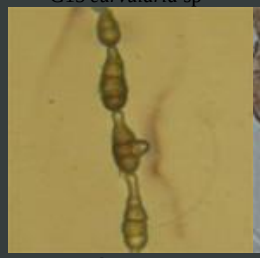
G15 *curvularia* sp



G19 *Curvularia* sp



G21 *Aspergillus* sp



G24 *Alternaria* sp

G24 *Alternaria* sp

G25 *Bipolaris* sp

## Identificação molecular

- Purificação do DNA
- Sequenciamento

# Micorrizas

# Micorrizas

**MYCO RHIZA**

**FUNGO** **RAÍZ**

- Relações simbióticas entre fungos e raízes de plantas.
- Presentes em 95% dos gêneros de plantas.

## Micorrizas

- Surgiram há cerca de 400 milhões de anos.

Fóssil de fungo micorrízico associado simbioticamente a *Aglaophyton*, planta vascular

## Micorrizas

- Só foram reconhecidas e tratadas cientificamente no final do século XIX (1885).

## Micorrizas

- Botânico Alemão Albert Bernhard Frank.
  - 1º a utilizar o termo *Micorriza.*

Gartenzeitung (nicht Gartenflora) 1885, p. 421.

## Micorrizas

- Demonstrou que as raízes dos pinheiros tinham fungos não prejudiciais, e que o micélio poderia absorver os nutrientes do solo.

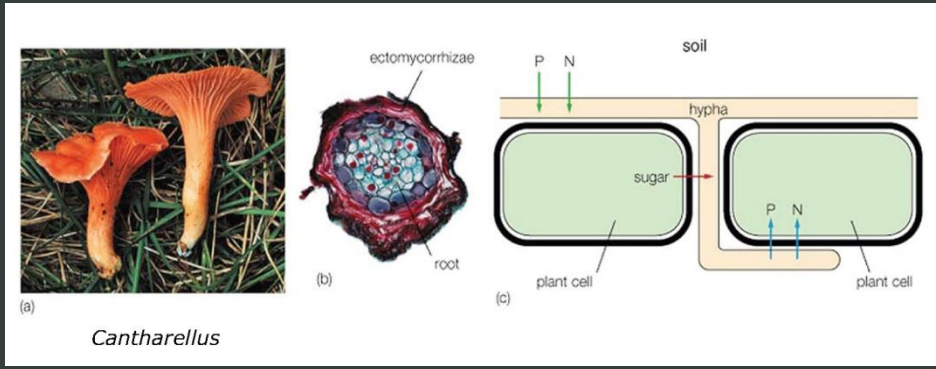
- Provou experimentalmente:
  - *“um órgão morfologicamente característico e com dependência fisiológica íntima e recíproca”.*

## Micorrizas

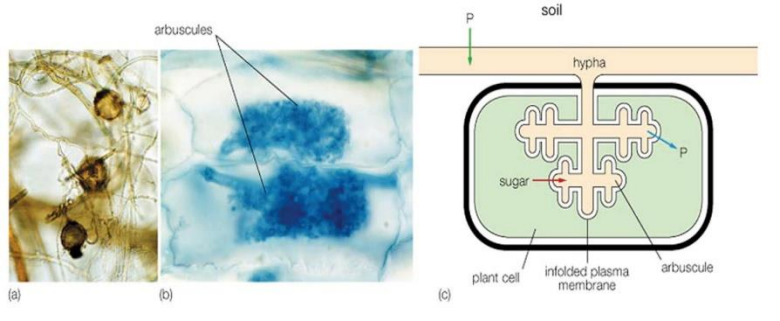
- As micorrizas representam uma associação extremamente importante  para a produção vegetal, para a manutenção da qualidade do solo e para a conservação de espécies vegetais ameaçadas de extinção.

# Classificação geral

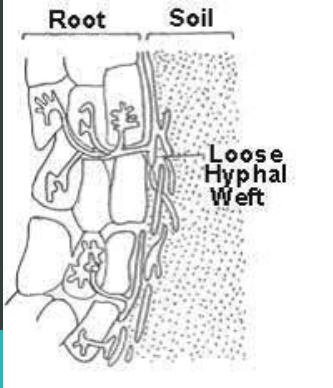
- Ectomicorriza




- Endomicorriza




- Ectendomicorriza



## Classificação

- Atualmente:
- 1. Ectomicorriza (apenas cerca de 3% das Espermatófitas)
- 2. Micorrizas Arbusculares (MAs) – Endomicorriza
- 3. Ectendomicorriza
- 4. Arbutóide (Ordem Ericales)
- 5. Monotropóide (Ordem Ericales)
- 6. Ericóide (Família Ericaceae)
- 7. Orquidóide (Família Orquídaceae)

Smith & Read, 1997; Brundrett et al., 1996

## 1- Ectomicorrizas

- Hifas **entre** as células corticais da raiz (intercelular).

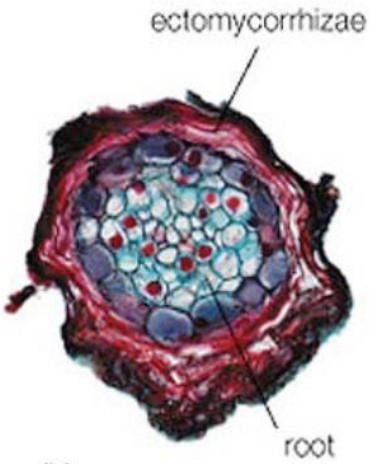
- Formando uma estrutura característica que substitui a lamela média.

# 1- Ectomicorrizas

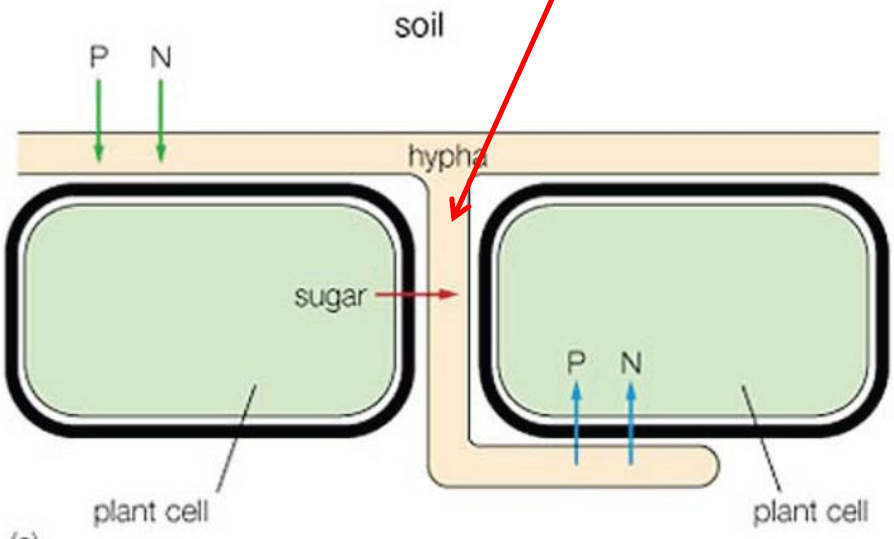
**local onde ocorre a troca de nutrientes com a planta (células de transferência)**

(a)

*Cantharellus*




(b)



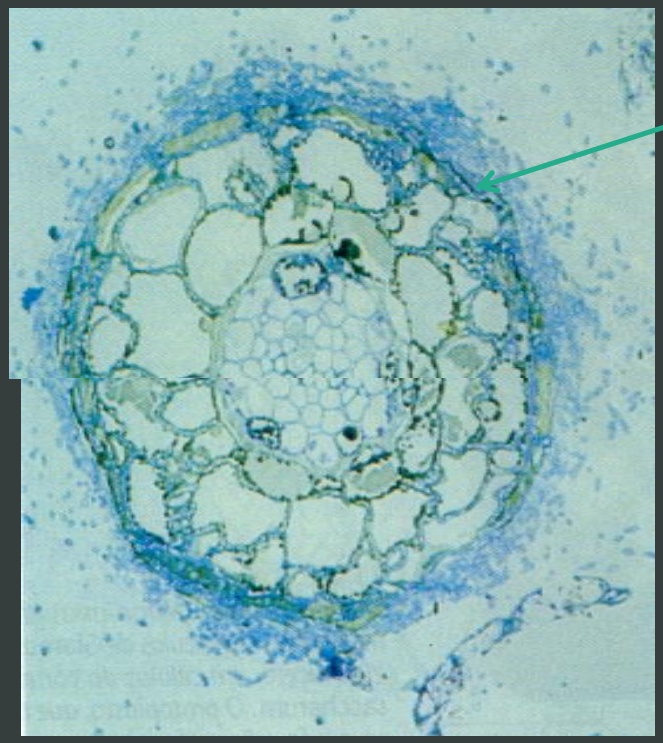

(c)

**Rede de Hartig**

## 1- Ectomicorrizas

- Maioria apresenta o manto fúngico ao redor das raízes.

**local de armazenamento temporário de nutrientes**

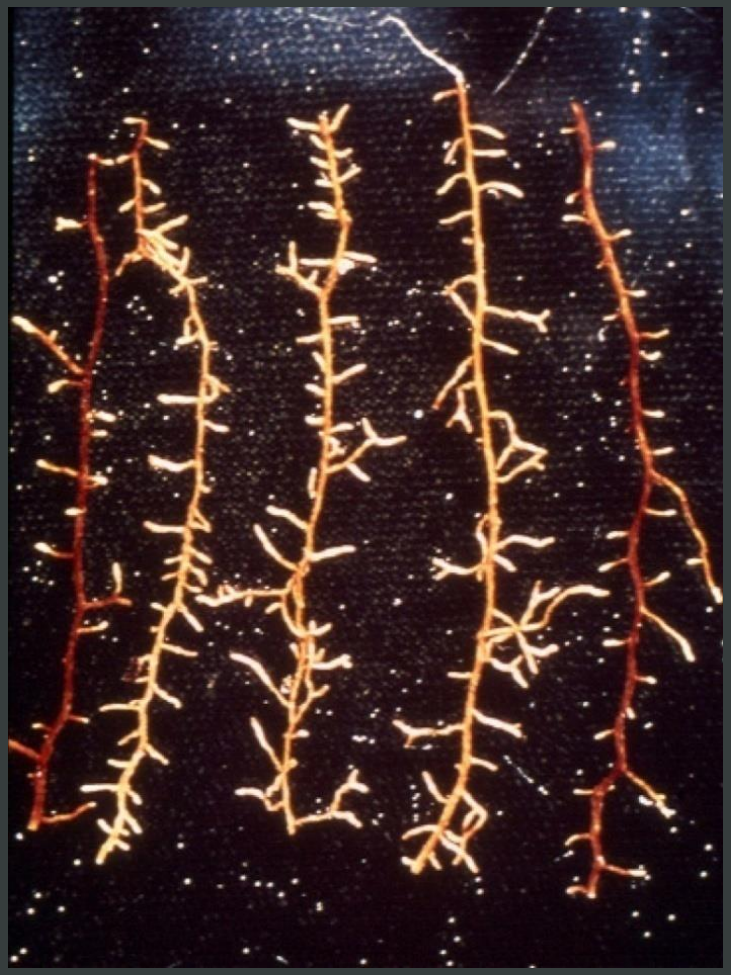


## 1- Ectomicorrizas

- **Modificações macroscópicas** das raízes.

  - Pode variar em espessura, cor, textura.
  - Pode alterar a morfologia das raízes resultando em bifurcações e agrupamentos.

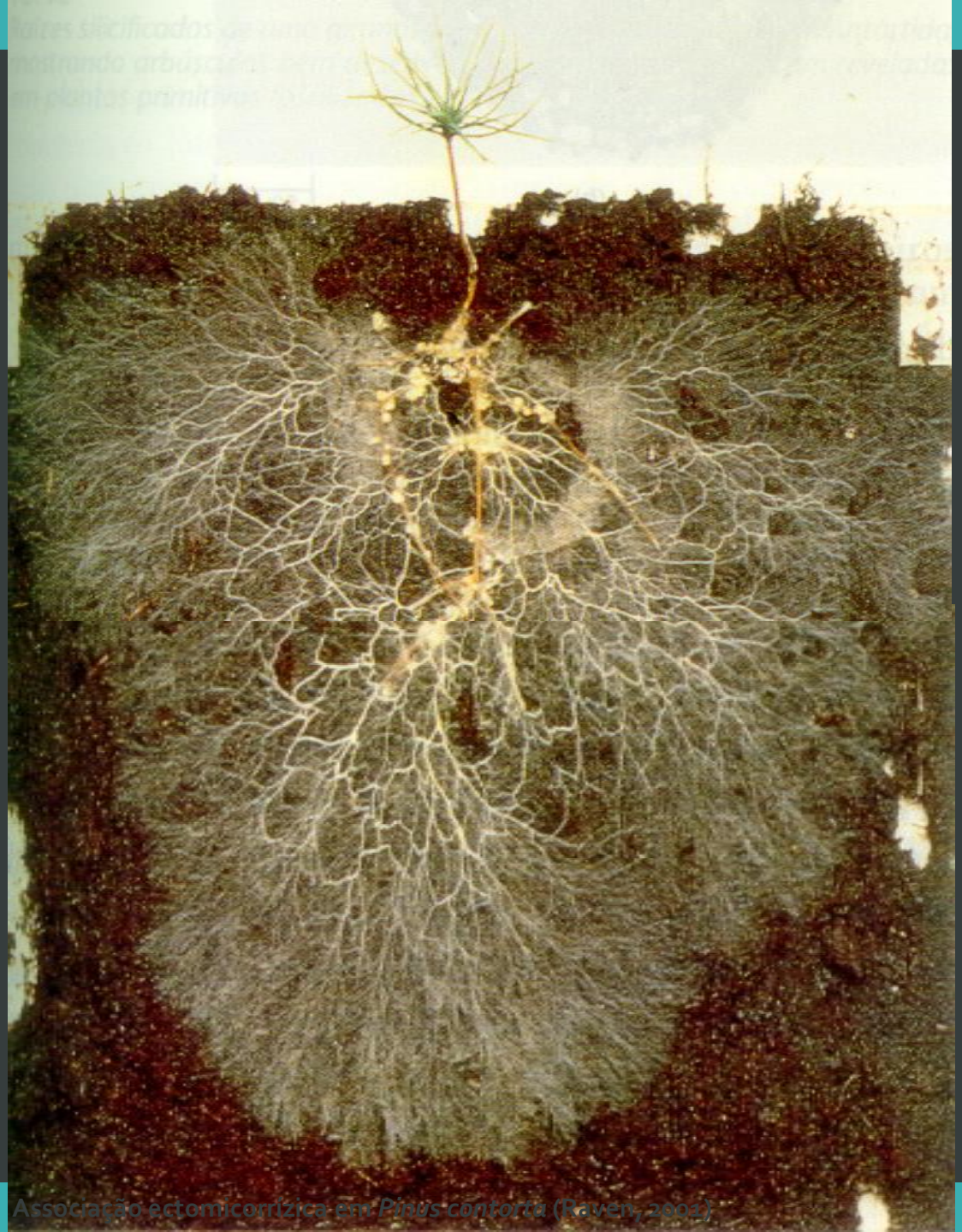
# 1- Ectomicorrizas



## 1- Ectomicorrizas

- As hifas prolongam-se  para o solo e podem se agrupar formando **rizomorfos** visíveis a olho nu.

**estruturas tubulares especializadas no transporte de nutrientes e água a longas distâncias**



Associação ectomicorrízica em *Pinus contorta* (Raven, 2001)

## 1- Ectomicorrizas

- São encontradas em aproximadamente 3% das plantas.
- Principalmente em plantas lenhosas de clima temperado.

# 1- Ectomicorrizas

## 1- Ectomicorrizas

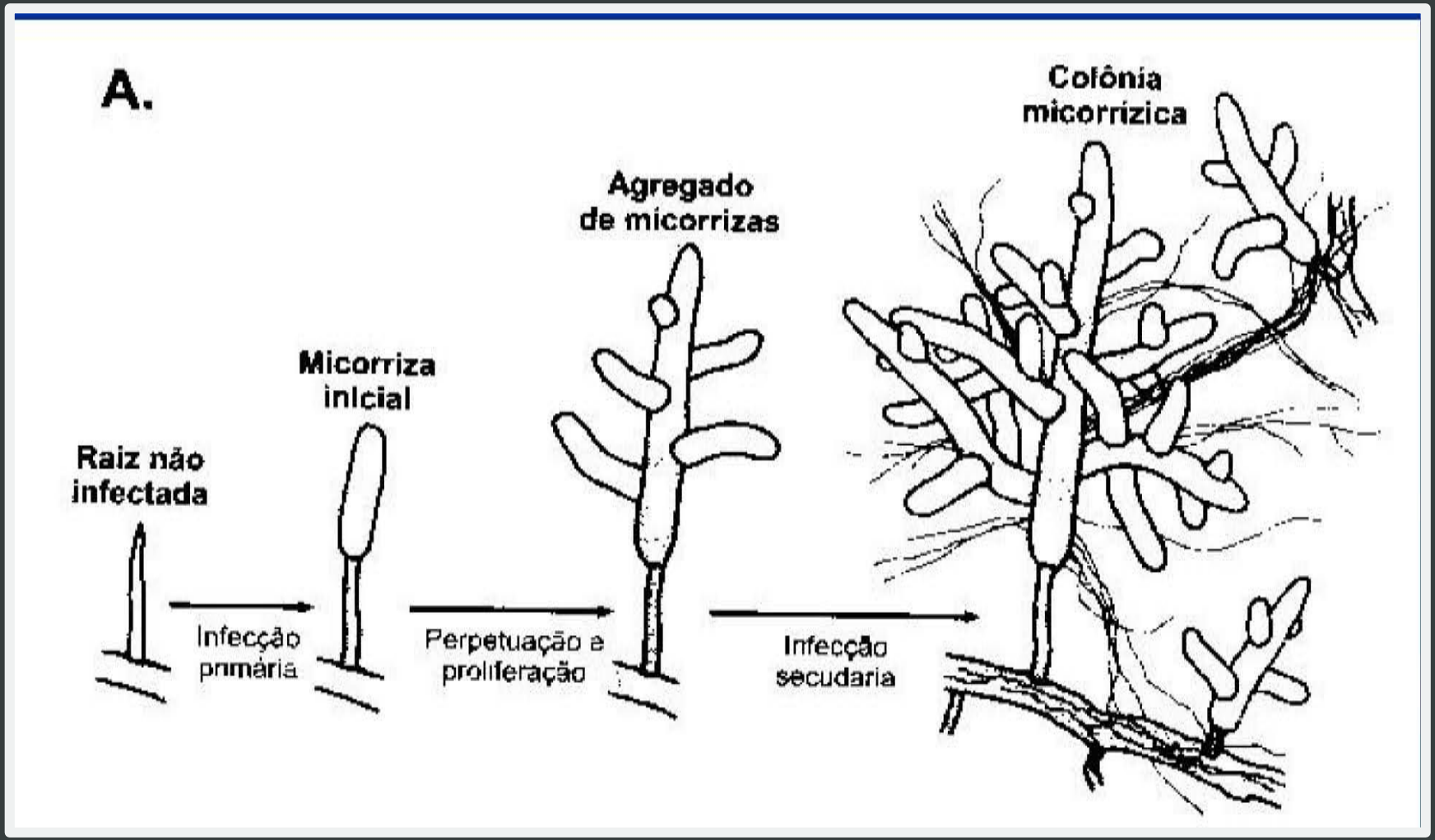
- 5000 espécies de fungos formam ectomicorrizas.

# 1- Ectomicorrizas

## 1- Ectomicorrizas

- No Brasil, Basidiomicetos colonizam e frutificam com frequência espécies de pinos e eucalipto.

# 1- Ectomicorrizas

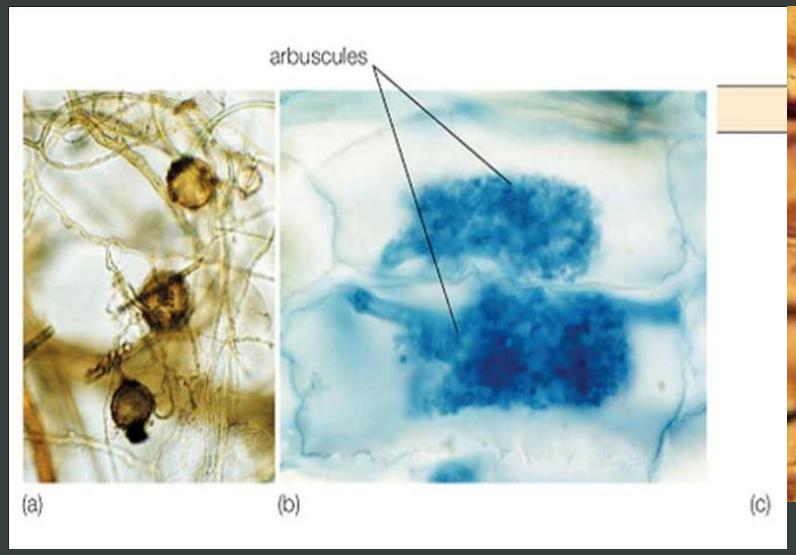


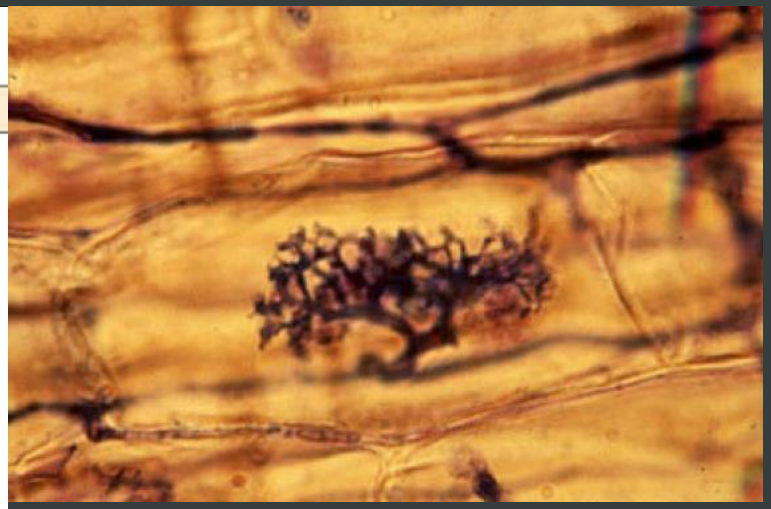
## 1- Ectomicorrizas

- Os fungos micorrízicos podem produzir corpos de frutificação acima (epígeos) ou abaixo (hipógeos) da superfície do solo.

## 2- Micorrizas arbusculares (MAs) ou endomicorrizas

- Caracterizam-se pelo desenvolvimento de **arbúsculos** altamente ramificados no **interior das células** do córtex da raiz.

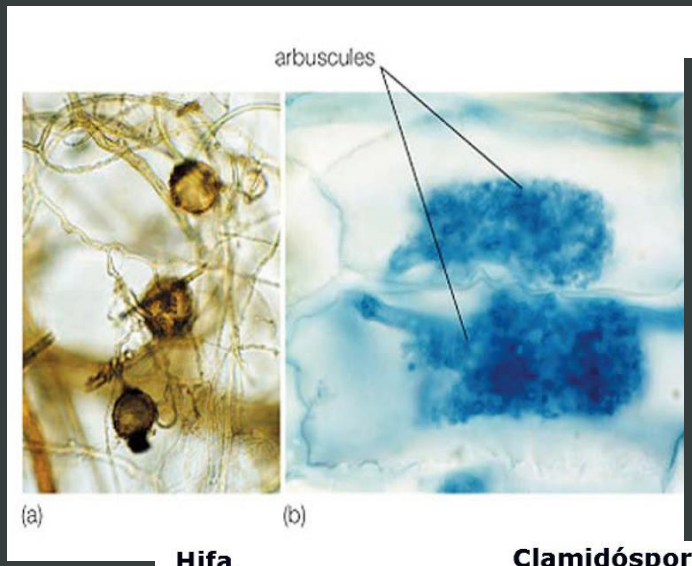


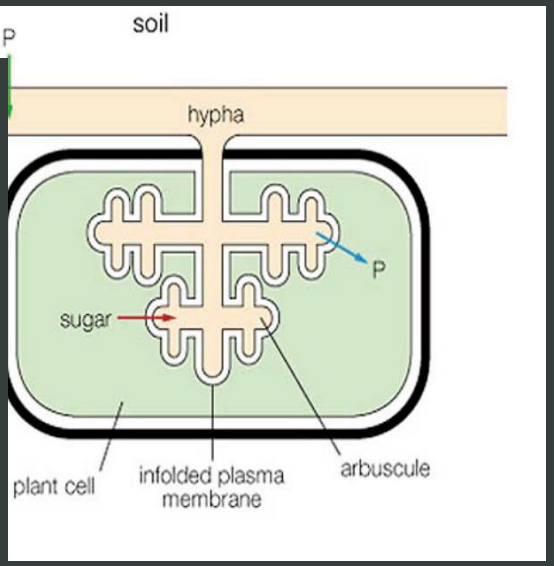



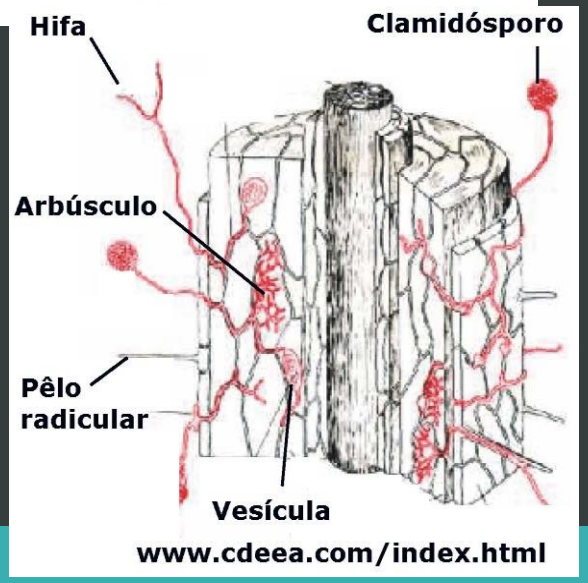
## 2- Micorrizas arbusculares (MAs) ou endomicorrizas

- O fungo cresce intercelularmente, substitui a lamela média, depois **entra** nas células formando os arbúsculos entre a membrana e a parede.

# 2- Micorrizas arbusculares (MAs) ou endomicorrizas



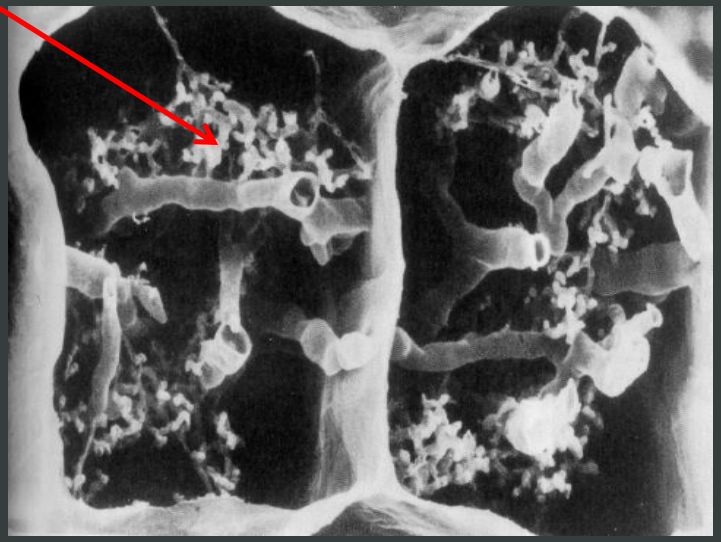
## 2- Micorrizas arbusculares (MAs) ou endomicorrizas

- Quando o **arbúsculo** é formado a membrana sofre uma invaginação envolvendo o fungo (membrana periarbuscular).

- Duram poucos dias, desintegram-se e novos arbúsculos são formados.

# 2- Micorrizas arbusculares (MAs) ou endomicorrizas

**local onde ocorre a troca de nutrientes entre a planta e o fungo**

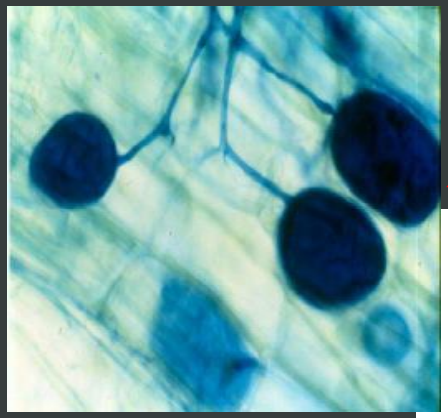


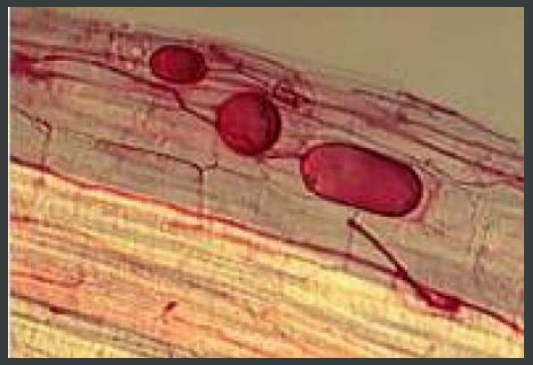
## 2- Micorrizas arbusculares (MAs) ou endomicorrizas

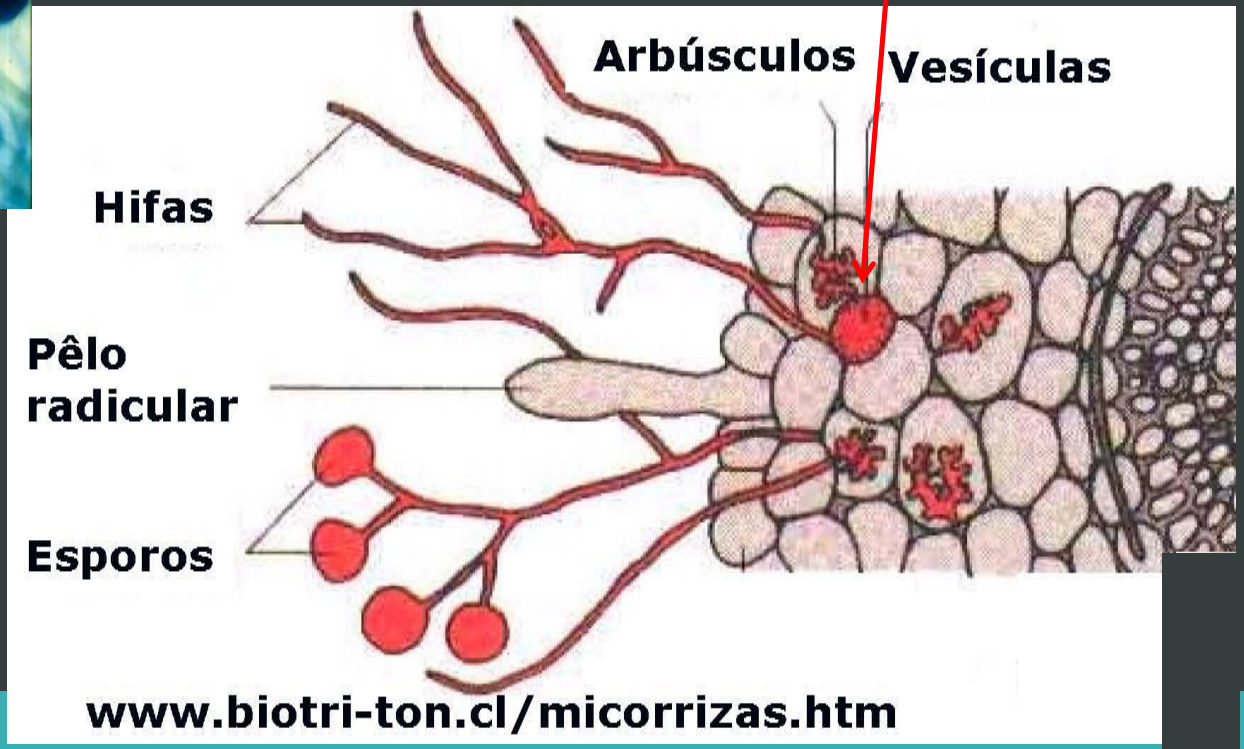
- Apresentam **vesículas** - estruturas globosas de paredes espessas formadas intracelularmente.

# 2- Micorrizas arbusculares (MAs) ou endomicorrizas

Armazenam lipídeos e servem como propágulo





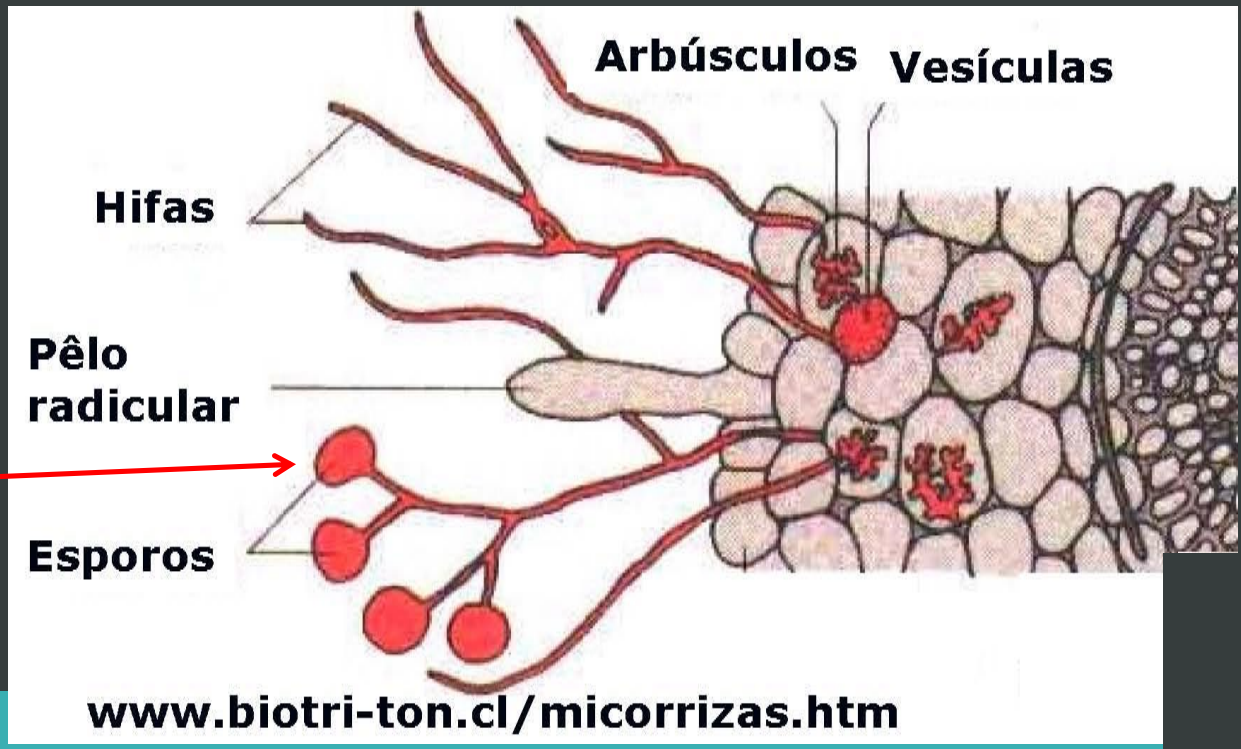


## 2- Micorrizas arbusculares (MAs) ou endomicorrizas

- Os **esporos assexuais** normalmente são formados externamente mas podem ser intracelulares .

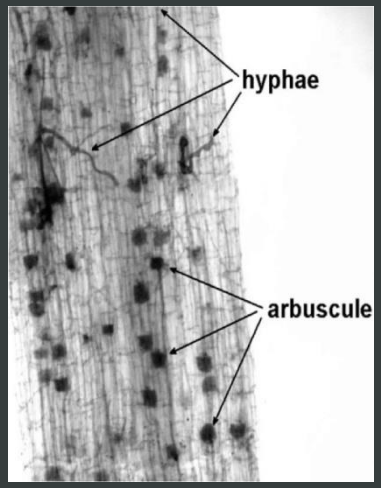
# 2- Micorrizas arbusculares (MAs) ou endomicorrizas

clamidósporos



## 2- Micorrizas arbusculares (MAs) ou endomicorrizas

- **Não** promovem alterações morfológicas macroscópicas nas raízes.



*Glomus versiforme* em associação com raízes de alho (Raven, 2001).

## 2- Micorrizas arbusculares (MAs) ou endomicorrizas

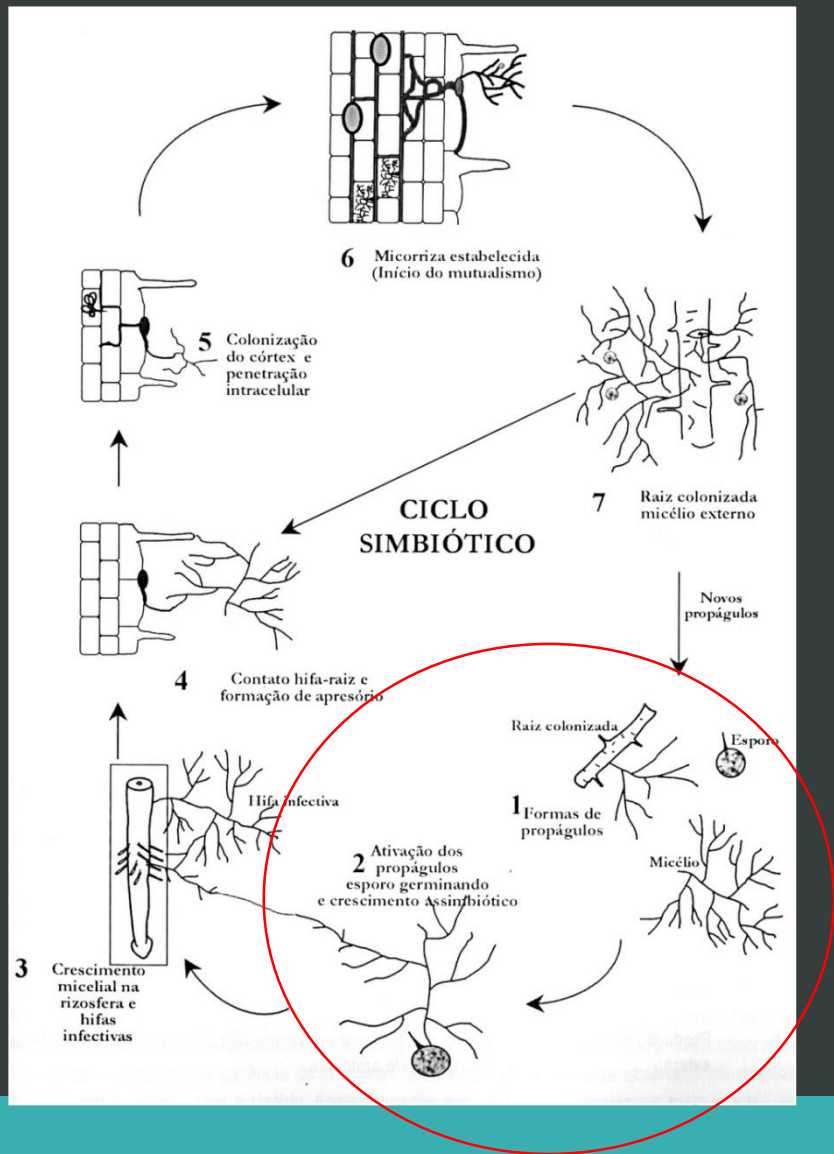
- 80% das famílias de plantas são formadas por espécies que formam micorrizas arbusculares (MAs).
- Ocorrem em praticamente todas as espécies de angiospermas e gimnospermas, além de briófitas e pteridófitas .
- Fungos mais abundantes dos ecossistemas tropicais .
- Sistemas agrícolas - podem representar quase 50% da biomassa microbiana.

Siqueira e Franco, 1988; Smith e Read, 1997; Olsson et al., 1999

# Estabelecimento da relação simbiótica

O esporo germina sem influência da planta.

O desenvolvimento da hifa é limitado na ausência da planta hospedeira.

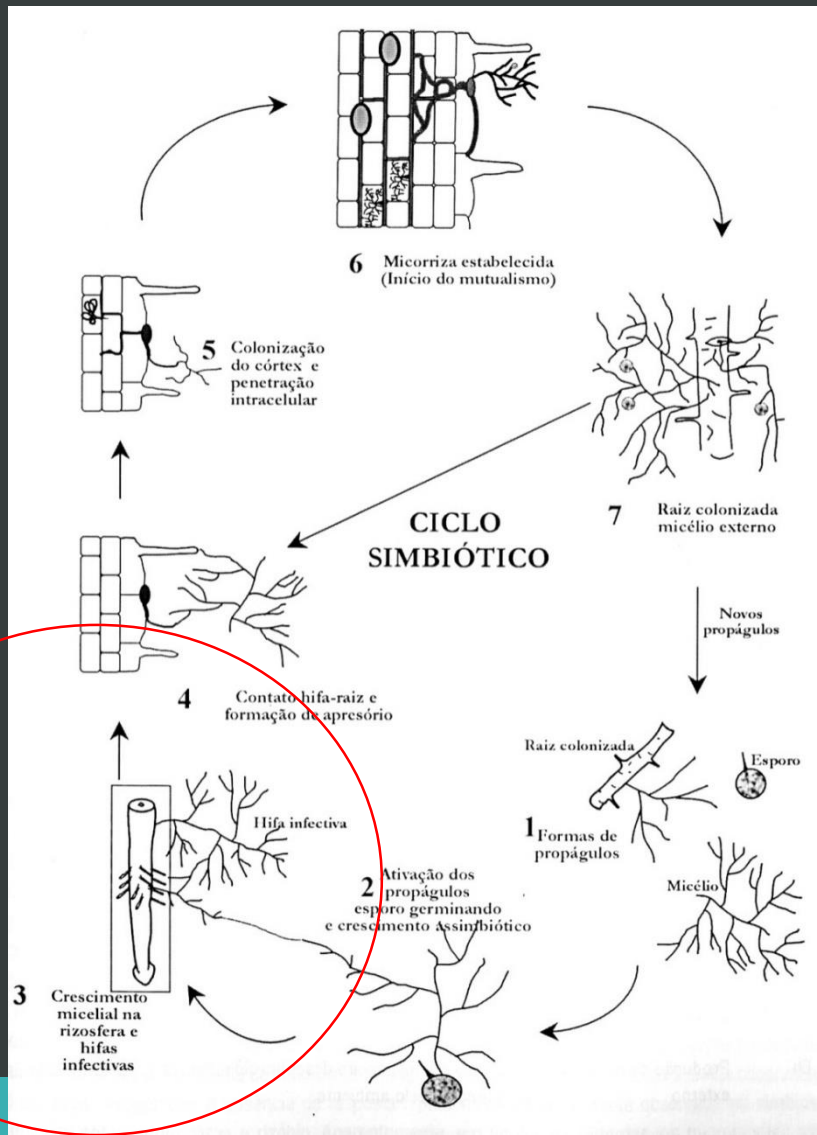


# Estabelecimento da relação simbiótica

Planta libera exsudados (Formonometina, Biocanina A, Quercetinina, Hesperitina, Naringenina, Apigenina).

Ocorrem alterações fisiológicas na hifa.

O crescimento micelial é ativado.

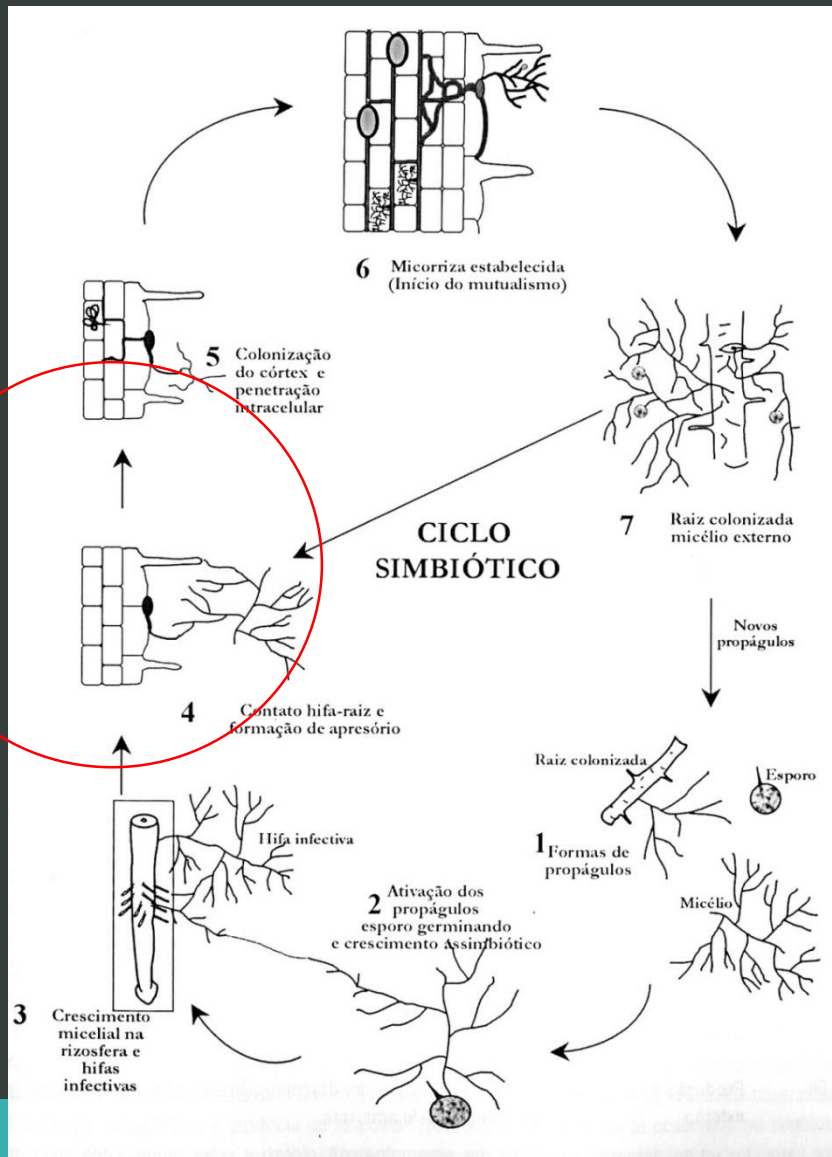


# Estabelecimento da relação simbiótica

Ocorre a diferenciação da hifa infectiva em apressório e a penetração (processo de infecção propriamente dito).

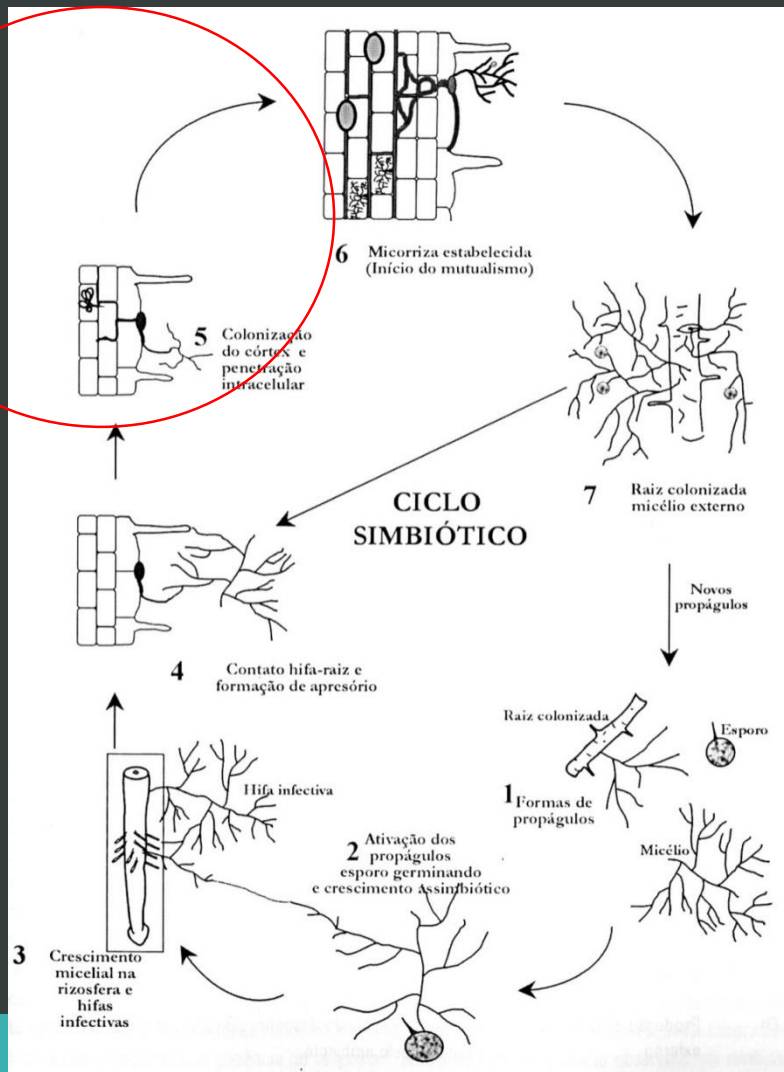
Forma-se por pressão mecânica e degradação enzimática parcial da parede celular vegetal (pectinases, celulases e hemicelulases produzidas
pelo fungo).

Permite colonizar o hospedeiro.

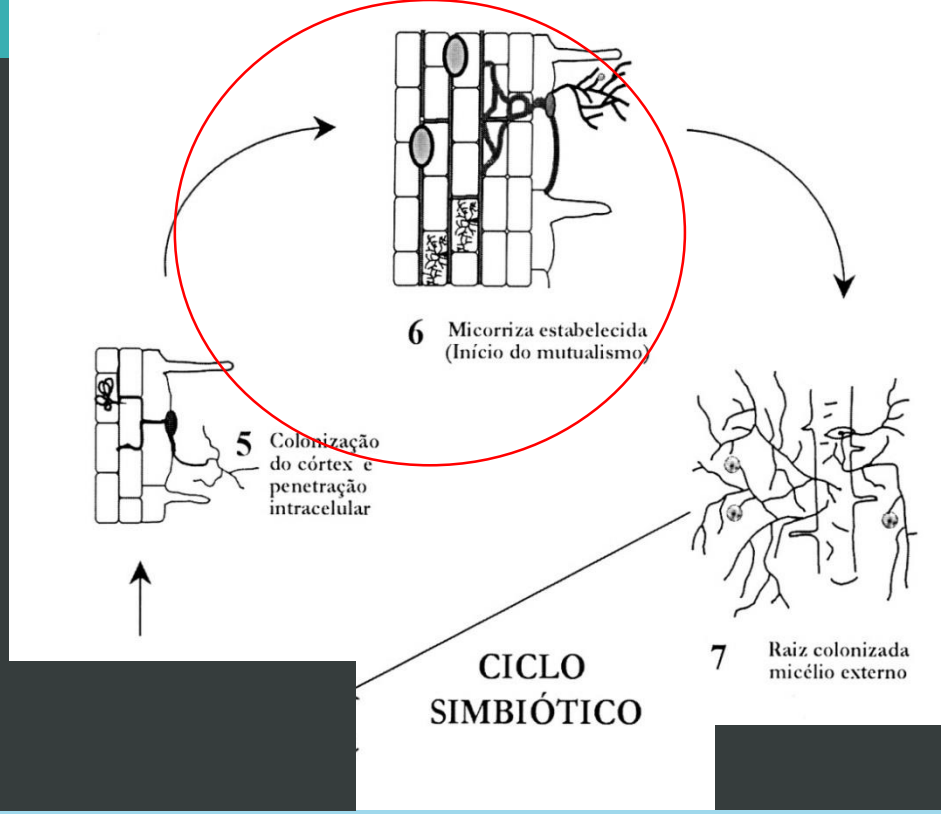


# Estabelecimento da relação simbiótica

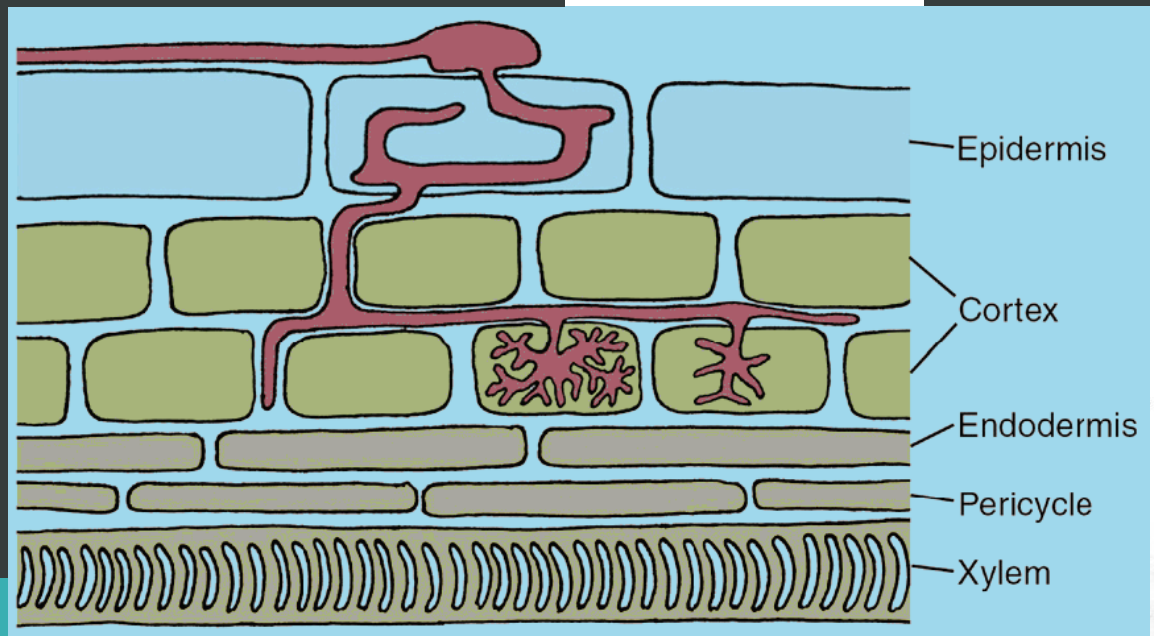
Colonização do córtex e penetração intracelular.



Alterações celulares:
núcleo mais central,
cromatina descondensa,
vacúolo fragmenta-se,
reorganização do citoesqueleto, plastos tubulares.



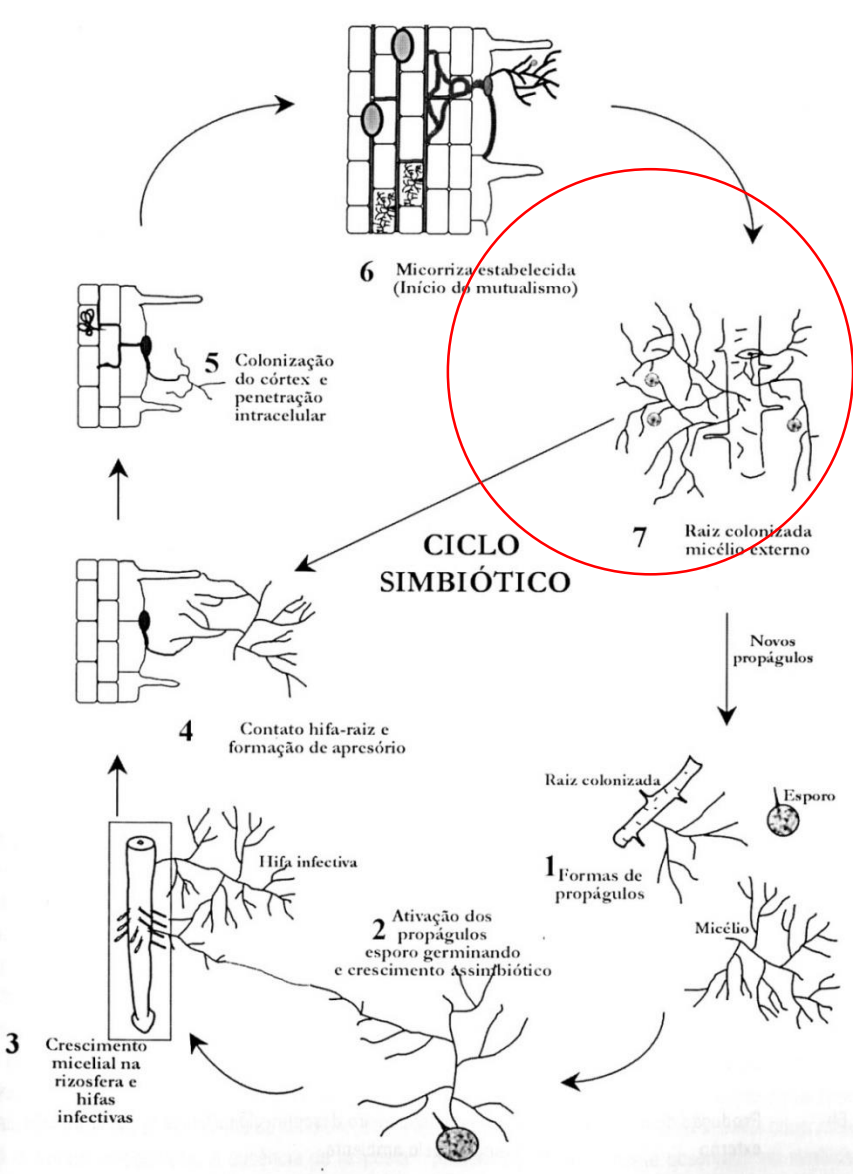

Formação dos arbúsculos para a troca de nutrientes.



# Estabelecimento da relação simbiótica

Formação de um micélio extra-radicular produtor de esporos.

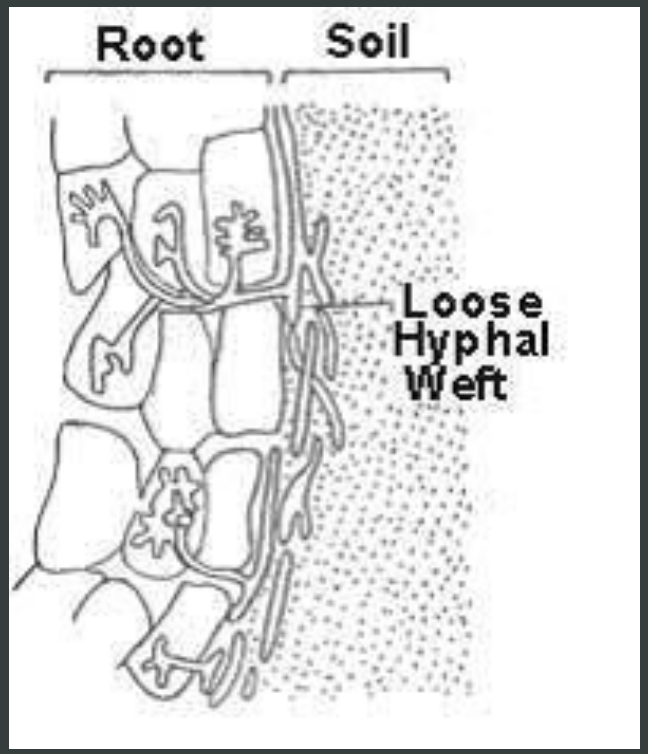
O citoplasma dos simbiontes nunca se mistura - são separados pelas membranas plasmáticas da planta e do fungo - interface simbiótica.



## 3- Ectendomicorrizas

- É um tipo intermediário entre as endomicorrizas e as ectomicorrizas.
- Recobertas pelo manto micelial (ou ausente).
- Possuem rede de Hartig bem desenvolvida.
- Tem alto grau de penetração intracelular (especialmente nas partes mais velhas da raiz).

# 3- Ectendomicorrizas



Ocorrem principalmente entre coníferas (*Pinus*) e o fungo ascomicetos do gênero *Tricharina.*

## 3- Ectendomicorrizas

- Ocorrem principalmente em plântulas de Gimnospermas (Coníferas).

- Fungos Ascomicetos: *Tricharina, Phialophora, Chloridium, Mycilium.*

*Tricharina gilva*

- Quando as mudas tornam-se adultas as ectendomicorrizas tornam-se ectomicorrizas.

# 4- Orquidoide (Família Orquidaceae)

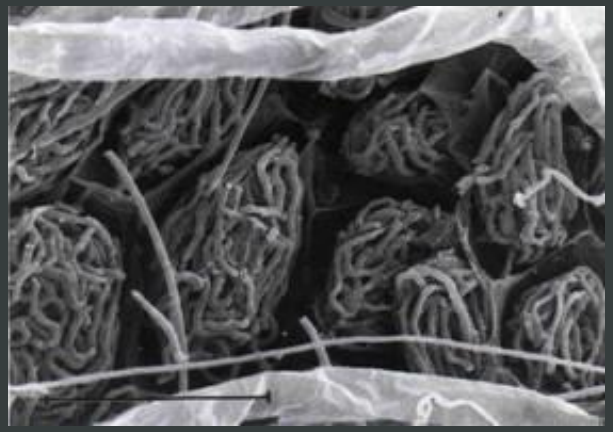
## 4- Orquidoide (Família Orquidaceae)

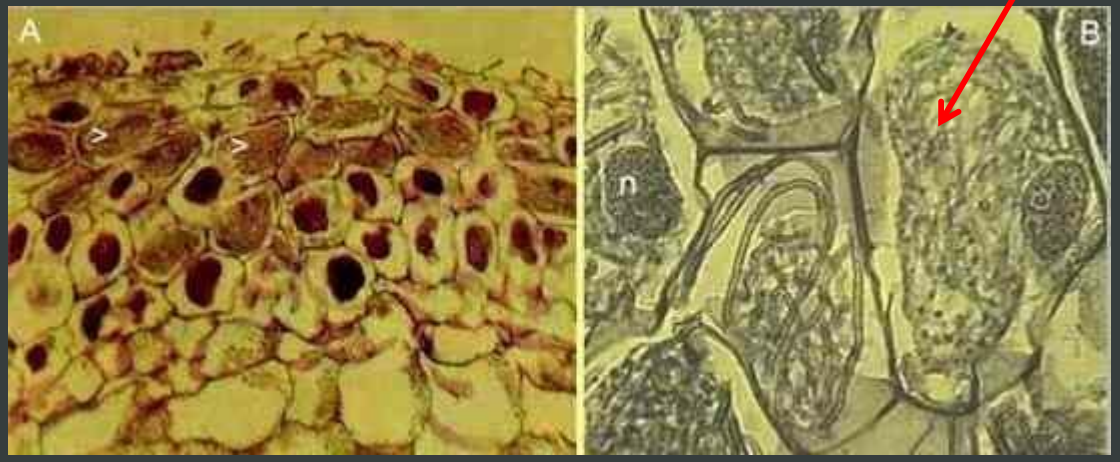
- Têm função essencial no ciclo de vida das orquídeas.
  - 1) As orquídeas possuem sementes com poucas reservas para o seu crescimento inicial.
  - 2) Após a germinação, a planta é colonizada por fungos micorrízicos.

## 4- Orquidoide (Família Orquidaceae)

- 3) Estes crescem no interior das sementes de orquídeas com nutrientes originados do meio (absorvidos pelas hifas).
- 4) Formam **enovelamentos de hifas** no interior da células.
- 5) Estas hifas degeneram-se e a orquídea absorve compostos  orgânicos e vitaminas para o seu crescimento.

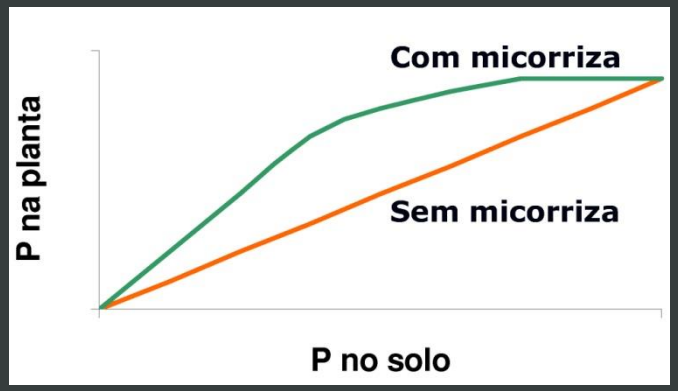
# 4- Orquidoide (Família Orquidaceae)





## Benefícios nutricionais para a planta

- Em solos deficientes em nutrientes é essencial o aumento da área de absorção de nutrientes para explorar maior volume de solo.



# Benefícios nutricionais para a planta

Efeito da inoculação de *Glomus intraradices* em palmeiras

Comparação entre uma planta de café sem micorriza e sem P com uma planta sem P e inoculada com *Gigaspora margaritae*

# Benefícios NÃO nutricionais para a planta

- Proteção contra patógenos:
  - Proteção física devido ao manto.
  - Indução de mecanismos de resistência.
  - Competição e produção de antibióticos.

**Efeito da micorrização no crescimento de ameixeira na presença do nematóide *Meloidogyne* sp.**

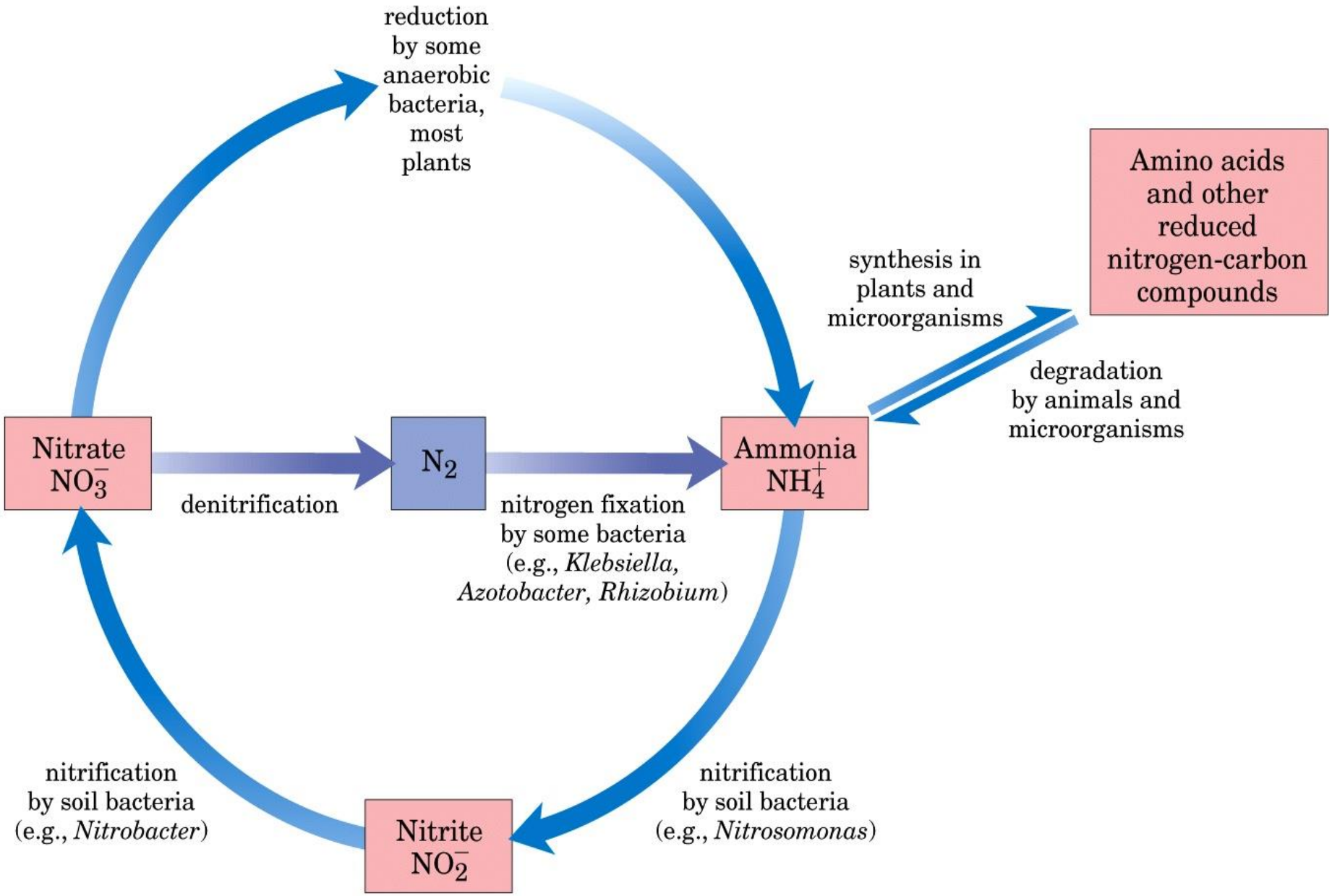
# Ciclo do Nitrogênio

Importância do nitrogênio

- ✓ $N_2$: 76% da composição da atmosfera
- ✓ Compostos de nitrogênio: fundamentais para a vida (aminoácidos, proteínas em geral: tecidos musculares, hormônios, DNA, etc.)
- ✓ $N_2O$: óxido nitroso - gás de efeito estufa
- ✓ Contaminação da água, eutrofização, chuva ácida, formação de ozônio na troposfera (fertilizantes).

## Fontes de nitrogênio

1. Ar (solo): $N_2$ (plantas fixadoras)
2. solução do solo: $NO_3^-$ e $NH_4^+$


reduction by some anaerobic bacteria, most plants
Amino acids and other reduced nitrogen-carbon compounds
synthesis in plants and microorganisms
degradation by animals and microorganisms
Nitrate $NO_3^-$
$N_2$
Ammonia $NH_4^+$
denitrification
nitrogen fixation by some bacteria (e.g., *Klebsiella, Azotobacter, Rhizobium*)
nitrification by soil bacteria (e.g., *Nitrobacter*)
Nitrite $NO_2^-$
nitrification by soil bacteria (e.g., *Nitrosomonas*)

## Ciclo do nitrogênio

- Fixação biológica: 170 milhões de ton/ano;
- Fixação industrial: 80 milhões de ton/ano;
- Volatilização da NH3: 100 milhões de ton/ano;
- Denitrificação: 170 milhões de ton/ano.

# Transformação do nitrogênio no solo

## Fixação industrial de nitrogênio

- Fritz **Haber:** vencedor do premio Nobel de química em 1918. Síntese da amônia ($NH_3$) a partir de hidrogênio ($H_2$) e nitrogênio ($N_2$).

- Carl **Bosch**: vencedor do prêmio Nobel da química em 1931: escala industrial na síntese de amônia.

# Fixação industrial de nitrogênio

**Processo Haber-Bosch**

$$3H_2 + N_2 \rightarrow 2(NH_3)$$

Catalisadores, temperatura e pressão elevadas

## 1 – Fixação industrial de nitrogênio

### Impacto humano

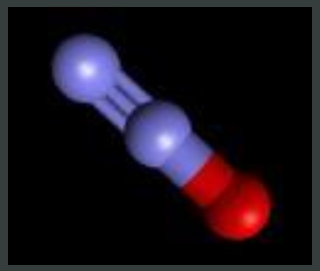
- Contaminação da água subterrânea com nitratos

- Eutrofização (proliferação de bactérias que consomem o oxigênio) – morte do ecossistema aquático

## 2 – Queima de biomassa e combustível fóssil

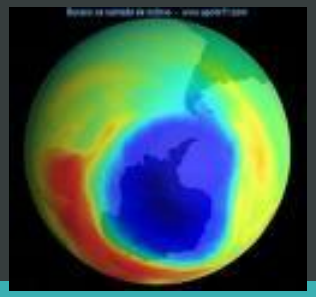
Impacto humano

Denitrificação ($N_2O$)



- Óxido nitroso: molécula de efeito estufa 296 VEZES mais potente que o $CO_2$
- Terceiro gás em contribuição para o Efeito Estufa

- Tempo de residência médio na atmosfera: 120 anos
- Atinge as elevadas altitudes da Estratosfera (~50 km)
- Contribui para a destruição da camada de ozônio



# Fixação biológica de nitrogênio

## Fixação biológica de nitrogênio

- Apenas procariotos são capazes de fixar o nitrogênio atmosférico
  - Bacteria e Archaea

**TABLE 12.2**
**Examples of organisms that can carry out nitrogen fixation**

| Symbiotic nitrogen fixation | |
|---|---|
| **Host plant** | **N-fixing symbionts** |
| Leguminous: legumes, *Parasponia* | *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Photorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium* |
| Actinorhizal: alder (tree), *Ceanothus* (shrub), *Casuarina* (tree), *Datisca* (shrub) | *Frankia* |
| *Gunnera* | *Nostoc* |
| *Azolla* (water fern) | *Anabaena* |
| Sugarcane | *Acetobacter* |

| Free-living nitrogen fixation | |
|---|---|
| **Type** | **N-fixing genera** |
| Cyanobacteria (blue-green algae) | *Anabaena*, *Calothrix*, *Nostoc* |
| Other bacteria | |
| Aerobic | *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Derxia* |
| Facultative | *Bacillus*, *Klebsiella* |
| Anaerobic | |
| Nonphotosynthetic | *Clostridium*, *Methanococcus* (archaebacterium) |
| Photosynthetic | *Chromatium*, *Rhodospirillum* |

## Rizobactérias diazotróficas

- Simbiontes
- Endofíticas
- Associativas

## Simbiontes

- *Bradyrhizobium*
- *Sinorhizobium*
- *Azorhizobium*
- *Mesorhizobium*
- *Rhizobium*
- *Frankia* → *Betulaceae, Casuarinaceae, etc*
- *Burkholderia* → *Machaerium lunatum, Aspalathus*
- *carnosa*
- *Methylobacterium* → *Crotalaria*

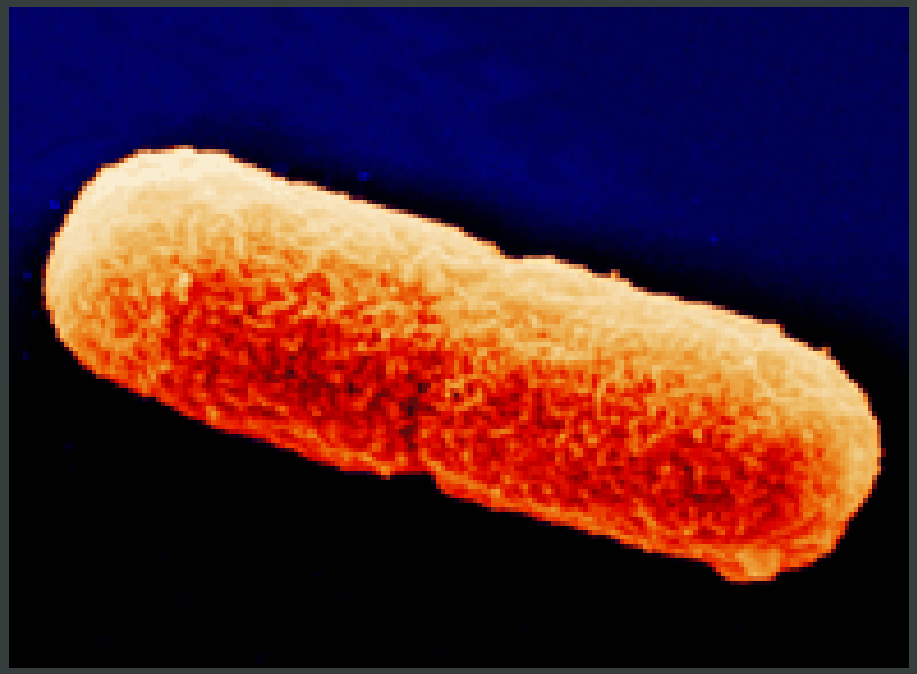
Endofíticos

- *Herbaspirillum seropedicae*
- *Gluconacetobacter diazotrophicus*
- *Klebsiella* sp
- *Azoarcus* sp

## Associativos

- *Azospirillum* sp
- *Azotobacter* sp

# *Azotobacter*

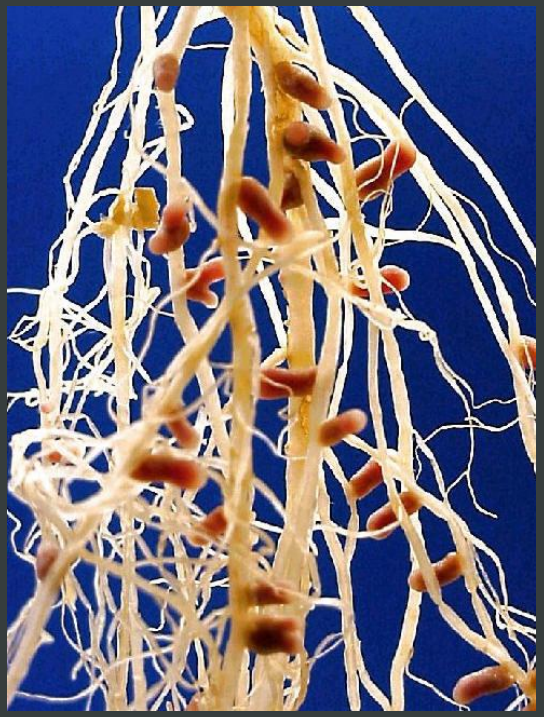


http://www.jic.ac.uk/SCIENCE/molmicro/Azoto5.gif

# Cianobactérias

www.enq.ufsc.br/.../CIANOBACTERIAS.jpg

# *Rhizobium* sp



http://recursos.cnice.mec.es/biosfera/alumno/1bachillerato/organis/imagenes/rhizobium.jpg

*Bradyrhizobium sp*

## *Herbaspirillum* sp

http://www.funpar.ufpr.br:8080/funpar/boletim/novo2/images/Image/H_seropedicae.jpg

*Azospirillum* sp

# Fixação biológica de nitrogênio

- Equação geral da fixação do N (Nitrogenase é inativada por O2)

$$N_2 + 8\,H^+ + 8\,e^- \quad 2\,NH_3 + H_2$$

# Fixação simbiótica de N2

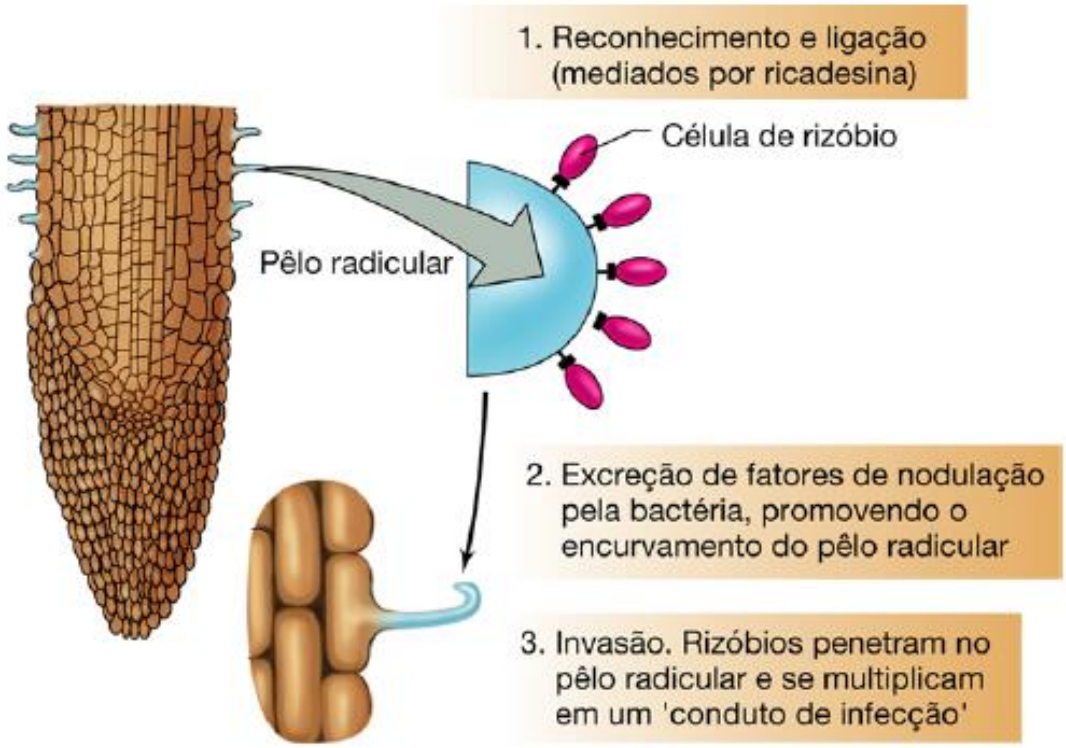
# Especificidade

| Genus | Species | Host plant |
|---|---|---|
| *Rhizobium* | *leguminosarum bv. trifolii* | *Trifolium* (clovers) |
| | " *bv. viciae* | *Pisum* (peas), *Vicia* (field beans), |
| | " *bv. phaseoli* | *Lens* (lentils), *Lathyrus* |
| | *tropici* | *Phaseolus* (bean) |
| | *etli* | *Phaseolus* (bean), *Leucaena* |
| | | *Phaseolus* (bean) |
| *Sinorhizobium* | *meliloti* | *Melilotus* (sweetclover), |
| | *fredii* | *Medicago* (alfalfa), *Trigonella* |
| | *saheli* | *Glycine* (soybean) |
| | *teranga* | *Sesbania* |
| | | *Sesbania, Acacia* |
| *Bradyrhizobium* | *japonicum* | *Glycine* (soybean) |
| | *elkanii* | *Glycine* (soybean) |
| | *liaoningense* | *Glycine* (soybean) |
| *Azorhizobium* | *caulinodans* | *Sesbania* (stem nodule) |
| *'Meso rhizobium'* | *loti* | *Lotus* (trefoil) |
| | *huakuii* | *Astragalus* (milkvetch) |
| | *ciceri* | *Cicer* (chickpea) |
| | *tianshanense* | |
| | *mediterraneum* | *Cicer* (chickpea) |
| *[Rhizobium]* | *galegae* | *Galega* (goat's rue), *Leucaena* |
| *Photorhizobium* | spp. | *Aeschynomene* (stem nodule) |

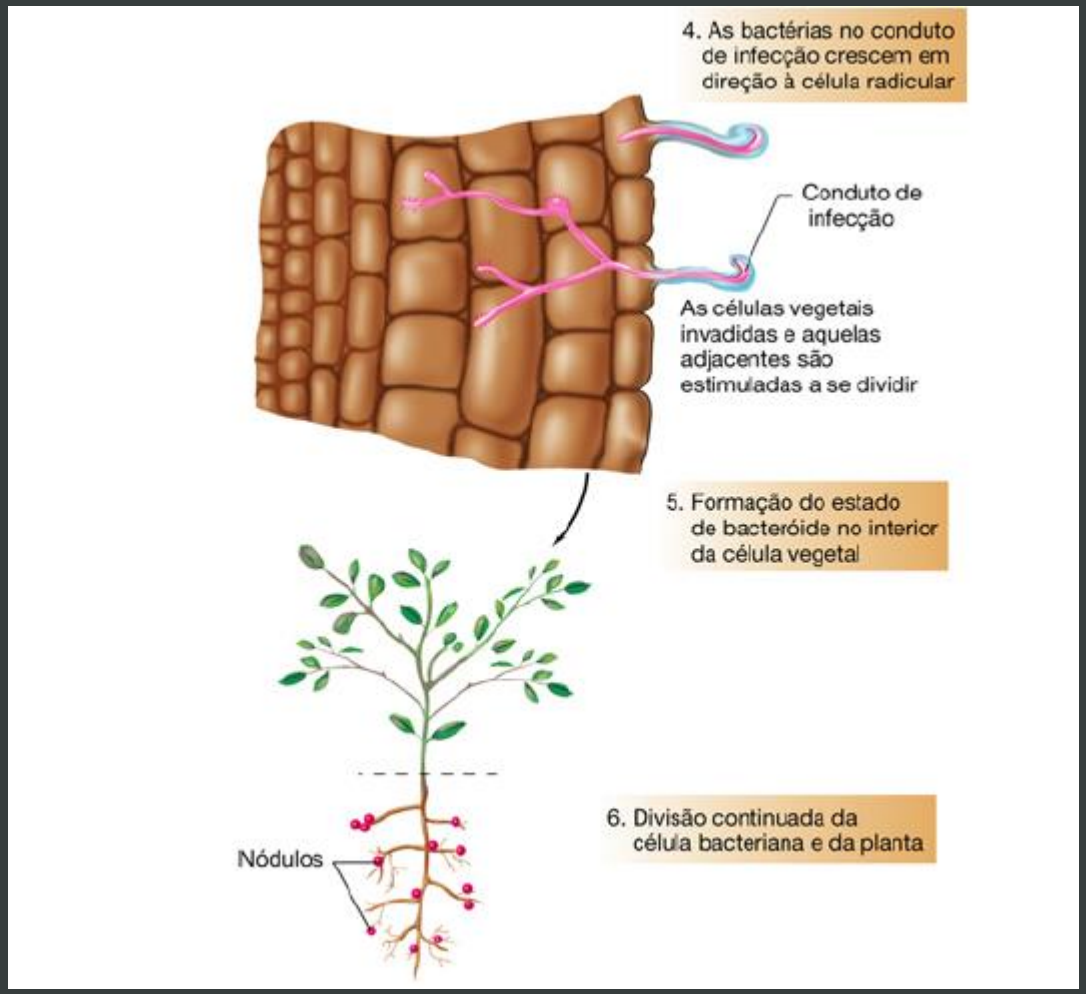
Nódulos de alfafa

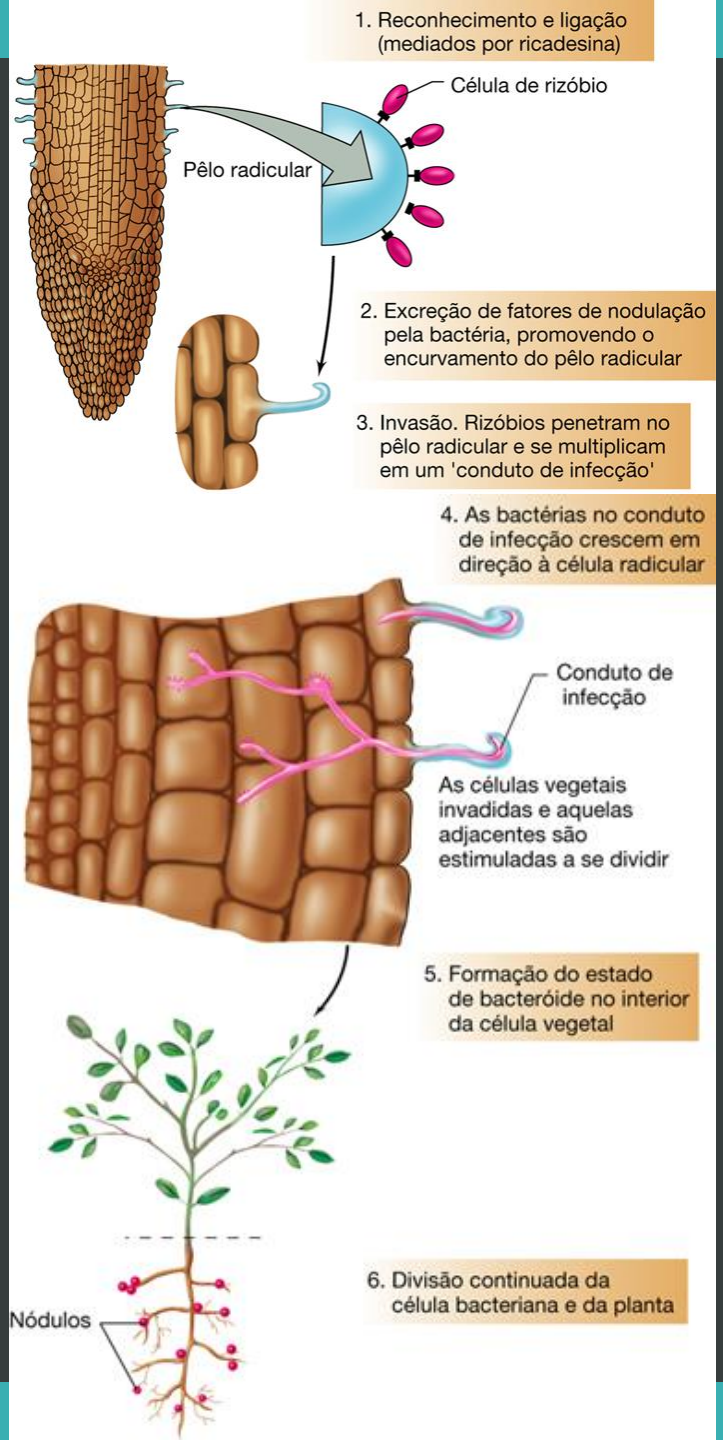
Nódulos de soia

# Fixação simbiótica de N2

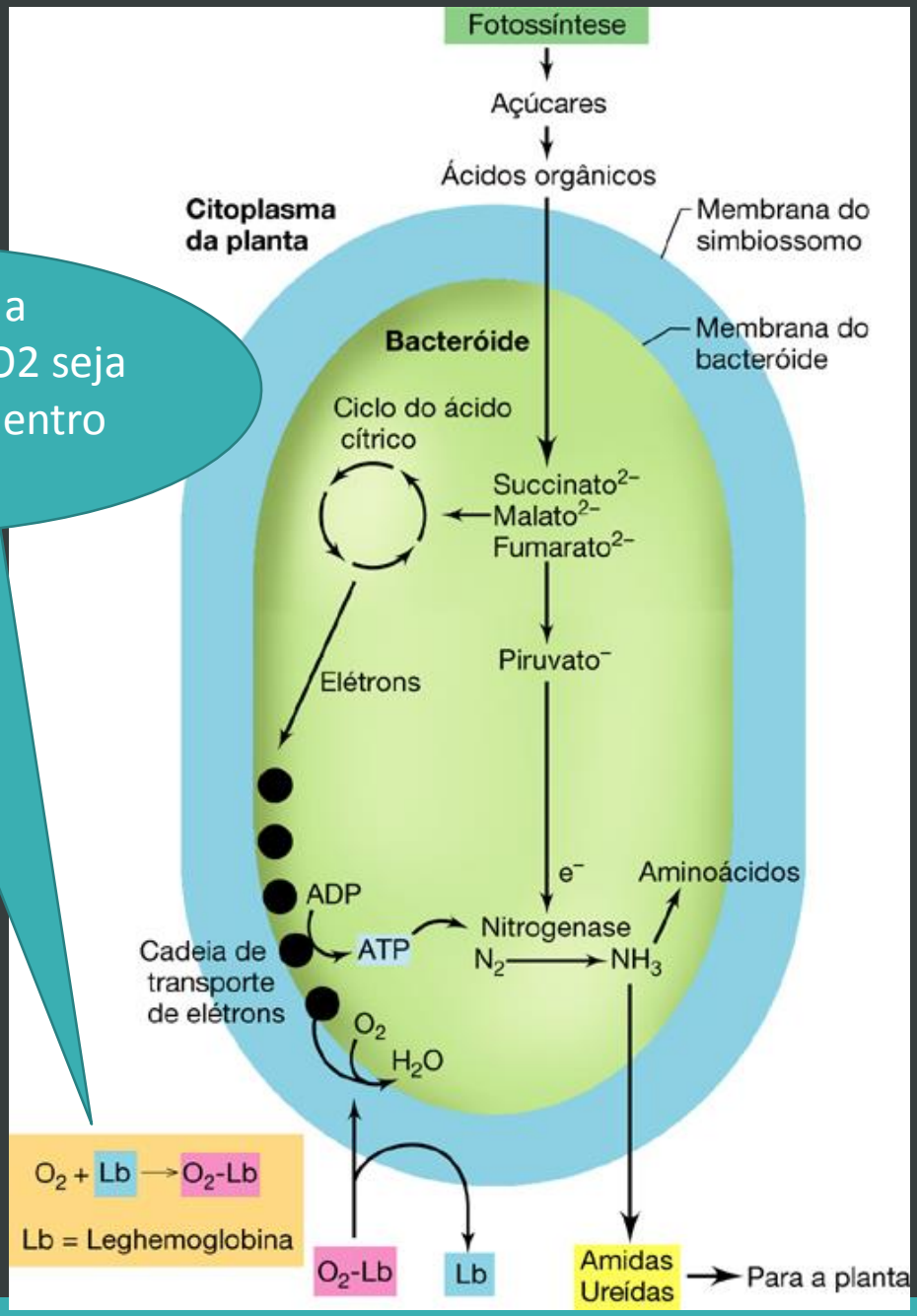


# Fixação simbiótica de N2




1. Reconhecimento e ligação (mediados por ricadesina)
Célula de rizóbio
Pêlo radicular
2. Excreção de fatores de nodulação pela bactéria, promovendo o encurvamento do pêlo radicular
3. Invasão. Rizóbios penetram no pêlo radicular e se multiplicam em um 'conduto de infecção'
4. As bactérias no conduto de infecção crescem em direção à célula radicular
Conduto de infecção
As células vegetais invadidas e aquelas adjacentes são estimuladas a se dividir
5. Formação do estado de bacteróide no interior da célula vegetal
6. Divisão continuada da célula bacteriana e da planta
Nódulos

Garante que a concentração de O2 seja muito reduzida dentro do nódulo



# *Rhizobium* dentro do nódulo

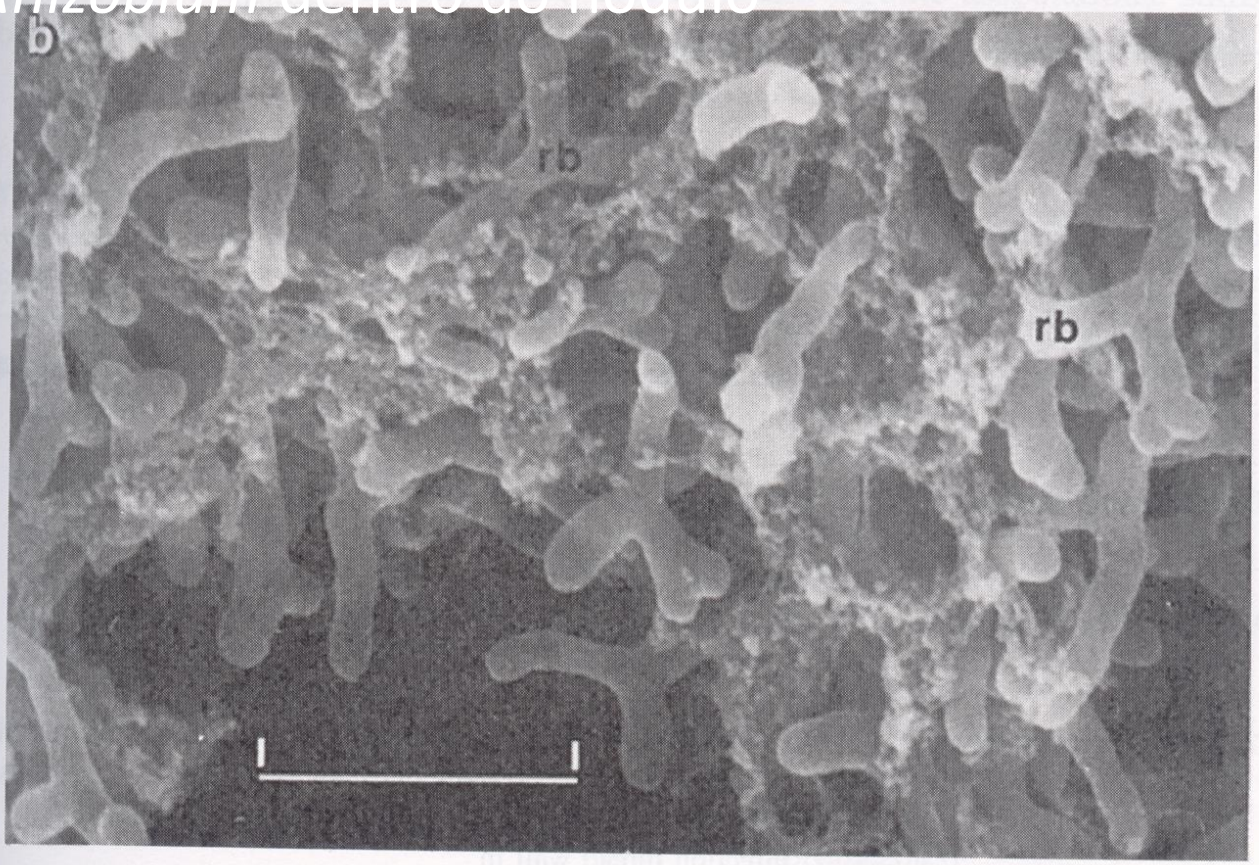



FIGURE 10.5 Scanning electron micrographs of root nodule microsymbionts. (a) *Frankia* within a root nodule cell of *Eleagnus*. The filamentous nature of the endophyte can be seen. Vesicles (v) are visible protruding out of the mass of plant cell cytoplasm and the vegetative mycelium. Bar = 10 $\mu$m. (b) Rhizobial bacteriods (rb) within a root nodule cell of *Vicia*. Note the bacteroids are Y-shaped and single-celled. Bar = 5 $\mu$m. (From Baker and Schwintzer, 1990.)

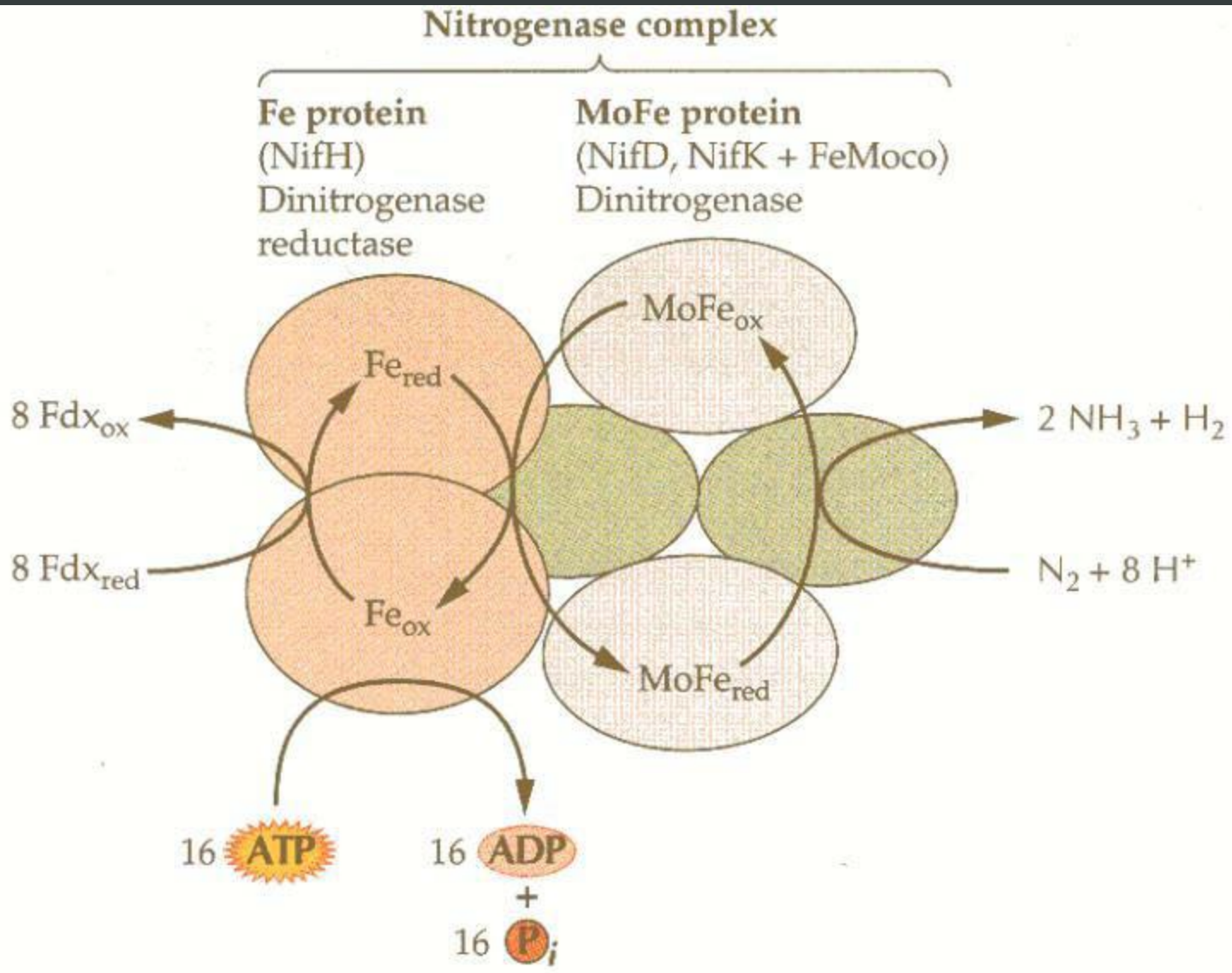

Nitrogenase complex
Fe protein
(NifH)
Dinitrogenase
reductase
MoFe protein
(NifD, NifK + FeMoco)
Dinitrogenase
$MoFe_{ox}$
$Fe_{red}$
8 $Fdx_{ox}$
2 $NH_3$ + $H_2$
8 $Fdx_{red}$
$N_2$ + 8 $H^+$
$Fe_{ox}$
$MoFe_{red}$
16 ATP
16 ADP
+
16 $P_i$

Figure 16.6

# A nitrogenase e a fixação

**1.** A reação de fixação do nitrogênio caracteriza-se pela *redução* do $N_2$ à $NH_3$ ($NH_4^+$).

$$\mathbf{N_2} \xrightarrow[\textbf{Nase}]{} \mathbf{NH_3\ (NH_4^+)}$$

A nitrogenase e a fixação

2. Para que a reação ocorra, é necessário que haja um transporte de elétrons, mediado por moléculas aptas a realizá-lo.

3. A enzima nitrogenase é formada por duas unidades protéicas, a Ferro-proteína (Fe-proteína) e a Molibdênio-Ferro-proteína (MoFe-proteína), ambas capazes de transportar elétrons. Durante a reação de redução do $N_2$, a nitrogenase é auxiliada por uma terceira molécula transportadora de elétrons, a ferridoxina.

## Leghemoglobina

- As células das raízes da planta, bem como os próprios bacterióides, precisam de $O_2$ para a respiração celular. Mas o oxigênio ($O_2$) é altamente inibitório para a atividade da Nitrogenase (Nase).

## Estratégias para evitar o excesso de oxigênio no nódulo

**Estratégia anatômica**: o parênquima do nódulo funciona como uma barreira de difusão do $O_2$. Os espaços intercelulares são pequenos e pouco numerosos, podendo ser preenchidos com água. Logo, a entrada de $O_2$ no interior do nódulo é muito dificultada.

## Estratégias para evitar o excesso de oxigênio no nódulo

- **Estratégia bioquímica**: as células vegetais da região central do nódulo produzem a ***leghemoglobina*** (hemoglobina das leguminosas). Essa molécula é um carregador de $O_2$, que garante que os bacterióides recebam o $O_2$ necessário para sua respiração, evitando que o gás circule livremente no nódulo.

## Genes envolvidos na fixação biológica de nitrogênio

NAS BACTÉRIAS: Família Rhizobiaceae.

- Genes *nif*, aparentemente estão envolvidos com a síntese da **nitrogenase.**

- Genes *fix* produzem as moléculas que regulam o processo de fixação. Por exemplo, sabe-se que o gene *fix* X codifica a **ferridoxina** nessas bactérias.

## Genes envolvidos na fixação biológica de nitrogênio

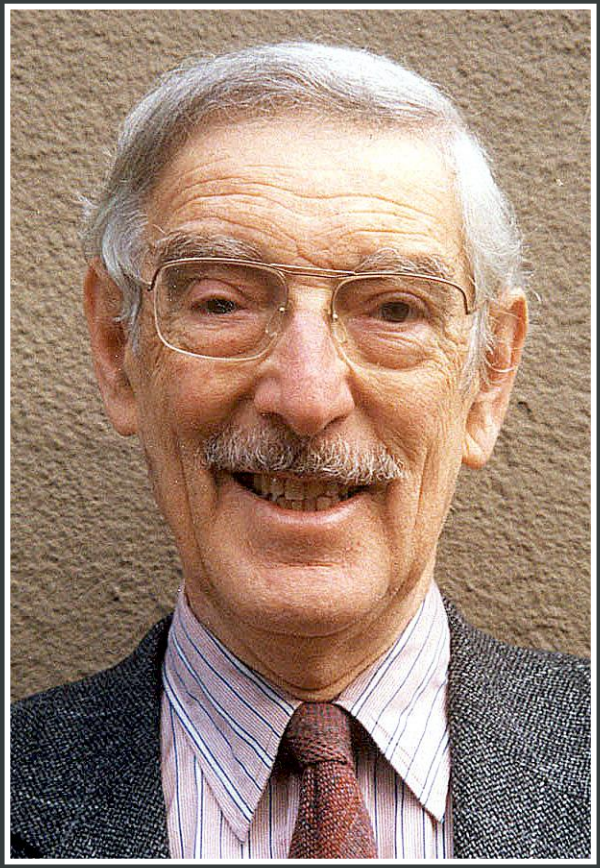
- Genes *nod* (nodulação) são encontrados na bactéria, sendo responsáveis pela produção da **proteína** que recebe o sinal químico da planta hospedeira (os flavonóides-antocianinas) e pela produção das enzimas que sintetizam o fator de nodulação.

# Monitoramento ambiental

# Teste de Ames

- Bruce Ames e colaboradores, 1970s.
- Testa a mutagenicidade de diferentes compostos.
- É usado pelo FDA para testar diversas substâncias químicas, de forma rápida e com baixo custo.
- Utiliza linhagens de bactérias que são muito sensíveis a diversos agentes mutagênicos.

# TESTE DE AMES



Bruce Ames (Universidade de Bekerley, CA)

*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*
Vol. 70, No. 3, pp. 782–786, March 1973

# An Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens

**(*Salmonella typhimurium*/lipopolysaccharide/frameshift mutations)**

BRUCE N. AMES, FRANK D. LEE, AND WILLIAM E. DURSTON

Biochemistry Department, University of California, Berkeley, Calif. 94720

*Contributed by Bruce N. Ames, January 11, 1973*

**ABSTRACT** **We previously described a set of four strains of *Salmonella typhimurium* designed for detecting the various types of mutagens, and showed their utility in detecting a wide variety of carcinogens as mutagens. The lipopolysaccharide that normally coats these bacteria is a barrier to penetration of mutagens to the cell membrane. The set of tester strains has been improved by adding a mutation (*rfa:* deep rough) that results in a deficient lipopolysaccharide. The techniques for using these strains for detecting mutagens are presented and the tests are shown to be extremely sensitive and convenient. The specificity of frameshift mutagenesis is clarified. As adjuncts to the test with the four strains, we describe a test that compares mutagenic killing in deep rough strains with and without DNA excision repair, and a test using forward mutagenesis in a deep rough strain lacking excision repair.**

permeable and completely nonpathogenic. The TA1535 set (TA1535, TA1536, TA1537, TA1538), which is *rfa* and *uvrB*, is recommended for general testing for mutagens and carcinogens *in vitro*, as it is the most sensitive to mutagenesis. The TA1975 set is used for examining the effect of repair on mutagenesis and killing (in comparison to the TA1535 set). The TA1950 set and TA1530 set are less sensitive to mutagens *in vitro*, but may be required for use in the host-mediated assay in which *Salmonella* strains are incubated in the peritoneum of a mouse or rat (5). For good mutagenesis, especially with frameshift mutagens, there must be some bacterial multiplication in the peritoneum; this multiplication is influenced by the type of LPS. Which of the three sets to use must be determined for each type of animal. We

# Aplicações do teste de Ames

- Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental (SBMCTA) → orientações básicas para realização dos testes de mutagenicidade, Cetesb/L5.621:
  - Produtos: químicos, naturais, sintéticos, fitoterápicos, amostras ambientais.

# Aplicações do teste de Ames

- Controle do processo de tratamento de água de abastecimento público em relação a:
  - Remoção de compostos mutagênicos presentes nos mananciais que abastecem as estações de tratamento;
  - Possível adição de substâncias mutagênicas durante o tratamento;
  - Presença de substâncias com atividade mutagênica na água de consumo.

# Aplicações do teste de Ames

- Avaliar a eficiência dos processos de tratamento de esgoto e efluentes industriais na remoção ou presença desses compostos;
- Avaliar aditivos alimentares, corantes, pesticidas, produtos naturais, fluidos corpóreos (urina, fezes, sangue), medicamentos e materiais utilizados em biomedicina, produtos descartáveis (uso externo ou de asseio corporal);
- Caracterizar poluentes mutagênicos em estudos de impacto ambiental e proteção de ecossistemas (p/ tomada de decisões corretivas/preventivas);
- Localizar fontes potenciais de compostos mutagênicos: material particulado, solo, água, alimentos, áreas industrializadas, agrícolas, urbanas, visando o controle dos poluentes.

# Teste de Ames

- Linhagens auxotróficas de *Salmonella typhimurium* apenas sobrevivem em meio suplementado com histidina.
- Depois do tratamento com o mutagênico, algumas células auxotróficas tornam-se selvagens, voltando a sintetizar histidina.
- Estas células sobrevivem em meio sem histidina.
- São denominadas revertentes (sofreram mutação reversa).

## Características de linhagens mutantes de *S.typhimurium* utilizadas no teste de Ames

- Não sintetizam histidina.
- São muito suscetíveis a mutações adicionais pois não têm os mecanismos de reparo normais.
- São mais permeáveis a substâncias químicas (inclusive os mutagênicos potenciais) do que as linhagens selvagens.

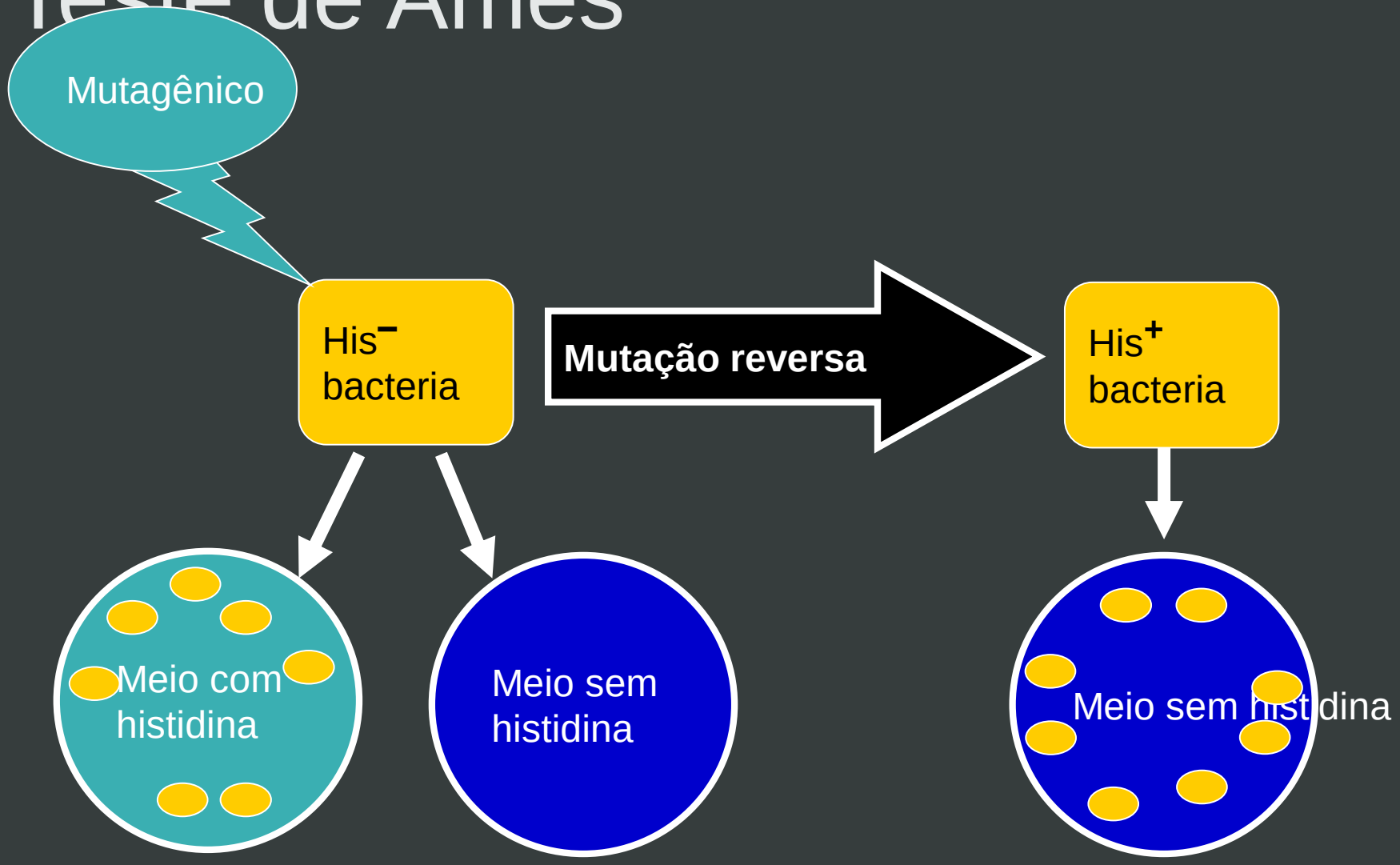
# Linhagens de *S. typhimurium* com diferentes mutações

- **TA 1535** tem uma substituição de base que produz uma mutação de sentido trocado no gene que codifica a primeira enzima da síntese de histidina. (leucina – prolina)
- **TA 100** é muito similar à 1535, mas parece detectar uma gama diferente de mutagênicos.
- **TA 1537** tem uma mutação na matriz de leitura (**deleção de um nucleotídeo**) em um gene diferente de 1535.
- **TA 1538** tem outra mutação na matriz de leitura (**inserção de um nucleotídeo**) no mesmo gene de 1537.
- **TA 98** é similar a 1538 mas detecta mais mutagêncos do que 1538.
- **TA 102** bastante diferente dos demais.  Tem uma mutação sem sentido, no mesmo gene de 1535.

# Linhagens

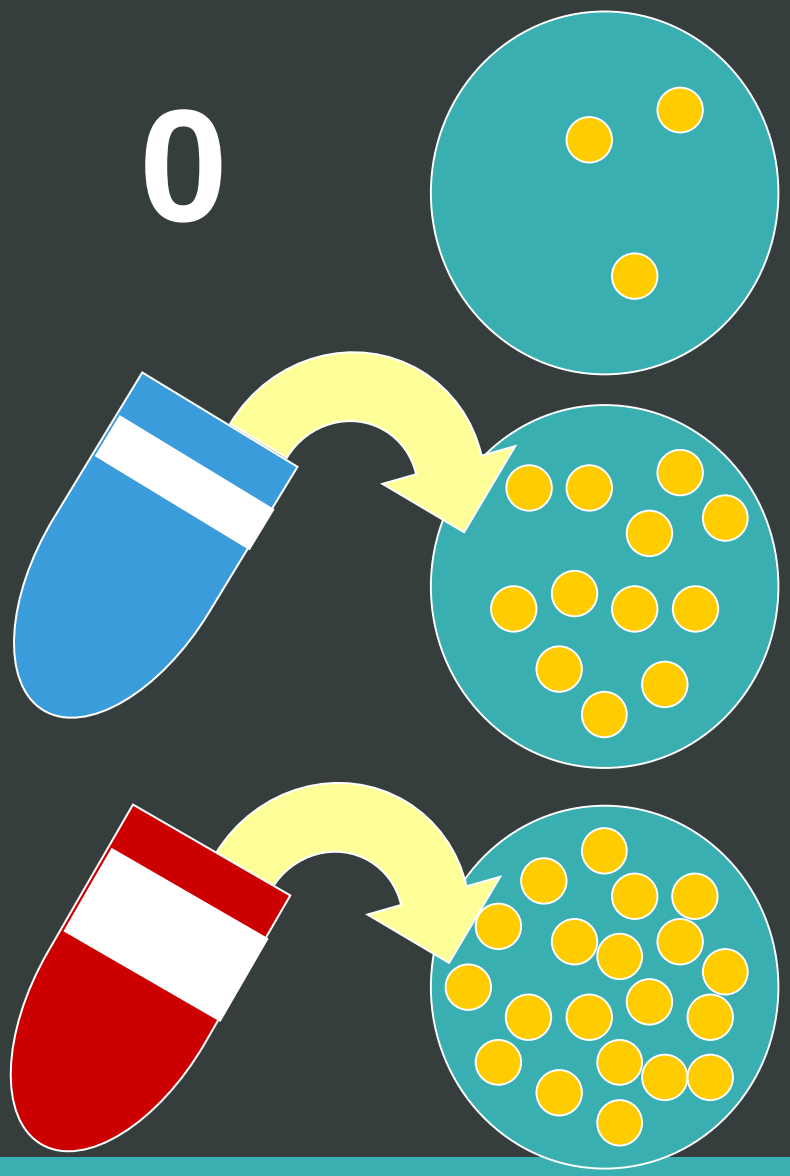
- Culturas auxotróficas (exigência nutritiva) mais utilizadas:
  - *S. typhimurium* (his-)
    - TA1535; TA98; TA100; TA1537; TA97; TA97a; TA102.
  - *E. coli* (triptofano)
    - WP2; WP2 (pKM101).

# Teste de Ames



# Teste de Ames

**0**



Controle negativo

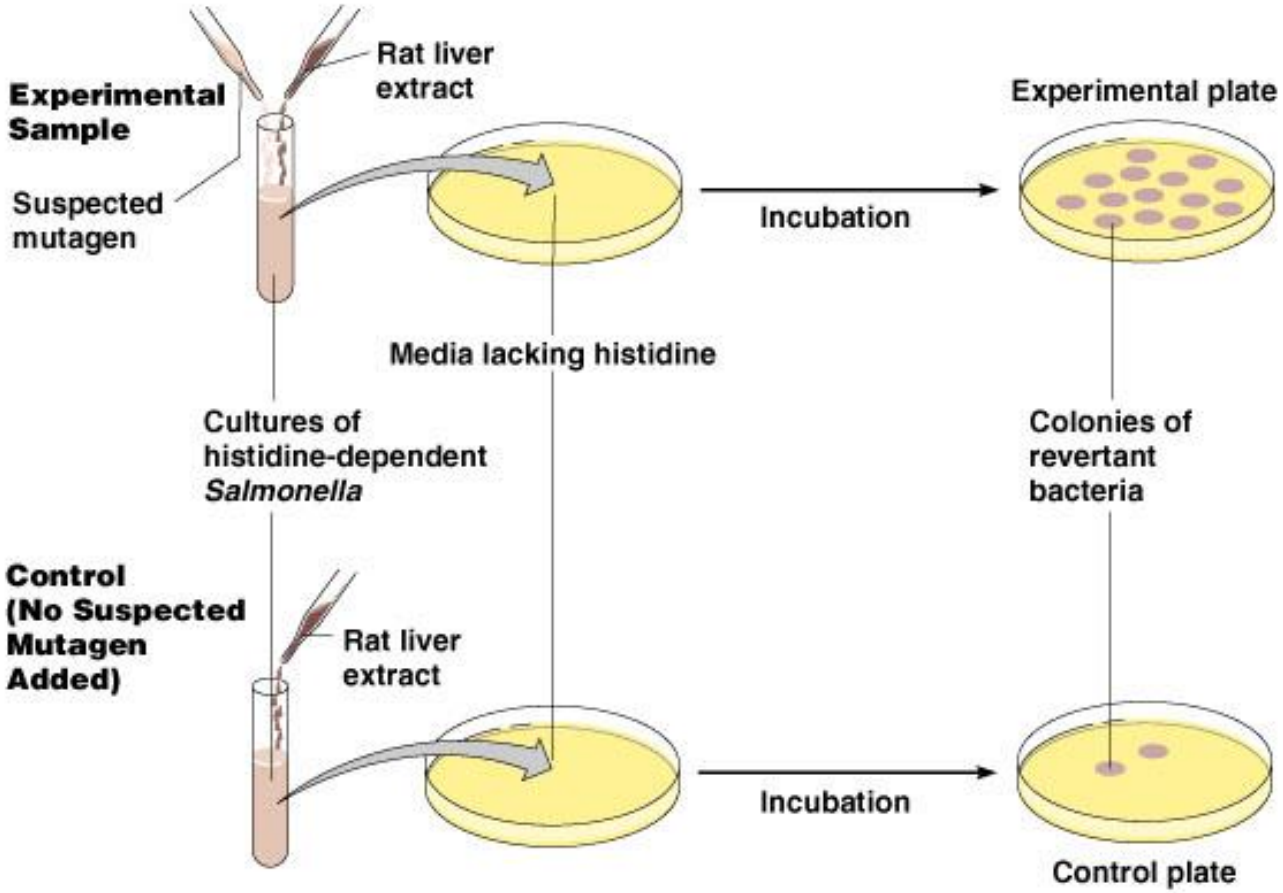
**Revertentes espontâneos**

Placa com o composto a ser testado

**Genotoxicidade confirmada**

Controle positivo

**controle**



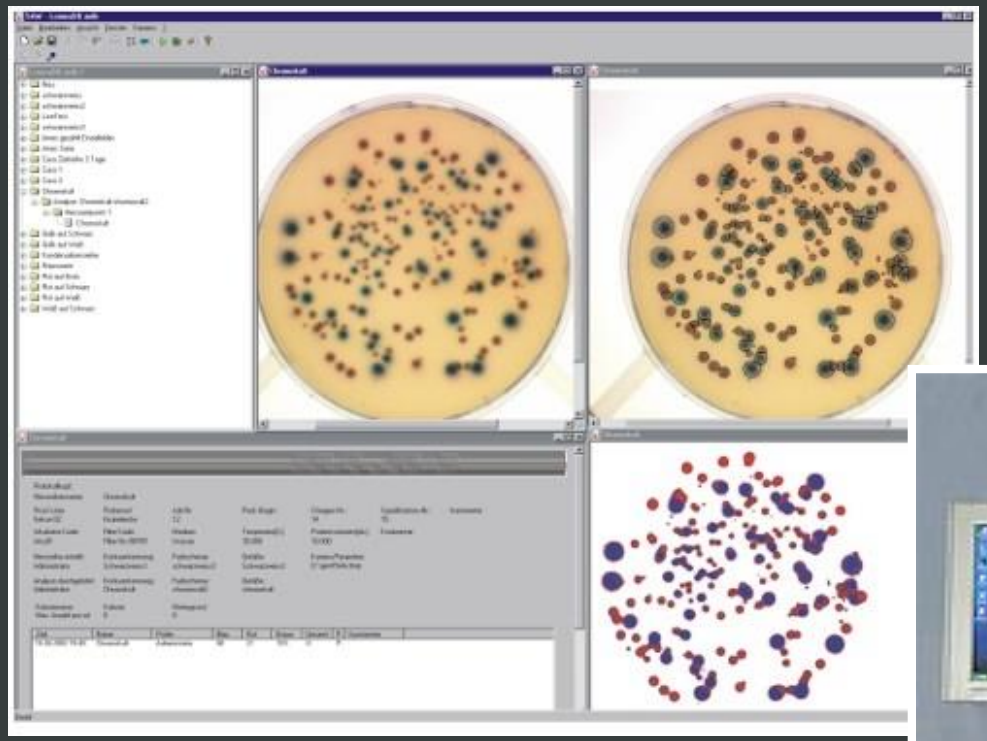

1. Two cultures are prepared of *Salmonella* bacteria that have lost the ability to synthesize histidine (histidine-dependent).
2. The suspected mutagen is added to the experimental sample only; rat liver extract (an activator) is added to both samples.
3. Each sample is poured onto a plate of medium lacking histidine. The plates are then incubated at 37°C for two days. Only bacteria whose histidine-dependent phenotype has mutated back (reverted) to histidine-synthesizing will grow into colonies.
4. The numbers of colonies on the experimental and control plates are compared. The control plate may show a few spontaneous histidine-synthesizing revertants. The test plates will show an increase in the number of histidine-synthesizing revertants if the test chemical is indeed a mutagen and potential carcinogen. The higher the concentration of mutagen used, the more revertant colonies will result.

Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

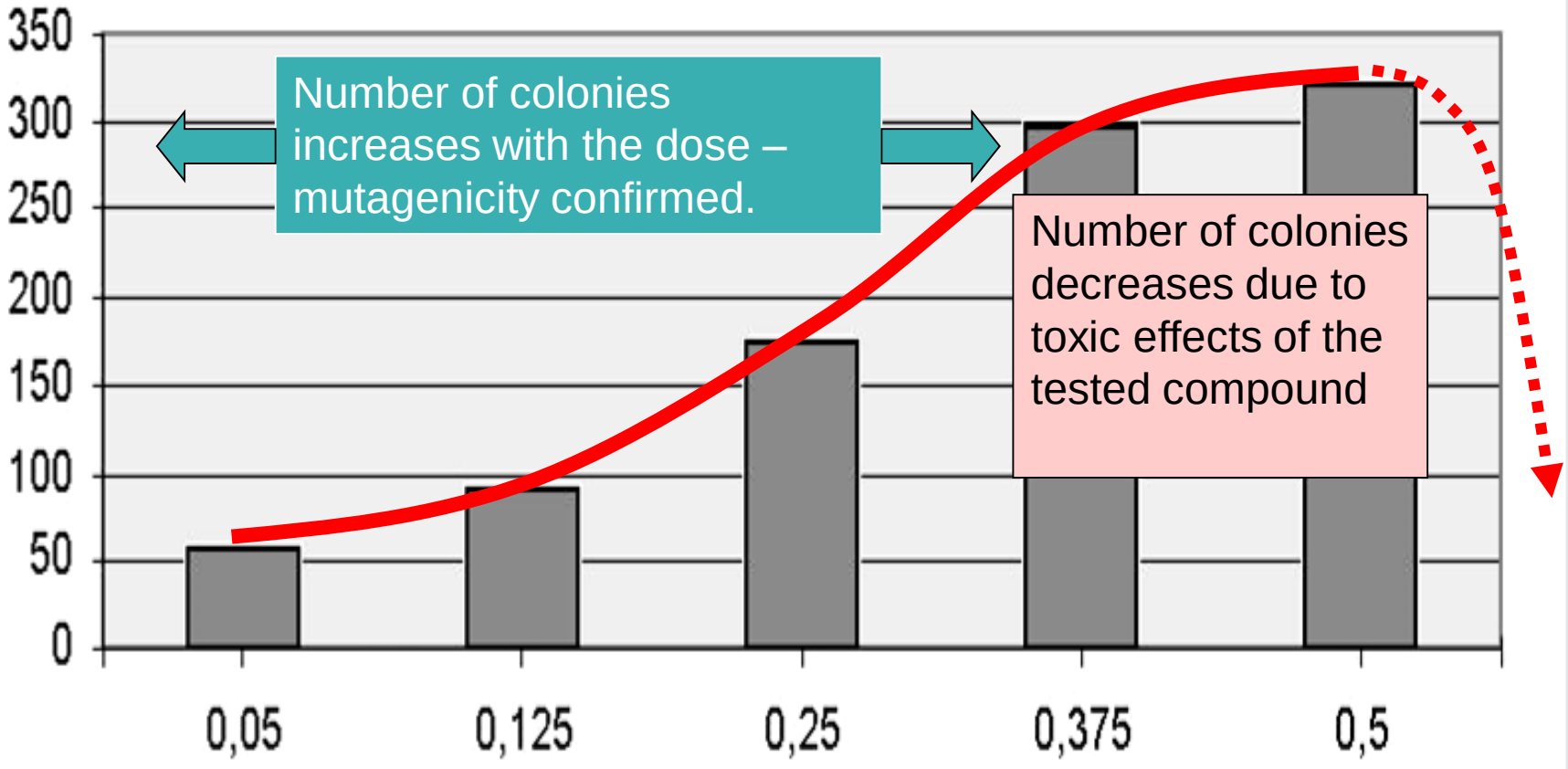
# Teste de Ames

- O ensaio deve ter (mínimo) 5 doses da amostra, 3 repetições /dose ou 7 doses com 2 repetições.

# Teste de Ames – Avaliação automática dos resultados



# Avaliação da atividade mutagênica de 1-nitropireno pelo teste de Ames



# Agente mutagênico x carcinogênico

- Todos os agentes mutagênicos são potencialmente carcinogênicos, mas em alguns casos, a carcinogenicidade não é detectada.
- A avaliação da carcinogenicidade em humanos é difícil e requer a combinação de diversos testes.