

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE AGRONOMIA**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
CIÊNCIA DO SOLO**

**TESE**

**Caracterização Fenotípica e Produção de  
Biopolímeros por Bactérias Isoladas de Nódulos de  
Guandu [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]**

**Paulo Ivan Fernandes Júnior**

**2009**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE AGRONOMIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
CIÊNCIA DO SOLO**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E PRODUÇÃO DE  
BIOPOLÍMEROS POR BACTÉRIAS ISOLADAS DE NÓDULOS DE  
GUANDU [(*Cajanus cajan* (L.) MILLSP.)]**

**PAULO IVAN FERNANDES JÚNIOR**

*Sob a Orientação do Pesquisador*  
**Gustavo Ribeiro Xavier**

*e Co-orientação dos Professores*  
**Paulo Jansen de Oliveira e Norma Gouvêa Rumjanek**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências** em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo.

Seropédica, RJ  
Novembro de 2009

611.01816

F363c

T

Fernandes Júnior, Paulo Ivan, 1981-.

Caracterização fenotípica e produção de biopolímeros por bactérias isoladas de nódulos de Guandu [*Cajanus cajan* (L.) MILLSP.] / Paulo Ivan Fernandes Júnior - 2009.

183 f. : il.

Orientador: Gustavo Ribeiro Xavier.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Agronomia.

Bibliografia: f. 132-155.

1. Guandu - Teses. 2. Nitrogênio - Fixação - Teses. 3. Diversidade biológica - Teses. 4. Inovações tecnológicas - Teses. I. Xavier, Gustavo Ribeiro, 1973-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta tese, desde que seja citada a fonte

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE AGRONOMIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA–CIÊNCIA DO SOLO**

**PAULO IVAN FERNANDES JÚNIOR**

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutor em Ciências**, no curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Ciência do Solo.

TESE APROVADA EM 27/11/2009

---

Gustavo Ribeiro Xavier. Dr. Embrapa Agrobiologia  
(Orientador)

---

Claudia Miranda Martins. Dra. UFC

---

Luís Henrique de Barros Soares. Dr. Embrapa Agrobiologia

---

Adelson Paulo Araújo. Dr. UFRRJ

---

Sílvia Regina Goi. Ph.D. UFRRJ

## DEDICATÓRIA

*À memória de Leila Terra Fernandes*

## AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, ao CPGA-CS e à Embrapa Agrobiologia pela oportunidade de desenvolver o trabalho;

Aos orientadores Gustavo Ribeiro Xavier, Paulo Jansen de Oliveira e Norma Gouvêa Rumjanek pela orientação e pela oportunidade de desenvolver um novo trabalho no decorrer do doutorado;

A CAPES pela bolsa de doutorado;

Ao professor Carlos Eduardo Menezes por gentilmente ter auxiliado na coleta dos solos em Pinheiral;

Ao bolsista de iniciação científica João Pedro e à funcionária Júlia do Laboratório de Ciência e Tecnologia de Polímeros pelo auxílio nas análises reométricas;

Aos alunos Samuel e Carolina Domingues pelo auxílio nas análises de ARDRA;

A doutoranda Andréa e ao assistente de laboratório João Luiz por auxiliar em todos os experimentos de casa de vegetação;

A toda equipe do Laboratório de Ecologia Microbiana pelo agradável clima de trabalho, em especial aos amigos João Luís, Andréa e Samuel.

A pesquisadora doutoranda Rosa Motta por sua calma e paciência na organização da coleta do primeiro experimento;

Aos funcionários do setor de Casa de Vegetação da Embrapa Agrobiologia pelo auxílio na condução dos experimentos;

A secretária do LEMI Rosana Muzi e aos funcionários e estagiários da secretaria do CPGA-CS, pela paciência, calma e prestatividade para a realização de todos os favores possíveis.

A todas as pessoas que passaram ou estão na minha vida torcendo para que tudo dê certo;

A todos que colaboraram para a execução dos trabalhos;

À sociedade brasileira por ter financiado esse estudo.

## **BIOGRAFIA**

Paulo Ivan Fernandes Júnior filho de Leila Terra Fernandes e Paulo Ivan Fernandes nasceu em Além Paraíba, Minas Gerais em 06 de março de 1981. Mudou para Mogi das Cruzes (SP) em 1982, onde morou por 10 anos, até retornar para Além Paraíba, onde concluiu o ensino fundamental em 1995 e o ensino médio em 1998. Ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro no primeiro semestre de 1999 no curso de graduação em Ciências Biológicas. Durante a graduação exerceu atividades de pesquisa como bolsista de iniciação científica no Laboratório de Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia. Concluiu a licenciatura em Ciências Biológicas em março de 2003 e o bacharelado em Ecologia em outubro do mesmo ano. Ingressou no Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo em 2004, concluindo o mestrado em 2006. Ingressou no doutorado no CPGA-CS no mesmo ano, desenvolvendo sua tese junto ao laboratório de Ecologia Microbiana da Embrapa Agrobiologia e ao Laboratório de Tecnologia de Polímeros no Instituto de Tecnologia da UFRRJ.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPÍTULO I-ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE BACTÉRIAS DE NÓDULOS DE TRÊS GENÓTIPOS DE GUANDU.....	3
RESUMO .....	4
ABSTRACT .....	5
1.1-INTRODUÇÃO.....	6
1.2-REVISÃO DE LITERATURA. ....	7
1.2.1-Fixação Biológica de Nitrogênio .....	7
1.2.2-Diversidade de Bactérias Formadoras de Nódulos em Leguminosas .....	8
1.2.2.1-Diversidade de rizóbios em área de Mata Atlântica.....	13
1.2.2.2-Importância do estudo de diversidade de rizóbios .....	13
1.2.2.3-Estudo da diversidade fenotípica de rizóbios. ....	15
1.2.3-Adubação Verde.....	17
1.2.4-Produção de Inoculantes .....	19
1.2.4.1-Determinações do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) .....	19
1.2.4.2-Mercado brasileiro de inoculantes .....	20
1.2.5 Cultura do Guandu.....	22
1.3-MATERIAL E MÉTODOS .....	24
1.3.1-Amostragem e Descrição das Áreas.....	24
1.3.2-Características dos Genótipos de Guandu Utilizados .....	24
1.3.3-Montagem, Condução e Coleta do Experimento para Obtenção dos Isolados Bacterianos.....	27
1.3.4-Análise de Dados Experimento .....	27
1.3.5-Isolamento, Purificação e Caracterização Cultural dos Isolados Bacterianos .....	27
1.3.6-Agrupamento Morfológico dos Isolados e Cálculo dos Índices Ecológicos .....	28
1.3.7-Avaliação da Capacidade de Isolados Bacterianos em Crescer em Meio de Cultura YMA Suplementados com Diferentes Fontes de Carbono, Concentrações de NaCl; Elevadas Temperaturas e com Concentrações Distintas de Antibióticos .....	29
1.3.7.1-Fontes de carbono .....	29
1.3.7.2-Concentrações de NaCl.....	29
1.3.7.3-Incubação em diferentes temperaturas. ....	29
1.3.7.4- Resistência intrínseca a antibióticos.....	29
1.3.7.5-Avaliação dos resultados .....	30
1.3.9-Experimentos em Condições de Casa de Vegetação .....	31
1.4-RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	33
1.4.1-Nodulação de Guandu Cultivados em Vasos com Amostras dos Horizontes Superficiais dos Diferentes Solos .....	33
1.4.3-Characterização Cultural dos Isolados Bacterianos .....	37
1.4.4-Avaliação da Capacidade de Isolados de Rizóbio de Guandu em Metabolizar Diferentes Fontes de Carbono .....	60
1.4.5-Avaliação da Capacidade de Isolados de Rizóbio de Guandu em Crescer em Meios de Cultura Suplementados com Diferentes Concentrações de NaCl.....	66
1.4.6-Avaliação da Capacidade de Bactérias Isoladas de Nódulos de Guandu em Crescer em Meios de Cultura Incubados em Diferentes Temperaturas.....	72



1.4.7–Avaliação da Resistência Intrínseca a Antibióticos por Bactérias Isoladas de Nódulos de Guandu.....	76
1.4.8–Variabilidade Genética de Isolados Nodulantes Seleccionados Através da Técnica de ARDRA.....	80
1.4.9–Avaliação do Estabelecimento da Simbiose entre Isolados Seleccionados nos Testes de Nodulação e o Guandu. ....	84
1.5–CONCLUSÕES .....	86

CAPÍTULO II-PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS, POLIHIDROXIBUTIRATO E AMILASES POR BACTÉRIAS ISOLADAS DE NÓDULOS DE GUANDU .....	87
RESUMO.....	88
ABSTRACT .....	89
2.1-INTRODUÇÃO.....	90
2.2-REVISÃO DE LITERATURA .....	91
2.2.1–Exopolissacarídeos.....	91
2.2.2–Principais Exopolissacarídeos Bacterianos e suas Aplicações .....	91
2.2.3–Exopolissacarídeos Produzidos por Rizóbios e Outras Bactérias .....	92
2.2.4–Papel Ecológico dos Exopolissacarídeos em Rizóbios .....	93
2.2.5–Estrutura dos Exopolissacarídeos Rizobianos.....	94
2.2.6–Avaliação da Produção de EPS Bacterianos .....	95
2.2.7–Polihidroxialcanoatos.....	96
2.2.7.1–Composição química e estrutura dos polihidroxialcanoatos .....	96
2.2.7.2–Produção de PHAs na indústria .....	97
2.2.7.3–Produção de PHB por diferentes microrganismos .....	98
2.2.8–Produção de PHB por Rizóbios e Outras Bactérias Formadoras de Nódulos.....	99
2.3–MATERIAL E MÉTODOS .....	102
2.3.1–Avaliação do Crescimento de Estirpes de Rizóbio em Dois Meios de Cultura.....	102
2.3.2–Isolamento e Quantificação dos Exopolissacarídeos Produzidos por Estirpes de Rizóbio .....	103
2.3.3–Avaliação da Produção de EPS por Rizóbios de Crescimento Rápido e Intermediário .....	103
2.3.4–Quantificação do PHB Produzido por Isolados Bacterianos Oriundos de Nódulos de Guandu Através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	103
2.3.4.1–Otimização do método.....	103
2.3.4.2–Isolados bacterianos e condições de crescimento .....	104
2.3.4.3–Preparo das amostras .....	104
2.3.4.4–Injeção e condições utilizadas na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) .....	104
2.3.4.5–Análises estatísticas e interpretação dos dados. ....	105
2.3.5–Ensaio Reométrico dos Exopolissacarídeos Produzidos por Isolados Bacterianos Oriundos de Nódulos de Guandu.....	105
2.3.6–Avaliação da Produção de Enzimas Amilolíticas por Bactérias Isoladas de Raízes de Guandu.....	105
2.4-RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	106
2.4.1–Avaliação do Crescimento e da Produção de PHB por Estirpes de Rizóbio em Meio YM e Meio RDM. ....	106
2.4.2–Avaliação da Produção de EPS por Rizóbios de Crescimento Rápido e Intermediário em, Meio YM. ....	106
2.4.3–Avaliação da Produção de PHB por Isolados de Rizóbio de Guandu Através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	108

2.4.3–Avaliação da Reologia de Soluções de Exopolissacarídeos Produzidos por Isolados Bacterianos Oriundos de Nódulos de Guandu .....	120
2.4.6–Avaliação da Atividade Amilolítica por Estirpes de Rizóbio. ....	124
2.5-CONCLUSÕES .....	128
3-CONCLUSÕES GERAIS .....	129
4-CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	130
5-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	131
ANEXO .....	155

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mercado de inoculantes e área plantada de soja no Brasil e na Argentina (adaptado de HUNGRIA, 2006).....	21
<b>Figura 2.</b> Produção mundial de guandu ( <i>Cajanus cajan</i> (L.) Mill.) segundo a FAO (FAOSTAT, 2007). Extraído e adaptado de Odeny (2007). .....	22
<b>Figura 3.</b> Placa de Petri com duas camadas de meio de cultura para a formação do gradiente de concentração de antibiótico, através da difusão de antibiótico entre as duas camadas de meio YMA (BROMFIELD et al. 1982, modificado por XAVIER et al., 1998) (A) e divisão da placa de Petri nas três seções onde foram atribuídos escores de acordo com a capacidade dos isolados em crescer nas regiões com diferentes concentrações de antibióticos, sendo atribuído escore 1 para os isolados que cresceram apenas na primeira seção (menor concentração de antibiótico), 2 para os isolados que cresceram nas seções 1 e 2 (concentração mediana de antibiótico) e 3 para os isolados que foram capazes de crescer nas três seções da placa (maior concentração de antibiótico) (B). .....	30
<b>Figura 4.</b> Percentual dos isolados nodulantes e não nodulantes em guandu. ....	36
<b>Figura 5.</b> Agrupamento dos isolados de acordo com o tempo de crescimento (A) e a alteração do pH do meio (B). Crescimento rápido: até 3 dias; crescimento intermediário: de 4 a 5 dias; crescimento lento; acima de 6 dias. ....	38
<b>Figura 6.</b> Distribuição dos isolados de bactérias de nódulos de guandu cultivado em solos sob diferentes manejos no Estado do Rio de Janeiro, em função da alteração do pH do meio de cultura YMA (A) e do tempo de crescimento (B). LA= Latossolo Amarelo; PV= Argissolo Vermelho; PAC= Argissolo Acinzentado; RU= Neossolo Flúvico; PVA= Argissolo Vermelho-Amarelo; HX= Planossolo Háplico.*CE= Campo Experimental....	39
<b>Figura 7.</b> Distribuição dos isolados de bactérias de nódulos de três cultivares de guandu em função do tempo de crescimento YMA (A) e da alteração do pH do meio de cultura (B). .....	40
<b>Figura 8.</b> Dendrograma de similaridade entre bactérias isoladas de nódulos de três cultivares de guandu de com reação de pH alcalina ou neutra. Dendrograma gerado a partir da matriz de similaridade utilizando o coeficiente de Jaccard. Agrupamento realizado utilizando o algoritmo UPGMA, programa NTSyS. ....	43
<b>Figura 9.</b> Dendrograma de similaridade entre bactérias com reação ácida oriundos de nódulos oriundos de raízes de três cultivares de guandu. Dendrograma gerado a partir da matriz de similaridade utilizando o coeficiente de Jaccard. Agrupamento realizado utilizando o algoritmo UPGMA, programa NTSyS. ....	44
<b>Figura 10.</b> Isolados 12.1b (A) e 8.1c (B) cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura YMA. ....	54
<b>Figura 11.</b> Agrupamento de bactérias isoladas de nódulos de guandu em função do cultivar de origem. ....	58
<b>Figura 12.</b> Dendrograma de similaridade em função do metabolismo de diferentes fontes de carbono por 160 isolados bacterianos oriundos de nódulos de guandu, utilizando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard. ....	63
<b>Figura 13.</b> Efeito da concentração de NaCl no crescimento de isolados de bactérias de nódulos de guandu meio de cultura YMA suplementado com 0; 0,5; 1; 2 e 3% (p/v) deste sal. ....	66
<b>Figura 14.</b> Dendrograma de similaridade em função do crescimento em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de NaCl por 160 isolados bacterianos oriundos de nódulos de guandu. (algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard). ....	68
<b>Figura 15.</b> Análises de regressão linear simples entre diferentes concentrações de NaCl em	

meio de cultura YMA e o percentual de tolerância de isolados de bactérias de nódulos de guandu em função do solos de origem. Todos os coeficientes das equações de regressão foram significativos ao nível de 5% de significância. ....	70
<b>Figura 16.</b> Efeito da temperatura de incubação no crescimento de isolados de bactérias isoladas de nódulos de guandu meio de cultura YMA. ....	73
<b>Figura 17.</b> Dendrograma de similaridade em função do crescimento em meio de cultura YMA de 160 isolados de bactérias de nódulos de guandu incubados em diferentes temperaturas (algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard). ....	75
<b>Figura 18.</b> Dendrograma de similaridade em função da resistência intrínseca a antibióticos por 160 isolados bacterianos oriundos de nódulos de guandu, utilizando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard. ....	77
<b>Figura 19.</b> Análise de redundância (RDA) relacionando a resistência intrínseca a antibióticos e os parâmetros da fertilidade do solo. ....	79
<b>Figura 20.</b> Resultado da reação em cadeia da polimerase (PCR) com os iniciadores 27F e 1492R (SUZUKI e GIOVANNONI, 1996) para as bactérias isoladas de nódulos de guandu. Correspondência das linhas: 1- marcador de peso molecular ? 174; 2=24.4a; 3=18.5a2; 4=30.3a1.; 5=18.6; 6=54.3; 7=56.4b; 8=29.5b; 9=14.4; 10=29.5c; 11=42.4; 12=46.4; 13=8.1c; 14=24.4b; 15= 21.5; 16=16.2; 17=16.6; 18= amostra de rizóbio de mucuna (não analisada); 19= marcador de peso molecular ? 174. ....	81
<b>Figura 21.</b> Extração de DNA de bactérias nodulantes isoladas de nódulos de guandu. Correspondência das linhas: 1- marcador de peso molecular ? 174; 2=24.4a; 3=18.5a2; 4=30.3a1.; 5=18.6; 6=54.3; 7=56.4b; 8=29.5b; 9=14.4; 10=29.5c; 11=42.4; 12=46.4; 13=8.1c; 14=24.4b; 15= 21.5; 16=16.2; 17=16.6; 18= amostra de rizóbio de mucuna (não analisada); 19= marcador de peso molecular ? 174. ....	81
<b>Figura 22.</b> Dendrograma de similaridade entre 13 bactérias capazes de induzir a formação de nódulos em guandu e estirpes de rizóbio através da técnica de ARDRA utilizando as enzimas de restrição <i>Hinf</i> I, <i>Msp</i> I e <i>Dde</i> I. ....	83
<b>Figura 23.</b> Monômeros dos exopolissacarídeos de <i>Sinorhizobium meliloti</i> . A: EPS I; B: EPS II e de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> (C). (glc-glicose; gal-galactose, Succ-succinato; Ac- acetil) Figura retirada de SKORUPSKA et al. (2006). ....	94
<b>Figura 24.</b> Monômero dos EPS de <i>Sinorhizobium fredii</i> (glc-glicose; gal-galactose). Figura retirada de WEI et al. (1996). ....	95
<b>Figura 25.</b> Fórmula química geral dos polihidroxicanoatos (Silva et al., 2007b). ....	97
<b>Figura 26.</b> Óperon <i>phbCAB</i> e via de síntese e de PHB em <i>Ralstonia eutropha</i> ....	99
<b>Figura 27.</b> Cromatograma de uma amostra de 5 mg de PHB digerido em 1 mL de ácido sulfúrico concentrado a 95°C por 60 minutos. Coluna Aminex HPX87H (Biorad); Fase móvel, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,004 M, fluxo 0,5 mL por minuto (isocrático), volume de injeção, 50 µL. ....	108
<b>Figura 28.</b> Cromatograma da produção de PHB pelos isolados 71.3b, 8.1c e 24.6b Digestão do precipitado em 1 mL de ácido sulfúrico concentrado a 95°C por 60 minutos. Coluna Aminex HPX87H (Biorad); Fase móvel, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,004 M, fluxo 0,5 mL.min <sup>-1</sup> (isocrático), volume de injeção de 50 µL. ....	109
<b>Figura 29.</b> Exemplo de uma curva padrão comparando através da análise de regressão a concentração de PHB digerido e a área do pico que eluiu em 36 minutos nos cromatogramas. ....	110
<b>Figura 30.</b> Esquema comparativo dos cromatogramas de digestão de PHB ingestão no sistema UV-CLAE com detecção em 210 nm obtidos por Karr et al. (1983) (linha preta) e pelo presente estudo (linha cinza). ....	112
<b>Figura 31.</b> Agrupamento dos isolados em função da produção de EPS em meio de cultura YEM. ....	115

<b>Figura 32.</b> Variação da viscosidade em função da taxa de cisalhamento de soluções de EPS produzido pelos isolados 30.6a2 (A), 53.5 (B) e 8.1c (C) nas concentrações 5 (inferior) e 10 (superior) mg.L <sup>-1</sup> .....	121
<b>Figura 33.</b> Modelo da reorganização das moléculas poliméricas com o aumento da taxa de cisalhamento em função da tensão de cisalhamento imprimida sobre o fluido polimérico, conforme proposto por Charm (1962). .....	122
<b>Figura 34.</b> Comparação da variação da viscosidade em função da taxa de cisalhamento de solução de EPS produzido pelos isolados 8.1c, 30.6a2 e 53.5 na concentração 10 mg.L <sup>-1</sup> .....	123
<b>Figura 35.</b> Atividade amilolítica do isolado 47.3b avaliada através do método de coloração com tintura de iodo em placa de Petri (diâmetro da placa: 9 cm). .....	126

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Estimativas da fixação de nitrogênio por diferentes processos e em diferentes ambientes (FERNANDES JÚNIOR e REIS, 2008 a partir de dados compilados de diversos autores).....	7
<b>Tabela 2.</b> Comparação entre a fixação biológica e industrial de nitrogênio (adaptado de PAULL, 2009).....	8
<b>Tabela 3.</b> Algumas características dos seis gêneros de rizóbio “clássicos”.....	10
<b>Tabela 4.</b> Listagem dos gêneros de bactérias formadoras de nódulos em leguminosas recentemente descritas pertencentes às subordens $\alpha$ e $\beta$ -proteobacteria .....	12
<b>Tabela 5.</b> Localização e caracterização das áreas onde foram coletadas as amostras de solo para a montagem do experimento.....	26
<b>Tabela 6.</b> Características químicas de amostras do horizonte superficial de oito solos utilizados neste estudo .....	27
<b>Tabela 7.</b> Quadro da análise de variância para o parâmetro número de nódulos .....	33
<b>Tabela 8.</b> Número de nódulos das cultivares de guandu Aratã, Fava-Larga e Carioca, cultivadas em vasos contendo amostras de terra do horizonte superficial de oito solos diferentes. ....	35
<b>Tabela 9.</b> Correlação linear simples ( $r$ ) entre o número de nódulos e os parâmetros da fertilidade do solo .....	36
<b>Tabela 10.</b> Características culturais dos 43 grupos obtidos a partir do agrupamento gerado nos dendrogramas. ....	46
<b>Tabela 11.</b> Distribuição dos diferentes isolados de bactérias de nódulos de guandu nos grupos e em funções dos solos de origem. ....	56
<b>Tabela 12.</b> Distribuição dos grupos morfológicos em funções dos cultivares origem. ....	57
<b>Tabela 13.</b> Índice de diversidade de Shannon-Weaver, de abundância de Simpson e de riqueza de Margalef baseado na diversidade cultural de bactérias isoladas de nódulos de três cultivares de guandu cultivados em oito solos diferentes.....	59
<b>Tabela 14.</b> Índice de diversidade de Shannon-Weaver, de abundância de Simpson e de riqueza de Margalef baseado na diversidade cultural de isolados de rizóbio de guandu de três cultivares de guandu. ....	60
<b>Tabela 15.</b> Distribuição de isolados de nódulos de guandu e grupos de acordo com a fonte de carbono metabolizada em meio de cultura YMA modificado.....	61
<b>Tabela 16.</b> Percentual dos isolados capazes de metabolizar as oito fontes de carbono .....	61
<b>Tabela 17.</b> Caracterização dos grupos gerados através do agrupamento das bactérias em função da capacidade de metabolizar diferentes fontes de carbono. ....	64
<b>Tabela 18.</b> Percentual de isolados capazes de crescer em meio de cultura suplementados com diferentes fontes de carbono, de acordo com o solo de origem. ....	64
<b>Tabela 19.</b> Percentual de isolados capazes de crescer em meio de cultura suplementada com diferentes fontes de carbono, de acordo com a cultivar de origem. ....	65
<b>Tabela 20.</b> Capacidade de bactérias isoladas de nódulos de guandu em crescer em meios de cultura com diferentes concentrações de NaCl. ....	66
<b>Tabela 21.</b> Proporção de isolados capazes de crescer em meio de cultura suplementados com diferentes 0,5; 1; 2 e 3 % de NaCl (p/v), de acordo com o solo de origem.....	69
<b>Tabela 22.</b> Percentual de isolados capazes de crescer em meio de cultura suplementados com 0,5; 1; 2 e 3 % de NaCl (p/v), de acordo com a cultivar de origem. ....	71
<b>Tabela 23.</b> Percentual de crescimento de isolados de rizóbio em meio de cultura YMA incubados a 28, 32, 37 e 42° C. ....	73
<b>Tabela 24:</b> Descrição dos grupos formados através do agrupamento no dendrograma a partir	

dos resultados de resistência intrínseca a antibióticos de bactérias isoladas de nódulos de guandu .....	78
<b>Tabela 25.</b> Comparação entre algumas propriedades do polihidroxibutirato e do polipropileno (Adaptado de MADISON e HUISMAN, 1999). .....	97
<b>Tabela 26.</b> Composição do meio de cultura RDM (BISHOP et al., 1976). .....	102
<b>Tabela 27.</b> Estirpes rizobianas utilizadas para a avaliação da capacidade produzir exopolissacarídeos .....	103
<b>Tabela 28.</b> Concentração de células em meio de cultura líquido na primeira contagem* e na segunda contagem** para estirpes de rizóbio cultivadas em meio de cultura YM e RDM. ....	106
<b>Tabela 29.</b> Produção biomassa bacteriana, e de EPS por 14 estirpes de rizóbio crescidas em meio YEM líquido .....	107
<b>Tabela 30.</b> Comparação das condições utilizadas nas corridas das amostras injetadas no UV-CLAE no trabalho dos autores da técnica para a detecção do produto de digestão do PHB, (KARR et al., 1983) e no presente estudo. ....	112
<b>Tabela 31.</b> Produção e produtividade de PHB por isolados de rizóbio crescidos em meio de cultura YM utilizando manitol como fonte de carbono. Valores são médias de três repetições. ....	114
<b>Tabela 32.</b> Produção de PHB e EPS e biomassa seca e produtividade de EPS e PHB pelos isolados 8.1c; 24.6a e 24.6b cultivadas em meio YEM contendo diferentes fontes de carbono. ....	118
<b>Tabela 33.</b> Atividade amilolítica por bactérias isoladas de nódulos de guandu avaliada através da técnica de coloração com tintura de iodo. ....	125

## RESUMO GERAL

FERNANDES JÚNIOR, Paulo Ivan. **Caracterização fenotípica e produção de biopolímeros por bactérias isoladas de nódulos de guandu [(*Cajanus cajan* (L.) Millsp.)]**. 2009, 166f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

A fixação biológica do nitrogênio é um processo natural realizado por procariotos denominados diazotróficos. Dentre os diversos microrganismos capazes de fixar o nitrogênio, destacam-se aqueles capazes de estabelecer associações mutualísticas com leguminosas em estruturas especializadas denominadas nódulos. A busca por microrganismos capazes de estabelecer uma associação eficiente com as plantas desta família tem sido alvo de estudos ao longo das últimas décadas. Nos últimos anos, além da prospecção por microrganismos capazes de estabelecer associações eficientes, os rizóbios têm sido alvo de outros interesses biotecnológicos como a produção de moléculas de interesse industrial, como enzimas e biopolímeros. Estas macromoléculas são empregadas em diversos ramos da indústria e a busca por novos microrganismos capazes de produzir essas moléculas constitui uma fonte de inovação constante nestes setores. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade fenotípica de bactérias isoladas de nódulos de três cultivares de guandu, bem como avaliar a capacidade desses isolados em produzir exopolissacarídeos, polihidroxibutirato e amilases. Foram coletadas amostras de oito solos, 4 em Seropédica (duas amostras em áreas com Argissolo Vermelho Amarelo e duas áreas com Planossolo Háplico) e 4 em Pinheiral (Latosolo Amarelo; Argissolo Vermelho; Argissolo Acinzentado e Neossolo Flúvico) para implantação do experimento de para a obtenção das bactérias. O experimento foi montado no esquema fatorial 3 (cultivares) x 8 (solos). As plantas foram colhidas aos 75 dias após a emergência e a nodulação foi avaliada. Os nódulos foram desinfestados superficialmente e pressionados em placas de Petri contendo meio de cultura YMA com Vermelho Congo. Após purificação dos isolados foi realizada a caracterização cultural e foi avaliada a capacidade de crescimento em meio com diferentes fontes de carbono, concentrações de antibióticos ou de sais e diferentes temperaturas. Os isolados foram validados em condições estéreis de casa de vegetação e foi realizado um teste para avaliar a capacidade de estabelecimento da simbiose. Paralelamente foram selecionados isolados para avaliar a capacidade de produção de polihidroxibutirato (PHB), exopolissacarídeos (EPS), e amilase. A reologia de EPS selecionados também foi avaliada. Os isolados apresentaram um padrão muito diverso de capacidade de metabolizar diferentes fontes de carbono e de apresentar resistência intrínseca a antibióticos. A maioria dos isolados testados foram capazes de crescer quando incubados a temperaturas de 42°C. Grande parte dos isolados apresentou resistência à salinidade (3% de NaCl). Já 34% dos isolados não foram capazes de nodular a planta hospedeira e dos isolados avaliados para o estabelecimento da simbiose, todos apresentaram nodulação estatisticamente igual àquela apresentada pelas estirpes recomendadas. Os isolados variaram quanto à capacidade de produzir EPS e PHB, havendo grande influência da fonte de carbono utilizada. A reologia dos EPS demonstrou comportamento pseudoplástico das soluções de EPS selecionados. Com relação à produção de amilases, os um isolado se destacou bastante dos demais, onde a halo de degradação do amido atingiu mais de 2,7 vezes o tamanho da colônia. Estes resultados demonstram o potencial biotecnológico dessas bactérias, tanto para a produção de inoculantes como para a produção de biopolímeros.

**Palavras chave:** Fixação biológica de nitrogênio. Polihidroxibutirato. Exopolissacarídeos. Inoculante. Diversidade. Inovação tecnológica.



## GENERAL ABSTRACT

FERNANDES JÚNIOR, Paulo Ivan. **Phenotypic characterization and biopolymers production by bacteria isolated from pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] root nodules**. Seropédica: UFRRJ, 2008. 166p. Thesis (Doctor Science in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

The biological nitrogen fixation (BNF) is a natural process carried out by prokaryotes collectively called diazotrophs. Among the diverse microorganisms able to fix the atmospheric nitrogen, stand out those capable of set up mutualistic associations with legume plants in specialized structures called nodules. Thus the search for microorganisms able to establish efficient associations with plants of legume family had been the target of studies for the last decades. In recent years, further the prospecting for microorganisms able to establish efficient associations, the rhizobia have been the target of other biotechnology interests, such as the production of molecules of industrial interest, such as enzymes and biopolymers. These macromolecules are used in various branches of industry and the constant search for microorganisms able to produce new molecules is a source of innovation in these sectors. In this context, the aim of this study was to evaluate the phenotypic diversity of bacterial isolates from root nodules of three pigeonpea genotypes, as well as to evaluate the capacity of these bacterial isolates to produce exopolysaccharides, polyhydroxybutyrate and amylases. Eight soils were sampled four in Seropédica municipality (two samples were from Dystric Udult soils), and two from a Haplic Fragiudult soil), four in Pinheiral municipality (Xanthic Udox soil, Aquil soil, Rhodic Udult, and a Fluvaquent), all in Rio de Janeiro State, to set up a experiment to obtain the bacterial isolates. The experiment was set up at a factorial design of 3 (genotypes) x 8 (soils). The plants were harvest at 75 days after the emergence and the nodulation was evaluated. Five nodules for each plant were superficially disinfected and crushed in Petri dishes with YMA media containing Congo Red stain. After the purification of the bacterial isolates it was proceeded the cultural characterization, and evaluated the capacity of the bacterial strains to grow in culture media containing eight different carbon sources, antibiotics or salts and different temperatures. The isolates were authenticated in greenhouse sterile conditions and an experiment was carried out to evaluate the capacity of selected isolates to establish the symbiosis. The isolates presented a very diverse pattern to present intrinsic resistance to antibiotics and to grow eighth different carbon sources. It was also evaluated the capacity of the isolates to produce polyhydroxybutyrate, exopolysaccharides and amylase. The reology of selected EPS were also evaluated. The majority of isolates tested were able to present growth when incubated at 42°C. Part of the isolates was able to grow in culture media with 3% of NaCl. Though 34% of the isolates were not able to nodulate the host plant, and from the isolates evaluated to establish the symbiosis all presented the same nodulation compared with the recommended strains. The isolates varied a lot regarding the production of PHB and EPS, showing strong influence of the carbon source used. The EPS rheology showed pseudoplastic behavior. Regarding the amylase production, one isolate had reached a degradation halo 2.7 times the colony size. These results show the biotechnological potential of these isolates, both for inoculants production and biopolymer production.

**Keywords:** Biological nitrogen fixation. Polyhydroxybutyrate. Exopolisaccharides. Amylase. Diversity. Technological innovation. Inoculant.

## 1-INTRODUÇÃO GERAL

Os microrganismos apresentam-se com diferentes papéis ecológicos nos ecossistemas. A busca por estratégias para maximizar a ação destes microrganismos em processos como a fixação biológica do nitrogênio (FBN) é de fundamental importância para a sustentabilidade ambiental e produção agrícola menos impactante. A FBN é um processo realizado por diversas bactérias que podem ser de vida livre (*Nostoc* spp., dentre outras), associativas (*Azospirillum* spp., dentre outras) e mutualísticas (*Rhizobium* spp., dentre outras). Essas bactérias estão ubiquamente distribuídas em diversos ecossistemas do planeta, contribuindo para a incorporação do nitrogênio nesses sistemas. Portanto, o manejo de sistemas naturais ou agroecossistemas é profundamente influenciado pela gestão do nitrogênio, uma vez que grande parte do nitrogênio disponibilizado para os vegetais é fixado pelas bactérias diazotróficas.

As bactérias que se associam mutualisticamente com plantas da família leguminosa e pertencem a seis gêneros sendo são chamados coletivamente de rizóbio (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Essa associação é bastante complexa e seu estabelecimento depende de fatores genéticos da bactéria e da planta, além de diversos fatores ambientais. Embora algumas bactérias sejam bastante específicas, sendo capazes de infectar um pequeno número de espécies de leguminosas, outras são muito promíscuas, sendo capazes de nodular um grande número de espécies de leguminosas. A especificidade e promiscuidade exemplificam a complexidade ecológica da associação rizóbio-leguminosa. Para se explorar essa associação na agricultura, é de fundamental importância a seleção de estirpes de rizóbios eficientes com capacidade de fixação do nitrogênio atmosférico e infectividade das plantas hospedeiras, aliada a competência saprofítica.

Além da avaliação da diversidade rizobiana para fins de seleção de bactérias para a recomendação para inoculantes, outras aplicações biotecnológicas podem ser oriundas dos estudos aplicados da diversidade rizobiana. Devido à versatilidade metabólica das bactérias do solo, muitas destas podem ser utilizadas como produtores de compostos para a indústria química. Rizóbios são produtores de uma gama de amilases, capazes de degradar amidos de diferentes origens como fécula batata e tapioca, amido de milho dentre outros (OLIVEIRA et al., 2007a), além dessas enzimas, rizóbios apresentam capacidade de produzir enzimas lipolíticas e proteolíticas (OLIVEIRA et al., 2006). As estirpes mais promissoras destes e de outros estudos podem servir de matéria prima para a aplicação industrial. Além de enzimas, estirpes de rizóbio são eficientes produtores de exopolissacarídeos (DUTA et al., 2005; CASTELLANE e LEMOS, 2007), que podem ser aplicados na indústria de alimentos e farmacêutica, e de polihidroxialcanoatos (TRAINER e CHARLES, 2006), polissacarídeos que tem aplicação na produção de plásticos biodegradáveis.

Aproximadamente 20% do lixo produzido nas grandes cidade é composto por plásticos em produtos descartáveis (COMLURB, 2009). A maioria do plástico utilizado para esse fim é oriunda de combustíveis fósseis, principalmente o polipropileno (PP) e o poli(tereftalato de etileno) (PET). A utilização de plásticos biodegradáveis, de fácil decomposição e sintetizados através de processos biológicos colabora pode colaborar com a diminuição do impacto ambiental da produção de lixo nos grandes centros urbanos. Diversos estudos têm focado a utilização de materiais alternativos aos derivados de petróleo na indústria de plásticos, dentre esses materiais podem ser destacados polímeros bacterianos, como o polihidroxibutirato e alguns exopolissacarídeos. A avaliação da capacidade de microrganismos em produzir estes polímeros, vai ao encontro de práticas que não tenham elevado impacto ambiental, que diminuam o acúmulo de resíduos e que não degradem o meio ambiente.

O objetivo geral desse trabalho foi montar uma coleção de bactérias isoladas de nódulos de guandu, cultivado em vasos contendo amostras terra coletadas em solos sob diferentes manejos, bem como proceder à caracterização destas bactérias no que diz respeito às características culturais e na produção de biopolímeros como uma prospecção de novas aplicações biotecnológicas deste material biológico.

Para melhor interpretação dos resultados e compreensão por parte do leitor, os resultados da tese estão apresentados em 2 capítulos. O primeiro capítulo desta tese intitulado “Isolamento e caracterização morfológica de bactérias de nódulos três genótipos de guandu em diferentes solos do Rio de Janeiro” teve por objetivo estudar a diversidade de bactérias isoladas de nódulos de três cultivares de guandu [*Cajanus cajan* Millsp. (L.)] cultivado em vasos com amostras de terra de solos distintos do município de Seropédica e do município de Pinheiral, ambos no Estado do Rio de Janeiro. A diversidade dessas bactérias foi avaliada através da caracterização morfológica dos isolados em placas de Petri, além da avaliação da capacidade desses isolados em crescer em elevadas temperaturas, em meios de cultura suplementados com diferentes concentrações de NaCl, e diferentes fontes de carbono, assim como em meios com diferentes concentrações de quatro antibióticos. Além da diversidade, esses isolados foram validados em condições de casa de vegetação e um teste preliminar de eficiência, eficácia e efetividade simbiótica foi realizado.

A avaliação da capacidade de isolados em produzir diferentes biopolímeros e um complexo enzimático, foi o objetivo do estudo realizado no segundo capítulo desta tese, intitulado “Produção de exopolissacarídeos, polihidroxibutirato e amilases por bactérias isoladas de nódulos de guandu. Neste capítulo foi avaliada a capacidade de isolados bacterianos em produzir PHB, EPS e amilases, em condições normais de cultivo em laboratório, dispensando a utilização de métodos dispendiosos e equipamentos elaborados, visando a busca de uma alternativa para o setor produtor de inoculantes no Brasil.

## **CAPÍTULO I**

### **ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE BACTÉRIAS DE NÓDULOS DE TRÊS GENÓTIPOS DE GUANDU**

## RESUMO

Os inoculantes para plantas usadas como adubos verdes são produzidos com bactérias isoladas de diversas plantas a muitos anos, havendo, portanto baixa especificidade entre os simbioses. Dessa forma seleção de bactérias para estas culturas tende a aumentar a eficiência da simbiose entre os pares contribuindo para a adoção da prática da inoculação pelos produtores. O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade de bactérias isoladas de nódulos de guandu [*Cajanus cajan* (L.) Mills.] bem como a capacidade de nodular e de estabelecer a simbiose destes isolados. Foi montado um experimento com amostras de terra de oito solos, sendo quatro solos coletados em pastagens não manejadas no município de Pinheiral-RJ e duas áreas com cultivo orgânico e duas áreas com cultivo convencional no município de Seropédica-RJ. Foram utilizados três cultivares de guandu em um experimento com o delineamento de blocos ao acaso com três repetições. As plantas foram coletadas aos 75 dias após a emergência e cinco nódulos de cada planta foram pressionados contra o meio isolamento em placa de Petri com meio de cultura YMA com vermelho congo. Para a purificação e isolamento e caracterização morfológica, os isolados foram riscados sucessivas vezes em placas de Petri contendo o meio YMA até a obtenção de colônias puras. Foram obtidos 306 isolados que foram agrupados em 43 grupos. A maioria dos isolados apresentou crescimento rápido (71%) e capacidade de acidificar o meio de cultura (59%). A diversidade rizobiana em todos os solos foi elevada, com destaque para o Argissolo Acinzentado que apresentou elevada diversidade, equitabilidade e riqueza. Foi possível ainda observar certa especificidade de alguns grupos morfológicos e alguns cultivares, sugerindo especificidade entre genótipos do germoplasma vegetal e rizobiano. A avaliação da tolerância intrínseca a antibióticos mostrou um padrão muito diverso, bem como a capacidade de metabolizar fontes de carbono. 25% dos isolados foram capazes de crescer em meios de cultura contendo 3% de NaCl, com destaque para os isolados oriundos do Planossolo Háptico do Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA). 73% dos isolados foram capazes de crescer quando incubado a 42°C. A restrição do 16S rDNA dos isolados selecionados apresentou parte dos isolados agrupando com estirpes do gênero *Rhizobium* e parte agrupando com estirpes do gênero *Bradyrhizobium*, mesmo isolados de crescimento rápido indicando a alta diversidade desses isolados. 66 % dos isolados foram capazes de nodular e todos os isolados avaliados para o estabelecimento da simbiose apresentaram nodulação estatisticamente igual àquela apresentada pelas estirpes recomendadas, demonstrando o potencial destes isolados para estudos de campo.

**Palavras-chave:** Rizóbio. Biodiversidade. Inoculante. Adubação Verde.

## ABSTRACT

Inoculants for green manures are produced with bacteria isolated from diverse plants several years ago, thus there is not specificity between the symbionts. Thus the inoculation selection of bacteria for these crops must increase the symbiosis efficiency between the symbiont partners contributing for the adoption of the inoculation practice by the farmers. The aim of this work was to evaluate the diversity of bacteria isolated from pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] root nodules, as well as the capacity of these bacteria in nodulate and establish the symbiosis with the host plant. It was assembled a experiment with four soil samples collected in non managed pastures at Pinheiral-RJ municipality and two areas with organic farming and two with conventional farming practices at Seropédica-RJ municipality. There were used three pigeonpea genotypes in a completely random block design experiment with three replicates. The plants were collected at 75 days after the emergence and five nodules of each plant were crushed for the isolation in Petri dishes with YMA media containing Congo Red stain for the purification and cultural characterization. There were obtained 306 bacterial isolates grouped in 43 clusters. The majority of isolates presented fast growth (71%) and ability to acidify the culture media (59%) and the bacterial diversity in all soils evaluated were high, pointing out to the Gray Ultisol that presented elevated diversity, equitability and richness. It was observed some specificity between some clusters and genotypes suggesting specificity between the microbial and plant germoplasm. The evaluation of intrinsic antibiotic resistance showed a pattern very diversity, as well as the carbon metabolism features. 25% of isolates were able to growth in media with 3% of NaCl, pointing out the isolates from SIPA Haplic Fragiudult soil. 73% of isolates were able to growth when incubated at 42°C. The 16S rDNA restriction of selected isolates showed part of the isolates grouping with strains of *Rhizobium* genera and other part with *Bradyrhizobium*, including isolates with fast growth. 66% of bacterial isolates were able to nodulate the pigeonpea and the isolates selected to evaluate the symbiosis establishment showed the same nodulation presented by the recommended strains, demonstrating the potential of these isolates to be tested in field studies.

**Keywords :** Rhizobia. Biodiversity. Inoculant. Green manure.

## 1.1-INTRODUÇÃO

Os inoculantes agrícolas podem ser divididos em três principais categorias: os inoculantes rizobianos, os inoculantes com bactérias promotoras de crescimento e os inoculantes com microrganismos entomo-patogênicos. Essas tecnologias são fundamentais para a sustentabilidade dos sistemas agrícolas, uma vez que elas contribuem para reduzir a utilização de insumos, como fertilizantes e pesticidas, reduzindo o impacto ambiental e o custo da atividade agrícola (PHILLIPS, 2004).

A seleção de bactérias capazes de fixar grandes quantidades de nitrogênio é parte de um trabalho de aprimoramento da tecnologia de inoculantes, fornecendo à indústria produtora novos materiais com elevada eficiência agrônômica e adequados à legislação brasileira sobre inoculantes microbianos. Este trabalho pode colaborar para a adoção da tecnologia de inoculação de adubos verdes, ainda pouco difundida entre os produtores no Brasil.

Além disso, a caracterização destes microrganismos deve levar em consideração não apenas o contexto atual, mas também cenários futuros onde pode haver agravamento do aquecimento global e depauperação dos solos por práticas agrícolas inadequadas, por isso a avaliação de resistência dessas bactérias a condições de estresse é fundamental.

O isolamento de bactérias que nodulam plantas utilizadas como adubos verdes, têm dado importantes colaborações para a taxonomia de rizóbios, uma vez que bactérias ainda não descritas tem sido isoladas de nódulos de diversos adubos verdes, como a mucuna (LIMA, 2009), crotalária (SY et al., 2003) e o tremoço (TRUJILLO et al., 2005). A descrição de espécies novas isoladas de nódulos de adubos verdes tende a aumentar ainda mais, uma vez que a taxonomia e a ecologia dessas bactérias são ainda pouco estudadas. Grupos de pesquisa de diversos países como Brasil, Austrália, México e Espanha tem investido muitos recursos para a avaliação da ecologia e taxonomia dessas bactérias. Esses esforços devem em pouco tempo colaborar para o melhor entendimento da ecologia e taxonomia destes procaríotos.

De forma complementar, a avaliação da ecologia e taxonomia de bactérias formadoras de nódulos em adubos verdes representa uma importante estratégia na produção de energia em consórcios com oleaginosas como a mamona e o girassol, (tecnologia que o Brasil figura como principal detentor no mundo), principalmente em um cenário de crise do sistema energético devido ao aumento da demanda e redução da oferta de combustíveis como o petróleo e seus derivados.

A aplicação de leguminosas como adubos verdes é uma prática utilizada por agricultores de todo o mundo há vários anos. Diversas leguminosas podem ser utilizadas nesta aplicação, destacando-se as crotalárias, as mucunas e o guandu. Esta é uma planta de ciclo que apresenta duração de média a longa e diversos genótipos já foram selecionados para os diferentes biomas do Brasil. Uma das vantagens da utilização do guandu como adubo verde é a elevada produção de biomassa e sua mineralização relativamente rápida, colaborando para o aporte de nitrogênio para a cultura consorciada ou em sucessão. Outra utilização do guandu em diferentes regiões do mundo é como forragem, devido às suas características bromatológicas e elevado teor de proteína, além da rusticidade o que permite a sua adaptação a pastagens com solos pouco férteis.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi o isolamento, a caracterização fenotípica, a validação e a avaliação preliminar da eficiência de bactérias isoladas de nódulos de três cultivares de guandu. A hipótese científica consistiu em que a seleção de rizóbios autóctones, eficientes, tolerantes a antibióticos, elevadas temperaturas e salinidade pode representar uma estratégia para otimizar a fixação biológica de nitrogênio em guandu.

## 1.2–REVISÃO DE LITERATURA.

### 1.2.1–Fixação Biológica de Nitrogênio

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um processo desenvolvido por diversas espécies de procariotos dos domínios Bacteria e Archaea, porém os organismos mais estudados para esta característica são as eubactérias, devido à sua aplicabilidade na agricultura. Este processo bioquímico é catalisado pelo complexo enzimático denominado nitrogenase (Equação 1), exclusivo de procariotos denominados diazotróficos (VESSEY et al., 2004; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006) seguindo a estequiometria abaixo:



**Equação 1.** Redução de  $\text{N}_2$  a amônia através da catálise do complexo nitrogenase.

Os organismos diazotróficos são capazes de ocupar diferentes nichos ecológicos e colaborar com a FBN para a entrada do nitrogênio nas cadeias alimentares em diferentes ambientes. A Tabela 1 sumariza a contribuição de diferentes processos para a fixação do nitrogênio através de processos naturais físicos e biológicos, além da atividade antrópica.

**Tabela 1.** Estimativas da fixação de nitrogênio por diferentes processos e em diferentes ambientes (FERNANDES JÚNIOR e REIS, 2008 a partir de dados compilados de diversos autores)

Fonte de fixação	Quantidade fixada (10 <sup>9</sup> kg N/ano)
Industrial (produção de fertilizantes)	65
Atmosférica e outros processos químicos	51
Total dos sistemas terrestres	180
Leguminosas	120
Demais sistemas terrestres	60
Oceanos	139

A fixação do nitrogênio através da ação dos rizóbios em leguminosas é responsável pela maioria do nitrogênio fixado nos ambientes terrestres. Paul e Clark (1989) destacaram ainda que a associação entre rizóbios e leguminosas é a ligação mais importante entre o N atmosférico e o mundo vivo. Outras plantas fixadoras e a ação de bactérias de vida livre são responsáveis por apenas metade do total de  $\text{N}_2$  fixado nas associações rizóbio-leguminosa, demonstrando a importância da FBN na manutenção dos ecossistemas e para as práticas agrícolas menos impactantes. Recentemente, a FBN nos oceanos tem sido considerada como uma importante fonte de FBN para os ecossistemas, colaborando com uma quantidade muito grande de N fixado. Capone et al. (2005) destacam a atuação de bactérias do gênero *Trichodesmium* neste processo.

A fixação industrial, processo pelo qual são fabricados os fertilizantes nitrogenados é responsável por uma quantidade similar à fixação terrestre sem a contribuição das leguminosas (Tabela 1). Vale ressaltar que a produção de fertilizantes nitrogenados depende grande quantidade de energia para quebrar a ligação tripla entre os átomos de N através do processo conhecido como “Haber-Bosch”, desenvolvido por pesquisadores alemães em 1909. O processo “Haber-Bosch” é utilizado até hoje e requer grandes quantidades de energia, para atingir temperaturas de até 450°C e uma pressão superior a 100 atmosferas. Essa energia é suprida utilizando combustíveis fósseis, o que torna a produção destes fertilizantes bastante impactante ao meio ambiente e de alto custo (LIE, 1981), não compatíveis com a necessidade



da redução dos impactos ambientais das atividades antrópicas, dentre elas as atividades agrícolas. Dessa forma, o desenvolvimento de práticas agrícolas que priorizem a utilização de insumos biológicos em detrimento ao uso de fertilizantes e/ou defensivos é de fundamental importância para a sustentabilidade agrícola. Uma comparação entre as características da fixação biológica e industrial do nitrogênio demonstra a quantidade de energia demandada para a produção dos fertilizantes nitrogenados (Tabela 2)

**Tabela 2.** Comparação entre a fixação biológica e industrial de nitrogênio (adaptado de PAULL, 2009).

<b>Fonte de fixação do nitrogênio</b>	<b>Biológica</b>	<b>Industrial</b>
Temperatura	ambiente	450°C
Pressão	atmosférica	>100 atmosferas
Custo	zero	US\$ 80 por tonelada
Ocorre desde	Bilhões de anos	1909

Como a contribuição da FBN em leguminosas é o processo que apresenta maior contribuição para o aporte de N nos ecossistemas terrestres e devido à importância agrícola de leguminosas que apresentam a capacidade de fixar grandes quantidades de N atmosférico, este sistema é o mais estudado.

A associação entre rizóbios e leguminosas teve início a aproximadamente 58 milhões de anos, no início do período cretáceo, ao se considerar que as leguminosas tiveram origem a 60 milhões de anos e, portanto a história da associação rizóbio leguminosa tende a se confundir com a história da família leguminosa (SPRENT, 2008).

A nodulação em leguminosas não ocorre de maneira equânime nas três subfamílias desta família. A subfamília Caesalpinoideae pode ser dividida em quatro tribos, das quais duas apresentam espécies capazes de nodular. As tribos Cassiatae e Caesalpinieae têm membros capazes de formar nódulos como, por exemplo, *Mimosa* (LAVIN et al., 2005; SPRENT, 2008). Hirsch et al., (2001) estimam que apenas 25% das Caesalpinoideae sejam capazes de nodular. Além disso, a maioria das espécies nodulantes de Caesalpinoideae apresenta a formação de cordões de infecção, onde a membrana do cordão de infecção se mantém e não ocorre formação dos simbiossomas, mas sim conjuntos de células envolvidas individualmente livres no citossol do nódulo, do hospedeiro. A infecção destas plantas também não ocorre via pêlo radicular e sim através de aberturas naturais presente nas raízes das hospedeiras.

A subfamília Mimosoideae apresenta uma taxonomia mais controversa do se comparada com as duas outras subfamílias, tornando complicada a determinação do caráter nodulação na divisão entre tribos (LAVIN et al., 2005). Porém, as principais tribos atuais de Mimosoideae (Acaciae; Mimosae e Ingae) que surgiram a aproximadamente 30 milhões de anos apresentam a nodulação uniforme em quase todas as espécies, com algumas exceções de plantas que perderam a capacidade de nodular ao longo da evolução (SPRENT, 2007). A subfamília Papilionoideae contém as principais leguminosas de grãos cultivadas, como a soja, o feijão e a ervilha. Esta subfamília apresenta 28 tribos (LAVIN et al., 2005), das quais a maioria apresenta a capacidade de formar nódulos, com exceção de alguns grupos que perderam a capacidade de nodular, incluindo a tribo mais antiga desta subfamília Swartziaie (SPRENT, 2007 e 2009), tribo que originou os demais grupos desta subfamília (LAVIN et al. 2001). As subfamílias Mimosoideae e Papilionoideae apresentam cerca de 90% dos membros capazes de nodular (HIRSCH et al. 2001, LAVIN et al., 2005).

### 1.2.2–Diversidade de Bactérias Formadoras de Nódulos em Leguminosas

O primeiro isolamento de bactérias oriundas de nódulos de leguminosas foi realizado por Beijerinck em 1888 que classificou estas bactérias de *Bacillus radicola*, nome alterado por Frank em 1887-1890 para *Rhizobium leguminosarum* (MOREIRA, 2008). Desde então,

diversas espécies de rizóbio tem sido descritas e a gama de rizóbios capazes de nodular leguminosas tem crescido a cada dia. Até o início deste século estava bem estabelecida a classificação de rizóbios “clássicos” com seis gêneros de características e nodulando uma gama muito grande de leguminosas. Os gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Allorhizobium* (Tabela 3) pertencem a quatro famílias da sub-ordem  $\alpha$ -proteobactéria e eram considerados como as únicas bactérias capazes de nodular leguminosas (WILLEMS, 2006). A classificação taxonômica das estirpes de rizóbio tem sofrido uma revolução a partir de 2001, quando a avaliação de parte da coleção de culturas do INRA (Institut National de la Recherche Agronomique- Instituto Nacional de Pesquisa Agrônômica) na França revelou que grande parte das bactérias classificadas como rizóbio, pertenciam a outro gênero, ou melhor, a outra sub-ordem. As bactérias foram reclassificadas dentro da subordem  $\beta$ -proteobactéria, gênero *Burkholderia* (MOULIN et al., 2001). A partir de então diversas outras bactérias pertencentes a esta sub-ordem e a outras sub-ordens capazes de formar nódulos em leguminosas foram descritas (Tabela 4).

Recentemente foi observada a presença de  $\gamma$ -proteobactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Escherichia*, dentre outros em nódulos de *Hedysarum* spp. (BENHIZIA et al., 2004). A hipótese inicial dos autores dizia que estas bactérias seriam os simbiontes da leguminosa, porém, experimentos posteriores do mesmo grupo de pesquisa não detectaram a presença de genes *nif* nestes isolados, evidenciando ainda a ineficiência destas bactérias em nodular *Hedysarum* em condições gnotobióticas (MURESU et al., 2008). Apesar de haver populações de rizóbio muito baixas dentro dos nódulos, os resultados de redução de acetileno revelaram elevada atividade na fixação do nitrogênio, além da aparência saudável das plantas. Dessa forma, os autores especularam sobre a co-existência de rizóbios e de Pseudomonales nos nódulos destas plantas e que outros mecanismos que beneficiam as plantas possam estar agindo.

Outra  $\gamma$ -proteobactéria (*Cohnella phaseoli*) foi descrita recentemente isolada de nódulos de *Phaseolus* na Espanha, sendo esta espécie incapaz de nodular três espécies deste gênero, além de não apresentar genes *Nod A* (GARCIA-FRAILE et al., 2008). Também tem sido relatado na literatura o isolamento de diversas estirpes de bactérias pertencentes aos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e outras bactérias de crescimento rápido que apresentam a incapacidade de nodular novamente os seus hospedeiros originais, provavelmente devido a perda de plasmídeos onde se localizam os genes envolvidos na simbiose (genes *nif* e *nod*, por exemplo) durante o procedimento de isolamento, purificação e estocagem destes rizóbios (HUNGRIA e ARAÚJO, 1995; GARCÍA DE LOS SANTOS et al., 1996).

É difícil precisar a quantidade de bactérias formadoras de nódulos em leguminosas, uma vez que novas espécies são descritas e espécies já descritas são reclassificadas constantemente, porém a página do NCBI computa 72 espécies de rizóbio descritas além de diversas outras em proposição por grupos de pesquisa do mundo inteiro (até o dia 05/10/2009). Este número pode aumentar muito, uma vez que a maioria dos estudos taxonômicos realizados com rizóbios foi conduzido utilizando bactérias isoladas de raízes de leguminosas de grão, com importância agrícola e principalmente em regiões de clima temperado (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Estudos utilizando espécies nativas de regiões tropicais têm sido conduzidos e novas espécies têm sido descritas (MARTINEZ-ROMERO et al., 1991; MOREIRA et al., 1992; CHEN et al., 2001; VANDAMME et al., 2002; CHEN et al., 2005; MOREIRA et al., 2006; CHEN et al., 2008).

Além de *Burkholderia* spp. outras bactérias pertencentes à subclasse  $\beta$ -proteobactérias (além de outros gêneros de  $\alpha$ -proteobactéria) também já foram descritas com a capacidade de nodular leguminosas. Esta listagem de espécies está sumarizada na Tabela 4.

**Tabela 3.** Algumas características dos seis gêneros de rizóbio “clássicos”.

Gênero/ Família	Principais hospedeiras	Descrição original	Comentário	Referências
<i>Rhizobium</i> / Rhizobiaceae	Feijão, siratro, alfafa e leucena, dentre outras	FRANK (1889)	O gênero <i>Rhizobium</i> foi o primeiro gênero descrito para designar as bactérias que formam nódulos radiculares em leguminosas. Diversas espécies de crescimento rápido eram classificadas neste gênero, porém foram posteriormente classificadas dentro de outros gêneros de rizóbio. O gênero <i>Rhizobium</i> apresenta 28 espécies descritas e diversas outras em discussão no comitê internacional de taxonomia bacteriana. 6 espécies de <i>Agrobacterium</i> e 1 de <i>Allorhizobium</i> apresentam elevada similaridade genética com o gênero <i>Rhizobium</i> , e a proposta da inclusão destas espécies neste gênero é discutida na literatura.	YOUNG et al., (2001); VALVERDE et al., (2006); WILLEMS et al., (2006); HUNTER et al. (2008); HAN et al., (2008); GU et al. (2008); MOREIRA (2008); PENG et al. (2008); BERGE et al., (2009); HOU et al. (2009).
<i>Bradyrhizobium</i> / Bradyrhizobiaceae	Soja, <i>Vigna</i> , crotalária, dentre outras	JORDAN (1982)	O gênero <i>Bradyrhizobium</i> foi proposto por Jordan (1982) para agrupar as bactérias de crescimento lento que eram classificadas como <i>Rhizobium</i> . Este gênero contém 11 espécies e inclusão de uma espécie do gênero <i>Blastobacter</i> foi proposta em 2006	JORDAN et al. (1982); VINUESA et al. (2005); VAN BERKUM et al. (2006);
<i>Sinorhizobium</i> / Rhizobiaceae	Soja, feijão, e leguminosas florestais.	CHEN et al. (1988)	O gênero <i>Sinorhizobium</i> foi proposto por Chen e colaboradores em 1988 para agrupar os rizóbios de crescimento rápido capazes de nodular soja. Na ocasião de sua criação, o gênero <i>Sinorhizobium</i> foi questionado por não apresentar argumentos filogenéticos para a criação de um novo gênero, problema resolvido com a inclusão de outras espécies de <i>Rhizobium</i> . Existe a discussão a respeito da fusão dos gêneros <i>Sinorhizobium</i> e <i>Ensifer</i> devido à proximidade filogenética desses grupos, com a denominação do gênero de <i>Ensifer</i> , pois este gênero foi descrito anteriormente. São descritas 13 espécies de <i>Sinorhizobium</i> .	CHEN et al. (1988); WILLEMS et al., (2003); TOLEDO et al. (2003); WILLENS (2006); MOREIRA (2008).

**Tabela 3: continuação...**

<b>Gênero/ Família</b>	<b>Principais hospedeiras</b>	<b>Descrição original</b>	<b>Comentário</b>	<b>Referências</b>
<i>Azorhizobium/ Xanthobacteriaceae</i>	Sesbania e outras leguminosas arbóreas	DREYFUS et al. (1988)	Gênero descrito em 1988 contendo uma única espécie, formadora de nódulos em caules de Sesbania. Hoje o gênero contém duas espécies ( <i>A. caulinodans</i> e <i>A. doberanae</i> ) isoladas desta espécie	DREYFUS et al.(1988); MOREIRA et al. (2006).
<i>Mesorhizobium/ Phyllobacteriaceae</i>	Grão-de-bico, feijão e diversas espécies de leguminosas florestais	JARVIS et al. (1997)	Descrito em 1997 a partir de 5 espécies de <i>Rhizobium</i> , o gênero Mesorhizobium hoje contém 18 espécies. A maioria das espécies deste gênero apresenta crescimento intermediário entre o crescimento lento de <i>Bradyrhizobium</i> e o crescimento rápido de <i>Rhizobium</i> .	JARVIS et al. (1997) WILLEMS (2006).
<i>Allorhizobium/ Rhizobiaceae</i>	<i>Neptunia natans</i>	LAJUDIE et al. (1998)	<i>Allorhizobium</i> é o mais novo gênero descrito para as espécies rizobianas. Hoje este gênero contém apenas uma espécie ( <i>A. undicola</i> ) isolada de <i>Neptunia natans</i> no Senegal. YOUNG et al. (2001) propõem a inclusão desta espécie no gênero <i>Rhizobium</i> e a criação da nova espécie <i>R. undicola</i> .	LAJUDIE et al. (1998) YOUNG et al. (2001)

**Tabela 4.** Listagem dos gêneros de bactérias formadoras de nódulos em leguminosas recentemente descritas pertencentes às subordens  $\alpha$  e  $\beta$ -proteobacteria

Sub-classe	Gênero/família	Descrição da nodulação	Hospedeira	Referências
<b><math>\alpha</math>-proteobactéria</b>	<i>Devosia</i> / Hyphomicrobiaceae	RIVAS et al. (2003)	<i>Neptunia natans</i>	RIVAS et al. (2003).
	<i>Methylobacterium</i> / Methylobacteriaceae	SY et al. (2001)	<i>Crotalaria</i> spp.	SY et al. (2001); JOURAND et al. (2004)
	<i>Blastobacter</i> / Bradyrhizobiaceae	VAN BERKUM e EARDLY (2002)	<i>Acacia</i> sp.	VAN BERKUM e EARDLY (2002); VAN BERKUM et al.(2006); BALANCHADAR et al. (2007).
	<i>Phyllobacterium</i> / Phyllobacteriaceae	VALVERDE et al. (2005)	<i>Trifolium pratense</i>	VALVERDE et al. (2005); BALANCHADAR et al. (2007).
	<i>Ocrobactrum</i> / Brucellaceae	NGOM et al. (2004)	<i>Acacia mangium</i> ; <i>Lupinus honoratum</i>	NGOM et al. (2004); TRUJILO et al (2005)
	<i>Shinella</i> / Rhizobiaceae	LIN et al. (2008)	<i>Kummerowia stipulaceae</i>	LIN et al. (2008)
<b><math>\beta</math>-proteobactéria</b>	<i>Burkholderia</i> / Burkholderiaceae	MOULIN et al. (2001)	<i>Aspalathus carnosa</i> ; <i>Mimosa</i> spp.	MOULIN et al. (2001); CHEN et al. (2005); CHEN et al. (2008).
	<i>Cupriavidus</i> */ Burkholderiaceae	CHEN et al. (2001)	<i>Mimosa</i> spp.	CHEN et al. (2001); VANDAMME e COEYNE (2004).
	<i>Herbaspirillum</i> / Burkholderiaceae	VALVERDE et al. (2003)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	VALVERDE et al. (2003)

\*A descrição original do trabalho de Chen e colaboradores enquadrara *Cupriavidus* com no gênero *Ralstonia* (*R. taiwanense*), sendo reclassificado dentro deste grupo por Van Damme e Coeyne (2004).

Dentre os novos gêneros com capacidade de nodular espécies de leguminosas, a associação entre plantas do gênero *Mimosa* e bactérias do gênero *Burkholderia* merece destaque. Nestes pares simbiotes, ocorre a preferência à formação de nódulos em *Mimosa* spp. por *Burkholderia* spp. sendo estas bactérias mais competitivas quando co-inoculadas com estirpes de *Rhizobium tropici* e *R. etli* (ELLIOT et al., 2009). Outro ponto interessante é a incapacidade de espécies de *Mimosa* spp. em formar nódulos quando inoculadas com *Rhizobium* sp. estirpe NGR234 que é conhecida pelo seu amplo espectro de hospedeiros (mais

de 250 plantas incluindo *Parasponia* sp., planta pertencente à família Ulmaceae) (PUEPPKE e BROUGHTON, 1999). Além dessas peculiaridades a estirpe BR 3454 (*Burkholderia* sp.) de isolada de *M. scabrella* apresenta infecção nodular através da formação de cordões de infecção, o que não ocorre entre *Mimosa* spp. e outras bactérias (FARIA et al., 1988).

#### **1.2.2.1–Diversidade de rizóbios em área de Mata Atlântica**

A Mata Atlântica é o bioma mais impactado do Brasil. Sua degradação ocorre desde a chegada dos portugueses em 1500, primeiramente com a extração da madeira do Pau-Brasil (*Caesalpinia echinata*) e posteriormente com os ciclos de culturas agrícolas, começando com a cana de açúcar, passando pelo café, dentre outras (DEAN, 1996). A floresta Atlântica abrangia área total de 1.227.600 km<sup>2</sup>, hoje restam apenas 91.930 km<sup>2</sup> (7,5%), na sua maioria em fragmentos e em áreas de mata atlântica de altitude. A Floresta Atlântica é um dos 25 “hotspots” do planeta, estes “hotspots” são definidos como áreas de elevada biodiversidade com alto grau de endemismo, fortemente impactada pelas atividades antrópicas (MYERS et al., 2000).

Poucos estudos de diversidade e biogeografia foram conduzidos com bactérias formadoras de nódulos nativos do bioma da Mata Atlântica. Recentemente, um estudo avaliando a diversidade de rizóbios capazes de nodular o feijoeiro em solos da Mata Atlântica pernambucana revelou elevada diversidade, apesar da predominância de isolados de *R. tropici* (GRANGE et al., 2007). Este estudo indica a existência de isolados de *R. etli* na região estudada, levantando uma nova hipótese a respeito da biogeografia dos rizóbios no território nacional. Leguminosas arbóreas também podem nodular com uma grande quantidade de rizóbios nativos de solo de Mata Atlântica leguminosas como a palheteira (*Clitoria fairchildiana*), que pode nodular mais em solos de mata se comparado com áreas manejadas ou degradadas (SOUZA et al., 2007).

Grande parte das áreas onde originalmente havia a cobertura vegetal da Floresta Atlântica, hoje são áreas mal manejadas e degradadas. Essa degradação pode resultar em um pedossistema frágil e com baixa diversidade biológica (RESENDE et al., 2002). As pastagens não manejadas são parte desses sistemas, responsáveis por grande quantidade de perda de solo por erosão, redução da diversidade biológica e fertilidade do solo. Algumas dessas áreas demandam por processos de recuperação. A recuperação destas áreas é possível desde que ocorra um manejo adequado das espécies vegetais introduzidas. A introdução de leguminosas e de seus pares simbiotes pode representar uma estratégia para a recuperação destas áreas, pois a associação com estirpes de rizóbio pode fornecer uma quantidade de N importante para o estabelecimento vegetal na área durante o seu desenvolvimento inicial.

Para este propósito, a seleção de estirpes de rizóbios autóctones, é importante para o estudo da diversidade de rizóbios neste ecossistema. Em um dos estudos a respeito das comunidades de rizóbios da Mata Atlântica, Ribeiro et al. (2000) avaliaram a diversidade morfofisiológica das bactérias que formaram 42 grupos com a dominância de 5 grupos contendo mais de metade das bactérias.

#### **1.2.2.2–Importância do estudo de diversidade de rizóbios**

O Brasil é um país que detém ente 15 a 20% de toda a diversidade biológica do planeta (SALATI et al., 2006). Porém essa diversidade biológica é ainda pouco estudada e estudos de levantamento de espécies nos diferentes biomas brasileiros são necessários. Por exemplo, é estimado que apenas 30% das espécies amazônicas tenham sido catalogadas (SALATI et al., 2006). A maioria dos organismos catalogados até hoje nos diferentes biomas brasileiros, pertencem à flora ou à fauna nacional. Microrganismos são os indivíduos mais abundantes em qualquer ambiente, Hughes et al. (2001) estima que em 1 grama de solo superficial de floresta tropical exista entre 10<sup>4</sup> e 10<sup>8</sup> diferentes *taxa* bacterianos, o que reflete

uma biodiversidade muito grande, até hoje muito pouco inventariada e explorada nos estudos de diversidade biológica. Dentre essas bactérias estão os rizóbios que desempenham importantes papéis na nutrição vegetal e na manutenção dos ecossistemas, cuja diversidade ainda necessita de muitos estudos para melhor compreensão da ecologia destas comunidades. A diversidade bacteriana de solos de floresta tropical foi recentemente avaliada em estudo transcontinental, e a diversidade bacteriana total em regiões da Amazônia brasileira foi muitas vezes maior do que em regiões de temperadas (FIERER e JACKSON 2006). Essa elevada diversidade resulta em importantes implicações ecológicas, como a redundância funcional, resultando em uma capacidade de resiliência muito grande desses solos (JESUS et al., 2009).

Dentre as bactérias presentes nos solos tropicais, as bactérias diazotróficas também desempenham um papel muito importante na estrutura das comunidades de plantas. Essas bactérias têm seu estudo reduzido principalmente a espécies capazes de nodular espécies de importância agrônômica e inventários para avaliar a diversidade de rizóbios nos diferentes biomas são escassos. Alguns estudos avaliaram a diversidade rizobiana associada a espécies nativas da Caatinga (TEIXEIRA et al., 2010) e no Pantanal (JAMES et al., 2001) e para Floresta Amazônica (MOREIRA et al., 1992; OLIVEIRA e MAGALHÃES, 1999). A avaliação da diversidade rizobiana associada a espécies nativas podem ser importantes o entendimento da evolução das espécies nos diferentes ambientes, bem como trazer novos isolados de importância biotecnológica.

Estudos relacionados à diversidade de rizóbio podem auxiliar a responder perguntas a respeito da relação existente entre a especificidade e a promiscuidade entre bactérias e hospedeiros. Diversas bactérias apresentam uma faixa de hospedeiras restrita uma ou poucas espécies de leguminosas, enquanto outras espécies apresentam a capacidade de formar nódulos com uma gama muito grande de leguminosas, como por exemplo, a estirpe NGR234 de *Rhizobium* sp., que é capaz de nodular mais de 250 espécies de leguminosas, além da *Parasponia* uma Ulmaceae (PERRET et al., 2000). Essa relação de especificidade/promiscuidade entre hospedeiros e rizóbios está relacionada com a evolução simpátrica/alopátrica dos pares.

A evolução simpátrica de bactérias formadoras de nódulos e seus hospedeiros apresentam a tendência tornar mais específicas as associações, por uma questão de seleção natural, de simbioses submetidos a pressões de seleção semelhantes no mesmo ambiente (REIJOERS, 1976). Para exemplificar os casos de coevolução entre os pares simbioses, três bons exemplos podem ser citados:

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) é capaz de se associar com estirpes de rizóbio das espécies *Rhizobium tropici* e *R. etli*, dentre outras. *R. tropici* é oriundo da região mais setentrional da América Central enquanto *R. etli* é oriundo de regiões andinas na América do Sul, e estas espécies de rizóbio apresentam uma série de preferências a formar nódulos com genótipos de feijoeiro oriundos da mesma região, sugerindo ter havido durante a evolução destes parceiros um estreitamento da especificidade por sofrerem as mesmas pressões de seleção nos locais de origem (LAGUERRE et al., 2001; AGUILAR et al., 2004).

O estabelecimento da associação entre a espécie arbórea *Mimosa caesalpiniiifolia*, oriunda de regiões do Cerrado e da Caatinga brasileira, que nodula preferencialmente com *Burkholderia sabiae* (CHEN et al., 2008), bactéria oriunda das mesmas regiões que a espécie de *Mimosa*, o que também sugere ter ocorrido maior estreitamento na capacidade de estabelecer a simbiose entre estes pares.

Leguminosas herbáceas nativas da África do Sul pertencentes ao gênero *Rhynchosia* nodulam preferencialmente com estirpes de *Burkholderia* spp., do que com *Bradyrhizobium* e a  $\beta$ -proteobactéria *Cupriavidus taiwanensis*. O gênero *Rhynchosia* é adaptado a regiões de solos ácidos e de baixa fertilidade natural, e as bactérias foram isoladas de *Rhynchosia* spp. crescidas naturalmente em campos com estas características, indicando ter ocorrido a co-

evolução entre esses pares simbioses nos campos de solos ácidos de baixa fertilidade sul africanos (GARAU et al., 2009).

Outra questão ainda não respondida no campo da rizobiologia é a respeito da biogeografia dos rizóbios. Conforme discutido anteriormente, acredita-se que a ocorrência da nodulação em leguminosas teve início a 58 milhões de anos (LATVIN et al. 2005; SPRENT, 2007). *Azorhizobium caulinodans*, pode ser isolado de nódulos de *Sesbania rostrata* na América do Sul e da África, regiões que se separaram a mais de 130 milhões de anos, no início do período Cretáceo (MOREIRA, 2008). Existe a possibilidade de que estas bactérias tenham cruzado o Oceano Atlântico, chegando aos solos africanos através de navios que constantemente faziam este trajeto traficando escravos, durante o período do Brasil colônia. A migração de estirpes de rizóbio entre continentes durante o período das grandes navegações já foi proposto para o *R. tropici* e *R. etli*, das Américas para a Europa (LAGUERRE et al., 2001). Porém outra hipótese é a do desenvolvimento alopátrico dessa espécie conforme já foi sugerido em experimentos de microcosmos em condições laboratoriais para bactérias do gênero *Pseudomonas* (BROCKHURST et al., 2004).

O isolamento, caracterização e avaliação da eficiência agrônômica de isolados de rizóbio, candidatos à recomendação para a produção de inoculantes, é um importante trabalho na exploração da diversidade do germoplasma rizobiano. A prospecção de rizóbios candidatos à recomendação para a produção de inoculantes pode isolar bactérias que sejam mais eficientes e competitivas que as bactérias atualmente recomendadas. Como exemplos podem ser citados o caso do feijoeiro comum e do feijão-caupi no Brasil. As estirpes hoje recomendadas para a produção de inoculantes para essas culturas são resultado da prospecção de rizóbios em diferentes eco-regiões tropicais. As estirpes recomendadas para a cultura do feijoeiro pertencem à espécie *Rhizobium tropici* e foram isoladas da Colômbia e do sul do Brasil (estirpes BR 322 e BR 520, respectivamente) (MARTINEZ-ROMERO et al., 1991; HUNGRIA et al., 2000). Inclusive o isolado padrão utilizado na descrição desta espécie, foi a estirpe BR322 (CIAT 899<sup>T</sup>). Das três estirpes recomendadas para o feijão-caupi, duas foram isoladas de solos da Amazônia (estirpes BR 3301 e BR 3302), (LACERDA et al., 2004) além da estirpe BR 3267, isolada da região semi-árida do nordeste brasileiro (MARTINS et al., 2003). De certa forma, o trabalho de prospecção de rizóbios candidatos à recomendação também é um trabalho intenso de estudo da diversidade rizobiana, o que ressalta a importância de entendimento dessa diversidade.

Dessa forma estudos que tenham por objetivo avaliar a diversidade de rizóbio podem trazer importantes colaborações à ecologia, biogeografia e a aplicações biotecnológicas para as estirpes de rizóbio.

### **1.2.2.3–Estudo da diversidade fenotípica de rizóbios.**

Recentemente, diversos estudos têm revelado a diversidade de rizóbios via métodos sofisticados de biologia molecular. Estudos utilizando técnicas como o sequenciamento de genes e de genomas completos tem permitido o melhor entendimento da taxonomia rizobiana e das relações entre esses grupos de organismos. A recente revolução na taxonomia de rizóbio, descrevendo grupos de  $\beta$ -proteobactéria como capazes de formar nódulos em leguminosas, só foi possível mediante o uso dessas técnicas moleculares avançadas (JESUS e MOREIRA, 2008).

Com o advento da biologia molecular, os métodos clássicos de caracterização rizobiana baseada nas características morfofisiológicas passaram a ser menos utilizados, pois segundo alguns autores essas características não são suficientes para a elucidação das relações filogenéticas dos diferentes grupos de rizóbios (WOESE, 1987), porém as características culturais das bactérias certamente têm sua importância.

A aplicação da biologia molecular aos estudos de diversidade microbiana é de alto



custo, pois exige equipamentos e reagentes dispendiosos. Isso com certeza limita a aplicação destas técnicas em diversos laboratórios do Brasil. Metodologias avaliando as características culturais das bactérias, não necessita de investimentos elevado e podem revelar informações importantes a respeito da fisiologia, ecologia e taxonomia dos rizóbios. Além disso, recentemente diversos estudos têm empregado uma abordagem polifásica de caracterização de rizóbios, avaliando tanto as características culturais, como as características moleculares e bioquímicas, integrando técnicas que até poucos anos eram consideradas divergentes (VANDAMME et al., 1996; GUEDES et al., 2008).

Algumas das principais características culturais utilizadas na caracterização morfofisiológica dos isolados rizobianos, serão brevemente discutidos a seguir.

**a) pH do meio de cultura:** os rizóbios são cultivados principalmente em meio de cultura YMA (“yeast extract manitol agar”- manitol e extrato de levedura e ágar) sólido. Este meio de cultura apresenta inicialmente pH neutro (entre 6,8 e 7,0). Este meio de cultivo também apresenta um indicador de pH, o azul de bromotimol que em pH neutro do meio apresenta coloração verde. A mudança do pH altera a coloração do meio para amarelo (ácido) ou azul (alcalino). Algumas inferências taxonômicas podem ser feitas de acordo com o pH final do meio de cultura, por exemplo as estirpes de *Rhizobium* spp. na maioria dos casos apresenta alteração do pH do meio de cultivo para pH ácido, enquanto *Bradyrhizobium* spp. apresentam reação alcalina (JORDAN, 1982). Esta característica pode ainda representar uma relação de adaptação ao ambiente, uma vez que estirpes de crescimento ácido geralmente são oriundas de solos mais ácidos e menos férteis, ao contrário das estirpes de crescimento alcalino (BUSHBY e MARSHALL, 1977). Na produção de inoculantes mistos (com mais de uma estirpe de rizóbio) a avaliação do pH de crescimento das estirpes também é importante no intuito de determinar a compatibilidade entre as estirpes coexistentes no mesmo produto.

**b) Produção de exopolissacarídeos:** A produção de exopolissacarídeos em meio de cultura é outra característica avaliada na caracterização morfofisiológica de rizóbios. Podem ser avaliadas quatro características em relação à produção de EPS: quantidade, elasticidade, aderência ao meio de cultura, homogeneidade e viscosidade. Assim como o pH, essas características podem revelar informações a respeito da taxonomia de rizóbio. Estirpes de *Rhizobium* spp. geralmente produzem mais EPS em meios sólidos do que estirpes de *Bradyrhizobium* spp., (BUSHBY e MARSHALL, 1977), e essa característica também pode estar associada a resistência à estresses ambientais uma vez que os EPS podem formar uma camada protetora a colônias de rizóbio, quando expostas a elevadas temperaturas ou elevadas concentrações de alumínio trocável (HOLLINGSWORTH et al., 1985).

**c) Tempo de crescimento:** As estirpes de rizóbio podem ser classificadas de acordo com o tempo de crescimento em meio de cultura. Nesta classificação, as estirpes são enquadradas em quatro grupos: 1–crescimento rápido, estirpes com crescimento abundante até o terceiro dia de incubação; 2–crescimento intermediário, estirpes que crescem entre 4 e 5 dias; 3–crescimento lento, estirpes que crescem entre 6 a 9 dias e 4–estirpes de crescimento muito lento, com período de crescimento acima de 10 dias (MARTINS et al., 1997). O tempo de crescimento pode estar relacionado com o ambiente no qual a bactéria está adaptada. Bactérias de crescimento rápido geralmente são isoladas de solos mais pobres de regiões de clima mais quente e seco. Ao contrário das bactérias de crescimento mais lento, que podem ser isoladas principalmente de regiões de solos mais férteis com climas menos severos, o que pode representar uma estratégia no uso de energia para a proliferação em detrimento à atividade saprofítica na ausência de uma planta hospedeira (BUSHBY e MARSHALL, 1977; SPRENT, 1994). O tempo de crescimento dos rizóbios apresenta inclusive relações com a

taxonomia destas bactérias, uma vez que *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Allorhizobium*, são gêneros de bactérias de crescimento rápido, *Mesorhizobium* apresenta espécies de crescimento intermediário, enquanto *Bradyrhizobium* apresenta crescimento lento. *Azorhizobium* pode apresentar bactérias de crescimento rápido ou intermediário (PADMANABHAN et al., 1990; MOREIRA e PEREIRA, 2001; MOREIRA et al., 2006), podendo haver exceções (PADMANABHAN et al., 1990). A etimologia dos gêneros *Bradyrhizobium* e *Mesorhizobium* reflete inclusive o tempo de crescimento dessas bactérias brady=lento (JORDAN, 1982) e meso=intermediário (JARVIS et al. 1997).

**d) Morfologia das colônias:** Com relação às colônias são avaliadas as características referentes ao diâmetro, tipo de borda, superfície e transparência. Essas características estão intimamente relacionadas com outras características como a quantidade de muco produzido. Geralmente colônias puntiformes (com diâmetro menor que 1 mm) são características de bactérias que produzem pouco muco, enquanto colônias com mais de 3 ou 4 mm são características de bactérias que produzem mais muco. (MARTINS et al., 1997). Da mesma forma pode-se fazer um paralelo com a superfície da colônia e a produção de muco, colônias com superfícies mais planas geralmente são de bactérias que produzem pouco muco, enquanto bactérias com maior produção de muco geralmente apresentam colônias com superfícies mais convexas. A transparência da colônia pode variar de opaco, quando não há passagem de luz pela colônia, a transparente, quando há grande quantidade de luz atravessando a colônia, com um estágio intermediário, o translúcido, quando a colônia retém parte da luz, não sendo completamente transparente. Esta característica está relacionada com a concentração e a consistência do muco na colônia. Colônias com muco menos concentrados e mais aquosos, apresentam maior transparência do que colônias com muco mais concentrados, que geralmente são mais opacas (MARTINS et al., 1997).

Outras características fenotípicas podem ser avaliadas para melhor caracterizar os isolados e para obter informações complementares a respeito da sua ecologia e sua fisiologia. Tais características podem ser a tolerância à acidez (OLIVEIRA e MAGALHÃES; 1998), resistência intrínseca a antibióticos (XAVIER et al., 1998), tolerância a elevadas concentrações de  $Al^{3+}$  (AARONS e GRAHAM, 1991, HARA e OLIVEIRA, 2004), capacidade de crescimento em temperaturas distintas (SILVA et al., 2007c; MEDEIROS et al., 2007; MEDEIROS et al., 2009), dentre outras características.

### 1.2.3–Adubação Verde

A adubação verde é uma prática conhecida desde os primórdios da agricultura e consiste no uso de leguminosas em rotação ou consórcio com outras plantas de interesse agrícola, com os restos culturais mantidos na superfície ou incorporados ao solo (COSTA, 1993). Esta prática tem sido manejada principalmente de duas formas, em consórcio ou em rotação de culturas, dependendo das espécies utilizadas.

A adubação verde colabora para a disponibilização de nutrientes (principalmente nitrogênio) para a cultura principal, diminuindo o uso de fertilizantes. A composição de resíduos de três leguminosas utilizadas como adubos verdes incorporadas ao solo em um estudo de microcosmo demonstrou que a decomposição da biomassa de amendoim forrageiro, guandu e indigófera, resultou em um aporte inicial de até 10 t/ha de fitomassa e a mineralização do nitrogênio contido neste material disponibilizou até 40 kg de N prontamente assimilável ao longo de 19 semanas de incubação, restando ainda uma grande quantidade de N ainda nos tecidos não decompostos e que podem ser liberados ao longo do tempo (THIPPAYARUGS et al., 2008).

Em um sistema de rotação de culturas, utilizando-se o trevo como leguminosa para adubação verde, a cultura subsequente (azevém) obteve grandes quantidades de nitrogênio e

potássio provenientes do cultivo anterior e essa prática resultou ainda em menor lixiviação destes elementos devido à incorporação da biomassa do trevo ao solo (ASKEGAARD e ERIKSEN, 2008). Alves et al. (2004) avaliaram a disponibilidade de nitrogênio e fósforo em sistema orgânico devido a incorporação da biomassa de guandu. Os resultados deste estudo demonstraram que o aporte de nitrogênio após a incorporação dos resíduos da poda do guandu atingiu níveis de até 283 kg/ha, enquanto os níveis de fósforo atingiram níveis de até 23 kg/ha e uma fitomassa de 11 t/ha. A utilização de grande quantidade de biomassa vegetal (até 16 t/ha) em sistema de consórcio resultou em aumento da produtividade do milho e do feijão em até 77%, utilizando-se três leguminosas tropicais como adubos verdes (leucena, sesbânia e guandu), em sistema de rotação de culturas, havendo ainda a influência significativa na produtividade por três safras seguidas, devido à grande quantidade de nutrientes liberados paulatinamente pela transformação da biomassa incorporada (ONIM, et al., 1990).

Além do fornecimento de nutrientes para as culturas de interesse, uma das principais contribuições da adubação verde para os agroecossistemas está na melhoria da qualidade do solo. O aporte de biomassa nesse sistema é elevado e a incorporação de carbono no solo altera positivamente as características químicas, físicas e biológicas (ESPÍNDOLA et al., 2005).

A qualidade da matéria orgânica incorporada estável em solo cultivado com leguminosas como adubo verde é diferente daquela cultivada apenas com monoculturas ou deixada em pousio, pois o percentual de ácidos húmicos, fúlvicos e humina da matéria orgânica em solos cultivados com os adubos verdes é significativamente maior do que o percentual dessas frações em solos de pastagem de capim colômbio ou em pousio (CANELLAS et al., 2004). Estas frações da matéria orgânica são responsáveis por aumento da fertilidade do solo e também por apresentar ativação do crescimento vegetal, ou seja, solos com elevadas concentrações dessas frações orgânicas apresentam melhores condições para o desenvolvimento vegetal. Além da matéria orgânica humificada, a utilização de leguminosas em sistemas de rotação de culturas aumenta a concentração de carbono total do solo, aumentando a quantidade de colóides orgânicos, resultando em aumentos da capacidade de troca catiônica (CTC) e na redução das perdas de nutrientes por lixiviação (TESTA et al., 1992, CANELLAS et al., 2004).

Espíndola et al. (2005) também ressaltaram que a adubação verde pode resultar em melhorias nas características físicas do solo. Um dos principais fatores que pode contribuir com a melhora da qualidade física do solo em condições de cultivo de adubos verdes, tanto em sistemas de rotação como em sistemas de consórcio está relacionado à cobertura do solo o que protege do impacto direto das chuvas, reduzindo a erosão (FAGERIA, 2007).

Além do controle da erosão, a utilização de adubos verdes tem papel importante na densidade do solo. Esta característica física é importante para a manutenção do desenvolvimento vegetal e para o movimento da água e dos solutos no perfil do solo. Solos mais compactados pelo manejo inadequado têm impedimento mecânico à penetração de água, apresentando elevada susceptibilidade à erosão. A manutenção de alta quantidade de matéria orgânica favorece a manutenção da densidade do solo (FAGERIA, 2007), uma vez que a incorporação da biomassa de adubos verdes de leguminosas resulta em aumento do tamanho e maior estabilidade dos agregados, aumento da porosidade e diminuição da resistência à penetração radicular (LATIF et al. 1992; MANDAL et al. 2003). Essas características físicas são alcançadas mais facilmente quando o adubo verde utilizado é uma leguminosa em vez de gramíneas, grande produtoras de biomassa, como o capim colômbio (MANDAL et al. 2003).

Os adubos verdes também influenciam positivamente nas características biológicas do solo, uma vez que há aumento da atividade e da diversidade dos grupos de organismos do solo (ESPÍNDOLA et al., 2005). Diversos grupos que ocupam nichos ecológicos importantes no solo são beneficiados com incorporação de resíduos de adubos verdes nos solos, podendo destacar os fungos micorrízicos arbusculares (SOUZA et al., 1999), as bactérias promotoras

de crescimento vegetal e rizóbios (GUTIÉRREZ-ZAMORA e MARTINEZ ROMERO, 2001). Além de microrganismos associados às plantas, outros grupos funcionais do solo também são beneficiados com a incorporação de resíduos de leguminosas como adubos verdes, uma vez que a atividade de importantes enzimas dos ciclos do carbono, nitrogênio e fósforo, é aumentada, resultando em mais rápida estabilização da matéria orgânica no solo e disponibilização de nutrientes para a cultura seguinte (DICK, et al. 1988).

#### **1.2.4–Produção de Inoculantes**

O sucesso da tecnologia da inoculação é resultado do conhecimento acumulado por mais de mais de cem anos de pesquisa. Os primeiros inoculantes desenvolvidos a partir de culturas puras de rizóbio foram comercializados nos Estados Unidos, a partir de 1896 (NOBBE e HITNER, 1896 *apud* SMITH, 1992). Hoje os inoculantes são comercializados na maioria dos países do mundo. Podemos citar alguns exemplos como na Austrália, onde são plantados mais de 94 milhões de hectares de leguminosas inoculadas (BULLARD et al., 2005), no Canadá onde mais de 91% dos agricultores que produzem leguminosas (principalmente soja, lentilha e grão de bico) utilizam inoculantes rizobianos (ROSS, 2002), nos Estados Unidos onde são plantados mais 70 milhões de hectares de soja e demais leguminosas, dos quais aproximadamente 60% são inoculados (PHILLIPS, 2004), na Argentina são plantados aproximadamente 10 milhões de hectares inoculados de soja (aproximadamente 15 milhões de doses)<sup>1</sup> (GONZALÉZ et al, 2006) e no Brasil são plantados 22 milhões de hectares de soja inoculados com mais de 25 milhões de doses de inoculantes rizobianos, garantido produtividade de mais de 2500 kg de grãos por hectare (HUNGRIA, 2006).

O histórico de seleção de estirpes e de pesquisas em inovação tecnológica na área de FBN compartilha com muitos elementos no sistema de produção de soja no Brasil. Embora a produção de inoculantes em escala comercial no Brasil tenha tido início em 1956, experimentos com inoculação de soja, tiveram início no sul do Brasil no início do século passado (JARDIM FREIRE e VERNETTI, 1999). Experimentos de seleção de estirpes e de inoculação de soja em diferentes regiões do Brasil tiveram início na década de 1960 com o “Ensaio nacional de cultivares x inoculantes”, o que culminou com a expansão da soja para o Centro-Oeste do Brasil, já dependente da inoculação com estirpes de rizóbio (JARDIM FREIRE e VERNETTI, 1999). A adoção maciça dos produtores aos inoculantes na década de 1970 resultou no início do aumento da produção nacional, quando aproximadamente meio milhão de doses de inoculantes em 1970/71 (Figura 1).

##### **1.2.4.1–Determinações do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)**

Para a proteção do direito do produtor de adquirir um produto de qualidade e para a garantia da eficiência da tecnologia e competitividade no mercado externo (principalmente da soja), a legislação brasileira determina que os inoculantes vendidos no Brasil atendam a parâmetros de conformidade determinados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) através da instrução normativa n° 5 de 06 de agosto de 2004 (BRASIL, 2004). Para enquadrar-se nesses padrões de conformidade, as formulações de inoculantes devem atender aos seguintes parâmetros:

- Apresentar a(s) estirpe(s) recomendada(s) para a cultura a que se destina;
- Apresentar concentração de células igual ou superior a  $10^9$  por grama ou mL de inoculante;
- Apresentar validade igual ou superior a 180 dias a partir da data de fabricação;
- Não apresentar microrganismos não especificados a partir da diluição  $10^{-5}$  de uma diluição

---

<sup>1</sup> Na safra 2004-2005.

seriada;

- Ser capaz de fornecer ao menos 600 mil células por semente (obrigatório apenas para os inoculantes para a cultura da soja).

A legislação brasileira nem sempre determinou parâmetros tão rígidos para a produção e comercialização de inoculantes. Esse grau de exigência foi aumentando ao longo dos anos, conforme os estudos em microbiologia do solo e tecnologia de inoculantes permitiram melhor entendimento das variáveis que influenciam na qualidade e nas características do produto final (FERNANDES JÚNIOR et al., 2009).

Conforme determina o MAPA, as empresas do setor devem adquirir as estirpes rizobianas junto à coleção SEMIA (antiga Seção de Microbiologia Agrícola da secretaria de agricultura do Rio grande do Sul) da FEPAGRO (Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária-RS) que é o órgão depositário reconhecido pelo Ministério da Agricultura para as estirpes de rizóbio recomendadas de acordo com as instruções normativas (IN) do MAPA<sup>2</sup>.

Além de conter uma fase viva (celular rizobianas), os inoculantes detêm uma fase que tem a função de comportar esses microrganismos (veículo). No Brasil não há restrição ao uso de qualquer material como veículo de inoculação, desde que este material apresente-se em conformidade com as determinações da IN n° 05 06 de Agosto de 2004 (BRASIL, 2004). Para a obtenção de veículos de qualidade, as empresas do setor estão importando turfas, uma vez que as turfeiras do Brasil não possuem turfa com qualidade adequada para serem utilizadas como veículo de inoculante (FERNANDES JÚNIOR, 2006). Além dos inoculantes em veículos turfosos, quase metade dos inoculantes comercializados no Brasil são inoculantes líquidos cujas formulações e composições são protegidas por patentes ou por segredo industrial (MAGRI, 2006). Recentemente, um veículo de inoculação com base em misturas poliméricas foi desenvolvido através de uma parceria entre grupos de pesquisa da UFRRJ e da Embrapa Agrobiologia e pode ser uma alternativa para esse setor (FERNANDES JÚNIOR et al., 2009).

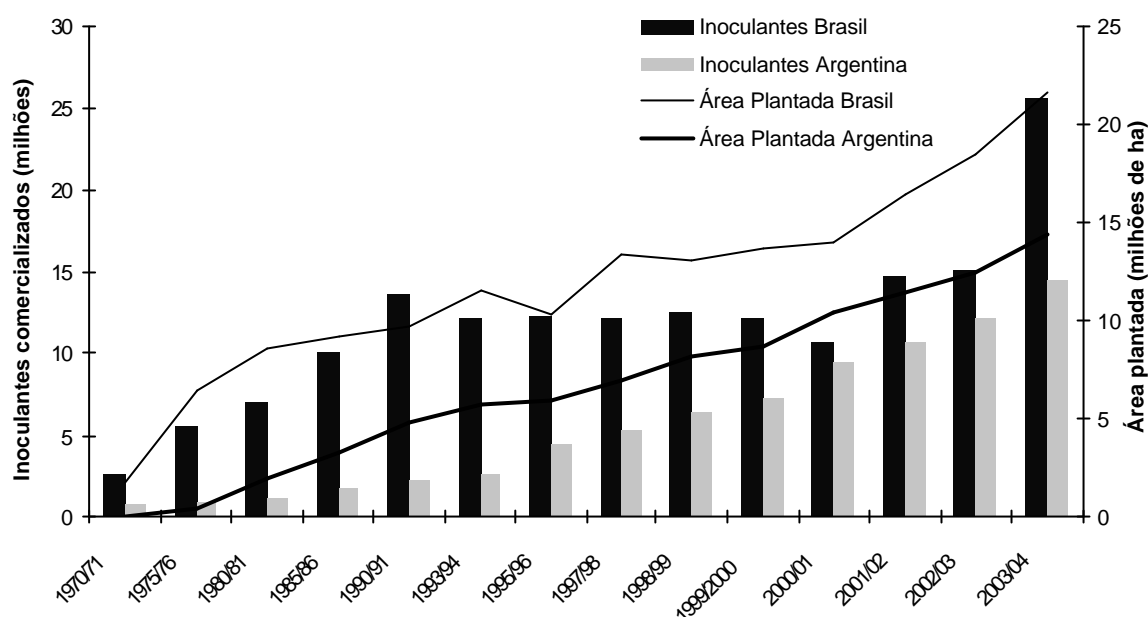
#### **1.2.4.2–Mercado brasileiro de inoculantes**

O mercado brasileiro de inoculantes hoje pode ser enquadrado como um dos maiores mercados do mundo. A grande maioria dos inoculantes vendidos no Brasil são destinados à cultura de soja e o crescimento da área plantada dessa cultura é acompanhada do crescimento das vendas de inoculantes no Brasil (Figura 1).

Esse crescimento é resultado de muitos anos de pesquisa em melhoramento genético da soja almejando a supressão da adubação nitrogenada e incorporando como característica de interesse dos programas de melhoramento a nodulação com estirpes de rizóbio eficientes (JARDIM FREIRE e VERNETTI, 1999). Hoje a totalidade de produtores de soja no Brasil se beneficia da FBN, seja em inoculações a cada plantio como é o caso da região Centro-Oeste, ou se beneficiando de populações bem estabelecidas de rizóbio oriundas de inoculações maciças há vários anos, como é o caso do Sul do Brasil (HUNGRIA et al., 2006). Nos Estados Unidos, que é o maior produtor de soja do mundo, apenas 15% dos produtores inoculam as suas sementes com rizóbios, os demais produtores utilizam fertilizantes nitrogenados (USDA, 2006).

---

<sup>2</sup> As estirpes recomendadas para a produção de inoculantes no Brasil estão relacionadas no anexo II da instrução normativa n° 10 de 31 de março de 2006 (BRASIL, 2006).



**Figura 1.** Mercado de inoculantes e área plantada de soja no Brasil e na Argentina (adaptado de HUNGRIA, 2006).

No Brasil as empresas do setor de fabricação e importação de inoculantes estão concentradas nas regiões Centro-Oeste e Sul (QUEIROZ, comunicação pessoal) provavelmente devido à concentração nestas regiões da produção de soja. O transporte de inoculantes rizobianos para regiões mais distantes, como o Nordeste brasileiro por exemplo deve ser feito em condições refrigeradas o que contribui para a elevação do preço do produto. Com a crescente área de produção de feijão-caupi na região semi-árida, a instalação de empresas do gênero nestas regiões representa a possibilidade de expansão da utilização de inoculantes de baixo custo, principalmente por pequenos produtores da região.

Além disso, dependência das empresas do setor apenas dos produtores de soja, torna o ramo muito vulnerável às possíveis oscilações do total da área plantada. Além disso, muitos produtores que estão estabelecidos há muito anos em áreas onde é plantada a soja, não estão adotando a prática da re-inoculação, uma vez que a população de rizóbio no solo já é bem estabelecida e a re-inoculação pode não trazer ganhos significativos de produção. Esta situação é a que está ocorrendo no sul do Brasil, onde anualmente apenas 60% dos agricultores re-inoculam a soja (HUNGRIA, 2006).

Dessa forma, o mercado brasileiro de inoculantes é muito grande, porém muito frágil. A cadeia produtiva de inoculantes no Brasil possui membros que atuam no fornecimento da matéria prima, como reagentes químicos, veículos e embalagens. Além do ramo de transportes e no seguimento dos produtores rurais, que se constituem no o destino final destes produtos. A queda da venda de inoculantes por qualquer um dos motivos citado acima, pode representar impactos significativos em todos os componentes desta cadeia.

A diversificação das atividades do setor produtor de inoculante pode estar em consonância com as necessidades do mercado, fortalecendo o setor e atendendo a demandas até hoje não atendidas. Até o ano de 2006, as indústrias de inoculantes se situavam somente nas regiões Centro-Oeste e Sul do Brasil, estando ausentes em outras regiões que tem um cultivo de leguminosas crescentes, como as regiões Norte e Nordeste.

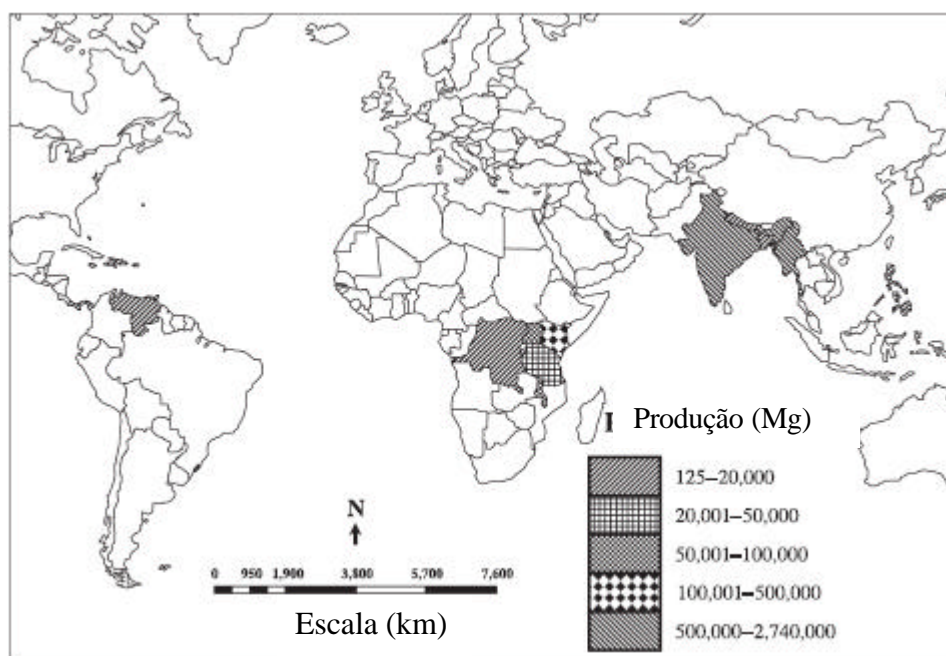
Para os adubos verdes no Brasil, a instrução normativa nº 10 de 2006 recomenda 10 estirpes para 9 culturas (BRASIL, 2006). Algumas estirpes são recomendadas para 2 ou mais culturas, como por exemplo a estirpe BR 2003 (SEMIA 6154) que é recomendada para

*Crotalaria spectabilis*, *C. juncea*; feijão de porco e guandu. Diferentemente das leguminosas de grãos onde as estirpes recomendadas são apenas para uma cultura, a inespecificidade na recomendação dos inoculante para os adubos verdes no Brasil torna necessário um trabalho de prospecção de novos isolados eficientes que apresentam a capacidade de se associar às espécies de adubos verdes e sejam eficientes, competitivas e de preferência específicas, no intuito de aumentar a adoção da prática da inoculação por parte dos produtores. Para o guandu, duas estirpes são recomendadas a estirpe BR 2003 (SEMIA 6154) e a estirpe BR 2801. A estirpe BR 2003 foi isolada de *Stylosantes* spp enquanto a estirpe BR 2801 foi isolada de crotalária.

Devido à elevada promiscuidade desta espécie vegetal, a sua inoculação com estirpes de rizóbio não é recomendada em alguns países, uma vez que a nodulação espontânea pode render elevada nodulação e FBN. Porém, em condições de inoculação esta espécie pode atingir elevados níveis de nitrogênio fixado, alcançando até 254 kg/ha em condições de campo (PEOPLES, et al., 1995), o que ressalta a importância da seleção de estirpes nodulantes capazes de se associar a esta espécie vegetal.

### 1.2.5 Cultura do Guandu

O guandu [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] é uma leguminosa originária do continente africano pertencente à sub-tribo Cajaninae, tribo Phaseolae, de importantes culturas de leguminosas de grãos como o feijão comum e a soja (ODENY, 2007). O guandu é a única planta cultivada dentre 32 espécies conhecidas na sub-tribo Cajaninae, cujo principal produtor mundial é a Índia, cujas produtividades alcançam mais de 2,7 milhões de toneladas anuais (FAOSTAT, 2007) (Figura 2). O maior produtor das Américas e a Colômbia onde as maiores produções atingem 20 mil toneladas. O Brasil não figura na listagem de grandes produtores de guandu da FAO (FAOSTAT, 2007) (Figura 2).



**Figura 2.** Produção mundial de guandu (*Cajanus cajan* (L.) Mill.) segundo a FAO (FAOSTAT, 2007). Extraído e adaptado de Odeny (2007).

A principal utilização do guandu no Brasil é para a adubação verde que é favorecida por características como a alta produção de fitomassa, pela velocidade de mineralização dos tecidos (SALMI et al., 2007) e a devada concentração de nutrientes principalmente nos

tecidos foliares (SILVEIRA et al., 2005). Em estudos comparando a produção de diversas culturas utilizando o guandu como adubos verdes tem demonstrado um incremento na produtividade das culturas de interesse.

Avaliando diversos estudos onde o guandu foi utilizado como adubo verde em associação (consórcio ou rotação) com outras culturas, a produção da cultura principal apresentou incrementos significativos quando comparado com o cultivo solteiro ou quando utilizados outros adubos verdes. O aumento de produção de diversas do feijoeiro atingiu 73% para quando consorciado com o guandu em sistema de rotação de culturas no Estado de São Paulo (MIYASAKA et al., 1966). A produção do milho aumentou 10% sistema de rotação de culturas tanto em plantio direto como convencional no Cerrado (CARVALHO et al., 2004). A batata doce atingiu produção 17% maior em consórcio com o guandu, comparando com a batata plantada em ausência de vegetação em 75% comparando com a batata plantada com vegetação espontânea em sistema de manejo orgânico (ESPÍNDOLA et al., 1998). A cultura da mandioca apresentou a produção de raízes 22% maior quando consorciada com o guandu sistema de cultivo convencional no Cerrado (AMABILE et al., 1994). A produtividade de laranja pêra foi incrementada em 58% quando em consórcio com o guandu em um sistema de plantio convencional no Estado do Paraná (BORDIN et al., 2008). Estes e outros resultados demonstram o potencial do guandu para a utilização como adubo verde em diferentes sistemas de cultivo, nas diferentes regiões do Brasil.

Além da adubação verde, diversos criadores de gado, principalmente de corte, utilizam o guandu como forragem devido principalmente ao elevado teor de nitrogênio nas folhas (PROVAZI et al., 2007), alcançando até 20% de proteína bruta, apesar da menor palatabilidade para o ruminante, se comparada com outras forrageiras como a leucena (XAVIER e BOTREL, 2001).

Com relação às características agronômicas, existe grande variabilidade entre as diferentes cultivares de guandu utilizadas para os diversos fins, porém de uma maneira geral, é uma planta que apresenta de média a alta resistência a seca e a elevadas temperaturas, baixa resistência ao frio, com um ciclo variando de 120 a 200 dias (HANCOCK, 2004). A literatura apresenta dados bastante variáveis com relação à produção de biomassa, porém estudos têm demonstrado que a produção de biomassa de guandu pode atingir mais de 20 toneladas ha<sup>-1</sup> em estudo realizado no Brasil (MIYASAKA et al., 1966) e mais de 25 toneladas ha<sup>-1</sup> em um estudo realizado na África (ADU-GYAMFI et al., 2007).



## 1.3–MATERIAL E MÉTODOS

### 1.3.1–Amostragem e Descrição das Áreas

Foram realizadas coletas de amostras de solo em oito áreas, das quais quatro estão situados no município de Pinheiral, região sul fluminense e as outras quatro estão localizadas no município de Seropédica. Os solos amostrados em Pinheiral pertencem às classes Latossolo Amarelo (LA); Argissolo Vermelho (PV); Argissolo Acinzentado (PAC) e Neossolo Flúvico (RU), esses solos foram escolhidos devido a resultados de estudos desenvolvidos no Laboratório de Ecologia Microbiana, que revelaram elevada diversidade de bactérias cultiváveis e de grupos de Acidobacteria e de Verrucomicrobia nesses solos (PASSOS et al., 2008a). Os solos coletados em Seropédica são Argissolos Vermelho-Amarelos (PVA) e Planossolos Háplicos (SX) submetidos a manejo convencional e orgânico no Campo Experimental da Embrapa Agrobiologia (Campo Experimental) e no Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA), respectivamente. A localização e descrição das áreas e de cada classe de solo amostradas estão descritas na Tabela 5.

Em cada ponto de amostragem foi coletado aproximadamente 60 kg do horizonte superficial de cada solo. Cada amostra foi constituída de 10 sub-amostras coletadas em um raio de 10 a 12 m. Nas áreas de cultivo (Campo Experimental da Embrapa Agrobiologia e Sistema Integrado de Produção Agroecológica-SIPA) a amostragem foi realizada nas entrelinhas. As sub-amostras foram acondicionadas em sacos de ráfia para o transporte até a Embrapa Agrobiologia. As coletas foram feitas em dois dias sendo um dia para as coletas das amostras de solo em Pinheiral e outro para as amostras em Seropédica. Após as de coleta, as sub-amostras de cada amostra de solo foram peneiradas e homogeneizadas e distribuídas sem adubação ou correção em vasos com capacidade para cinco kg de solo. Uma amostras composta de três sub-amostras de cada amostra de terra foi retirada para a análise dos parâmetros relacionados à fertilidade do solo (EMBRAPA, 1997), cujos resultados estão sumarizados na Tabela 6.

### 1.3.2- Características dos Genótipos de Guandu Utilizados

Foram utilizados três diferentes genótipos de Guandu: Aratã; Fava Larga e Carioca. Esses materiais foram indicados pelo Dr. José Guilherme Marinho Guerra, da Embrapa Agrobiologia. A cultivar de guandu anão Aratã (IAPAR 43-Aratã) foi desenvolvida a partir de genótipos de guandu anão introduzidos da Colômbia pela Embrapa Arroz e Feijão. É um genótipo com o ciclo entre 140 e 180 dias, plantas com altura de 1,0 a 1,5 m; com produção de grãos variando de 1000 a 2000 kg.ha<sup>-1</sup> (IAPAR, sem data). A cultivar Fava Larga foi resultante de seleção massal efetuada em diversos cultivares entre 1982 e 1985 realizada pelo IAC a partir de genótipos introduzidos desde 1953. Tem um ciclo de até 280 dias, com produtividade de sementes variando entre 1200 a 1800 kg.ha<sup>-1</sup> e fitomassa entre 8 e 12 Mg.ha<sup>-1</sup> e plantas com altura aproximada de 2 m (IAC, 2009). A cultivar Carioca foi uma cultivar recentemente desenvolvida pela UENF e suas características agrônômicas e fenológicas ainda não estão disponíveis (GUERRA, comunicação pessoal).



**Tabela 5.** Localização e caracterização das áreas onde foram coletadas as amostras de solo para a montagem do experimento.

<b>Solo</b>	<b>Localização</b>	<b>Município</b>	<b>Área</b>	<b>Descrição da área</b>
<b>Latossolo Amarelo (LA)</b>	S 22°32'21,1" W 44°00'54,4"	Pinheiral-RJ	Fazenda das Palmeiras. Propriedade do Sr. Claudio Fadul.	Terço superior de paisagem. Área de pastagem não manejada, com pastoreio intenso. Vegetação predominante: braquiaria.
<b>Argissolo Vermelho (PV)</b>	S 22°32'04,7" W 44°01'01,3"	Pinheiral-RJ	Fazenda das Palmeiras. Propriedade do Sr. Claudio Fadul.	Terço superior de paisagem. Área degradada com avançado grau de erosão e presença de voçorocas. Cobertura vegetal predominante: capim colônia e brachiaria.
<b>Argissolo Acinzentado (PAC)</b>	S 22°32'12,9" W 44°00'58,2"	Pinheiral-RJ	Fazenda das Palmeiras. Propriedade do Sr. Claudio Fadul.	Terço inferior de paisagem. Área de pastagem não manejada com solo muito arenoso e com grande ocupação por cupins. Vegetação predominante: brachiaria.
<b>Neossolo Flúvico (RU)</b>	S 22°31'27,2" W 43°59'22,7"	Pinheiral-RJ	Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia-RJ–Campus Nilo Peçanha.	Terço inferior de paisagem. Área situada as margens do Ribeirão Cachimbal. Vegetação predominante: Coqueiros e vegetação espontânea com abundância de gramíneas e ciperáceas.
<b>Argissolo Vermelho-Amarelo (PVA)</b>	S 22°45'14,3" W 43°40'24,4"	Seropédica-RJ	Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA)	Terço superior de paisagem. Área destinada a condução de experimentos com manejo convencional. Cobertura vegetal na coleta: milho.
<b>Planossolo Háptico (SX)</b>	S 22°45'11,4" W 43°40'22,8"	Seropédica-RJ	Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA)	Terço médio de paisagem. Área destinada a condução de experimentos com manejo orgânico. Cobertura vegetal na coleta: cana de açúcar.
<b>Argissolo Vermelho-Amarelo (PVA)</b>	S 22°44'50,8" W 43°40'14,9"	Seropédica-RJ	Campo Experimental da Embrapa Agrobiologia	Terço superior de paisagem. Área destinada a condução de experimentos com manejo convencional. Cobertura vegetal na coleta: milho.
<b>Planossolo Háptico (SX)</b>	S 22°44'56,2" W 43°40'00,4"	Seropédica-RJ	Campo Experimental da Embrapa Agrobiologia	Terço médio de paisagem. Área destinada a condução de experimentos com manejo convencional. Cobertura vegetal na coleta: cana de açúcar e vegetação espontânea.

**Tabela 6.** Características químicas de amostras do horizonte superficial de oito solos utilizados neste estudo

Solo	pH (H <sub>2</sub> O)	Al <sup>3+</sup>	Mg <sup>2+</sup> +Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	K <sup>+</sup>	P	MO*
		cmol <sub>c</sub> .dm <sup>-3</sup>					g. dm <sup>-3</sup>	
<b>Latossolo Amarelo</b>	5,9	0,0	5,6	1,0	4,5	200	0,065	20,7
<b>Argissolo Vermelho</b>	4,7	1,0	0,7	0,1	0,6	32	0,004	17,6
<b>Argissolo Acinzentado</b>	5,8	0,1	3,0	0,7	2,3	84	0,017	21,2
<b>Neossolo Flúvico</b>	4,9	1,3	1,2	0,3	0,9	130	0,005	25,9
<b>Argissolo Vermelho Amarelo (SIPA)</b>	6,4	0,0	6,4	1,1	5,3	108	0,009	17,1
<b>Planossolo Háptico (SIPA)</b>	5,6	0,1	2,5	0,4	2,1	49	0,003	11,4
<b>Argissolo Vermelho-Amarelo (CE**)</b>	4,8	0,3	2,0	0,4	1,5	79	0,001	15,5
<b>Planossolo Háptico (CE**)</b>	6,3	0	1,8	0,3	1,5	16	0,001	4,1

\* MO= Matéria Orgânica

\*\*CE= Campo Experimental

### 1.3.3–Montagem, Condução e Coleta do Experimento para Obtenção dos Isolados Bacterianos

O experimento foi montado e conduzido nas dependências da Embrapa Agrobiologia. Foram semeadas 10 sementes por vaso, sendo desbastadas para apenas uma planta por vaso aos 20 dias após a emergência. O experimento foi conduzido ao ar livre com os vasos enterrados. As plantas receberam água sem limitações. A coleta foi realizada aos 75 dias após a emergência (DAE). O experimento foi montado em um esquema fatorial 3 (cultivares) x 8 (solos) com três repetições. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso e os parâmetros analisados foram o número de nódulos. Após a contagem os nódulos foram acondicionados em recipientes com sílica gel com a finalidade de desidratá-los para o subsequente isolamento das bactérias.

### 1.3.4-Análise de Dados Experimento

As análises estatísticas utilizadas foram a análise de variância seguida pela comparação das médias utilizando o teste Tukey ao nível de significância de 5%, além da correlação linear simples entre dos parâmetros da nodulação com os parâmetros avaliados na análise de fertilidade do solo. O software utilizado para a realização das análises foi o SAEG<sup>®</sup> (Universidade Federal de Viçosa), com exceção da análise da correlação linear que foi realizada no aplicativo Excel<sup>®</sup>, do Microsoft Office 2007.

### 1.3.5–Isolamento, Purificação e Caracterização Cultural dos Isolados Bacterianos

Após a coleta do experimento, cinco nódulos de cada planta foram escolhidos aleatoriamente e plaqueados. Os nódulos foram imersos em álcool comercial por 30 segundos, para quebrar a tensão superficial e posteriormente imersos em peróxido de hidrogênio (30% v:v) por 3 minutos para a desinfestação superficial, seguido de dez lavagens em água destilada estéril (VINCENT, 1970).

Os nódulos foram esmagados com o auxílio de uma pinça flambada e o material foi em seguida colocado em placas de Petri contendo meio de cultura YMA<sup>3</sup> com vermelho Congo (VINCENT, 1970). As placas foram incubadas por 7 dias em estufa a 28°C e os

<sup>3</sup> Composição do meio (em g.L<sup>-1</sup>) YMA: KH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>=0,4; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>=0,1; MgSO<sub>4</sub>=0,2; NaCl=0,1; Extrato de levedura=0,4; Manitol=10; Ágar=15. Azul de bromotimol como indicador e pH entre 6,8 e 7,0.

isolados foram repicados para placas de Petri contendo o meio YMA com azul de bromotimol como indicador. Os isolados que apresentaram contaminantes após a repicagem foram novamente repicados até a purificação.

Foram avaliadas os seguintes parâmetros para a caracterização cultural dos isolados, seguindo as recomendações de Vincent (1970) e Martins et al. (1997).

**a) Tempo de crescimento:** foram considerados isolados de crescimento muito rápido as bactérias que apresentaram colônias isoladas após um tempo de incubação de até três dias. Os isolados que apresentaram colônias isoladas em período de incubação entre quatro e cinco dias foram considerados intermediários e os isolados que apresentaram colônias isoladas quando incubados entre seis e 10 dias de incubação foram considerados lentos.

**b) Alteração do pH do meio:** os isolados foram classificados de acordo com a reação de pH do meio YMA. Crescimento de reação ácida, de neutra ou alcalina, de acordo com a alteração de pH observada no meio de cultura contendo azul de bromotimol como indicador de pH.

**c) Produção de muco:** os isolados foram caracterizados de acordo com a quantidade e muco produzido na cultura em placas de Petri, sendo distribuídos em quatro classes de acordo com a produção abundante, mediana e pouca produção de muco.

**d) Aparência do muco:** o muco produzido pelos isolados foi classificado como homogêneo ou heterogêneo, de acordo com a sua aparência na placa.

**e) Elasticidade e aderência do muco ao meio de cultura:** o muco foi classificado como aderente ou não aderente ao meio de cultura e a elasticidade do muco foi classificada como presença e ausência de elasticidade de acordo com a formação ou não de um fio ao se puxar a massa bacteriana com uma alça de platina.

**f) Forma da colônia:** as colônias foram caracterizadas de acordo com a sua elevação (plana ou convexa), sua cor (branca, amarela, outra) e de acordo com a aparência da borda da colônia (lisa ou irregular). Além dessas características, foi avaliada a homogeneidade da colônia, observando-se a homogeneidade ou heterogeneidade entre o núcleo e a borda da colônia.

Cinco estirpes de rizóbio foram usadas na comparação com as bactérias isoladas, são elas BR5410 (*Allorhizobium caulinodulans*), BR 29 (*Bradyrhizobium elkanii*), BR 521 (*Mesorhizobium ciceri*), BR 322 (*Rhizobium tropici*), BR 112 (*Sinorhizobium fredii*). Estas estirpes foram obtidas da coleção de culturas de bactérias diazotróficas da Embrapa Agrobiologia, cedidas gentilmente pela curadora Rosa Pitard.

### 1.3.6–Agrupamento Morfológico dos Isolados e Cálculo dos Índices Ecológicos

A partir da caracterização morfológica dos isolados, foi construída a matriz binária (presença e ausência da característica) no aplicativo Excel<sup>®</sup> do Office 2003. Esta matriz foi importada pelo software NTSyS<sup>®</sup> para a construção da matriz de similaridade utilizando-se o coeficiente de Jaccard (JACCARD, 1908, *apud*; ROHLF, 1994). A partir desta matriz foram construídos os dendrogramas através do mesmo software, utilizando o algoritmo UPGMA (unweighted pair-group method) (ROHLF, 1994).

A partir dos dendrogramas gerados foram determinados os grupos morfológicos que melhor representaram a coleção. A partir destes grupos foram calculados os índices de diversidade de Shannon-Weaver, o índice de dominância de Simpson (ODUM, 1988; PINTO-COELHO, 2000) e o índice de riqueza de Margaleff (ODUM, 1988).

### **1.3.7–Avaliação da Capacidade de Isolados Bacterianos em Crescer em Meio de Cultura YMA Suplementados com Diferentes Fontes de Carbono, Concentrações de NaCl; Elevadas Temperaturas e com Concentrações Distintas de Antibióticos**

Representantes de grupos de isolados bacterianos (160) obtidos a partir da caracterização cultural foram avaliados com relação à sua capacidade de crescer em meio de cultura YMA modificado a partir da substituição de diferentes fontes de carbono, alteração na concentração de cloreto de sódio, e resistência à antibióticos. Estes isolados foram ainda avaliados de acordo com a sua capacidade de crescer em meio de cultura YMA original, incubados em diferentes temperaturas. Para estes testes, os isolados bacterianos foram crescidos previamente em meio YM líquido (meio YMA sem o ágar) sob agitação constante de 160 rotações por minuto em um agitador orbital pelo tempo de crescimento de cada um dos isolados, para posterior inoculação nos respectivos meios de cultura. O detalhamento destes testes estão descritos a seguir.

#### **1.3.7.1-Fontes de carbono**

O meio de cultura YMA foi modificado com a adição de glicose, sacarose, frutose, maltose, lactose xilose e ácido málico em substituição ao manitol como fonte de carbono para o meio de cultura na concentração de 1% (p/v). As bactérias foram estriadas nas placas de Petri e incubadas a 28° C pelo período de crescimento de cada isolado. O crescimento foi avaliado como positivo (visível) ou negativo (não visível).

#### **1.3.7.2-Concentrações de NaCl**

O meio de cultura YMA foi modificado com a adição de 0,5; 1; 2 e 3 % de NaCl. As bactérias foram riscadas nas placas de Petri e incubadas a 28°C pelo período de crescimento de cada isolado. O crescimento foi avaliado como positivo (visível) ou negativo (não visível).

#### **1.3.7.3-Incubação em diferentes temperaturas.**

As bactérias foram riscadas em placas de Petri contendo meio de cultura YMA. As placas foram incubadas em estufa a 28; 32; 37 e 42°C pelo tempo de crescimento ideal para cada um dos isolados. O crescimento foi avaliado como positivo (visível) ou negativo (não visível).

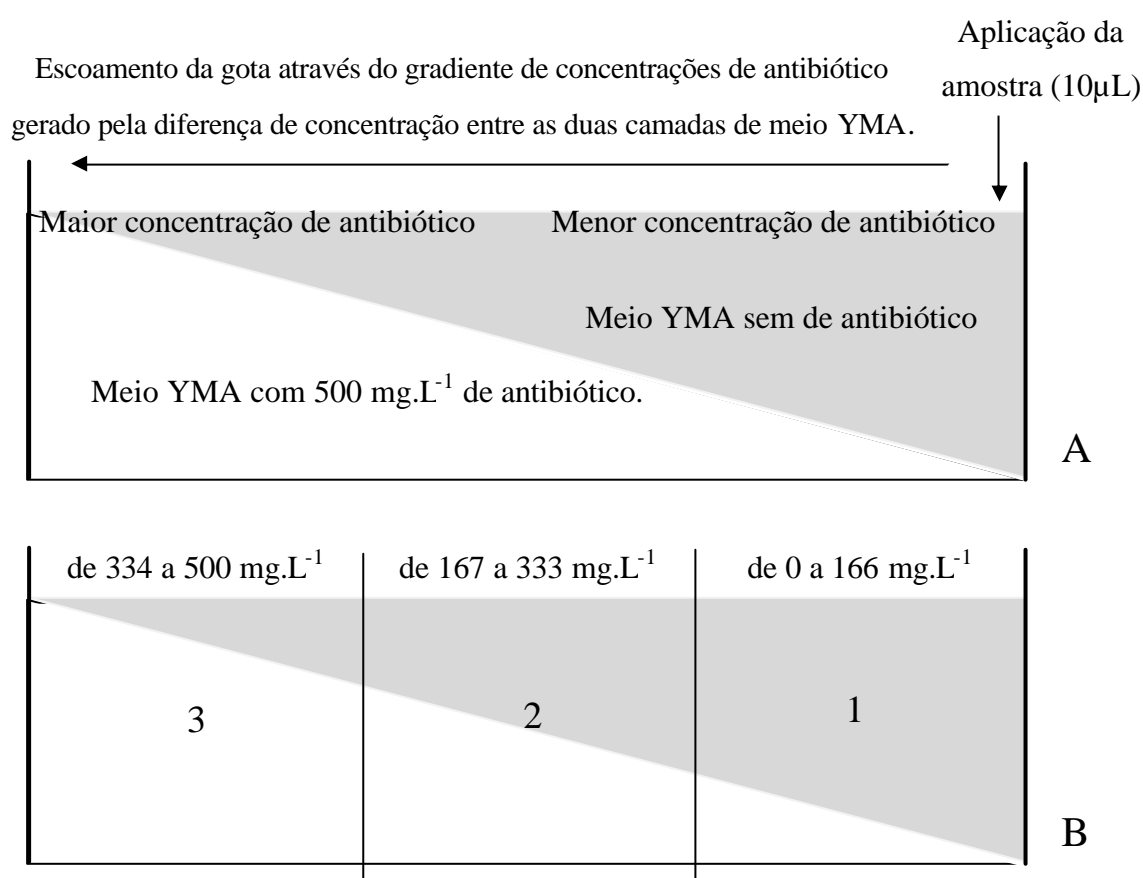
#### **1.3.7.4- Resistência intrínseca a antibióticos**

A avaliação da resistência intrínseca a antibióticos foi avaliada através do método de gradiente de concentração em placas de Petri (BROMFIELD et al., 1982, modificado por XAVIER et al., 1998). O meio de cultura YMA foi preparado utilizando ágar nobre que tem ponto de fusão inferior ao ágar bacteriológico comum. O meio foi fundido e adicionado de uma solução com 500mg.L<sup>-1</sup> de canamicina; cloranfenicol, ampicilina ou estreptomicina, e vertido em placas de Petri de plástico com diâmetro de 9 cm deixadas ligeiramente inclinadas para a solidificação do meio. Após esta etapa, o meio de cultura sem antibiótico foi vertido sobre esta camada, formando gradiente de concentração onde na região com maior concentração de antibiótico apresenta maior quantidade de meio de cultura vertido na primeira camada e está diametralmente oposta a parte da placa com menor concentração de antibiótico (Figura 3). Uma alíquota (10 µL) de pré-inóculo crescido foi aplicada na parte com menor concentração de antibiótico e escoado até a outra extremidade com maior concentração de antibióticos, conforme metodologia proposta por Bromfield (1982), modificada por Xavier et al. (1998) (Figura 3). A resistência intrínseca foi avaliada de acordo com o tamanho (cm) do crescimento bacteriano através do escoamento da gota de inóculo, sendo atribuído escores de acordo com o nível de tolerância do isolado bacteriano aos antibióticos, avaliado através do crescimento bacteriano nas regiões com concentrações de

antibiótico entre zero e 166 mg.L<sup>-1</sup> (nível de tolerância=1), entre 167 e 332 mg.L<sup>-1</sup> (nível de tolerância =2) e entre 333 e 500 mg.L<sup>-1</sup> (nível de tolerância=3) (Figura 3).

### 1.3.7.5-Avaliação dos resultados

Todos os testes foram realizados em delineamento inteiramente casualizado, com 3 repetições. Os dendrogramas de similaridade das avaliações de resistência a antibióticos, tolerância a temperaturas, salinidade e capacidade de metabolizar diferentes fontes de carbono, não foi possível ser feito pelo software NTSyS devido à formação de diversas politomias, com dados de natureza qualitativa e quantitativa. Esses dendrogramas foram gerados através do programa PaSt (HAMMER et al., 2001). Para a avaliação da resistência intrínseca a antibióticos foi ainda realizada a análise de componentes principais relacionando o padrão de resistência a cada um dos antibióticos testados e as características da análise de solo. Esta análise também foi realizada com o programa PaSt.



**Figura 3.** Placa de Petri com duas camadas de meio de cultura para a formação do gradiente de concentração de antibiótico, através da difusão de antibiótico entre as duas camadas de meio YMA (BROMFIELD et al. 1982, modificado por XAVIER et al., 1998) (A) e divisão da placa de Petri nas três seções onde foram atribuídos escores de acordo com a capacidade dos isolados em crescer nas regiões com diferentes concentrações de antibióticos, sendo atribuído escore 1 para os isolados que cresceram apenas na primeira secção (menor concentração de antibiótico), 2 para os isolados que cresceram nas seções 1 e 2 (concentração mediana de antibiótico) e 3 para os isolados que foram capazes de crescer nas três secções da placa (maior concentração de antibiótico) (B).

### **1.3.8–Avaliação do Polimorfismo de Restrição do 16S rDNA de Isolados Bacterianos Seleccionados.**

#### **1.3.8.1-Extração de DNA**

De acordo com os resultados obtidos do dendrograma com as características culturais dos isolados, foram selecionados 17 isolados capazes de formar nódulos para a caracterização do perfil de restrição de DNA pela técnica de Análise de Restrição de DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA).

Para a comparação e a realização do agrupamento, foram utilizadas 19 espécies de bactérias diazotróficas obtidas do banco de coleção de bactérias diazotróficas da Embrapa Agrobiologia, sendo: BR 525 (*Sinorhizobium medicae*), BR 7411(*Sinorhizobium meliloti*), BR 522 (*Mesorhizobium mediterraneum*), BR 527 (*Sinorhizobium. terangeae*), BR 526 (*Sinorhizobium sahelii*), BR 112 (*Sinorhizobium fredii*), BR 113(*Bradyrhizobium elkanii*), BR 114 (*Bradyrhizobium japonicum*), BR 521 (*Mesorhizobium ciceri*), BR523 (*Mesorhizobium. tianshanense*), BR 524 (*Mesorhizobium. huakuii*), BR 10016 (*Rhizobium tropici II*), BR 529 (*Rhizobium giardini*), BR 10026 (*Rhizobium etli*), BR 10052 (*Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*), BR 7606 (*Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*), BR 528 (*Rhizobium gallicum*), BR 5401 (*Azospirillum doberanae*), BR 5410 (*Azorhizobium caulinodans*) e BR 2006 (*Methylobacterium nodulans*). O DNA extraído foi submetido à eletroforese (100 V; 30 min.) em gel de agarose (1%), corado com brometo de etídio (10 ppm), um corante fluorescente que se intercala entre as bases do DNA e, sob radiação ultravioleta permite a visualização do DNA.

#### **1.3.8.2-Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

A reação de PCR foi dimensionada para volume final de 35 µL contendo tampão de reação 1X, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, *Taq* DNA polimerase 1,75U (Invitrogen cat. N° 11615-010), BSA 0,3µg/µL, dNTP 250 µM e 0,2 µM de cada iniciador. Os iniciadores utilizados foram 27F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'ACGG(CT)TACCTTGTTACGACTT3') que amplificam todo o gene 16 S rDNA a partir da posição 27 (27F-“forward”) até a posição 1492 totalizando 1,46 kb de *E. coli*. (SUZUKI e GIOVANNONI, 1996). A amplificação consistiu em uma etapa de desnaturação inicial de 93° C por 5 min seguidos de 35 ciclos de 93°C por 1 min, 62°C por 1 min e 72°C por 2 min e extensão final a 72°C por 10 min (LEITE et al., 2009)

#### **1.3.8.3-Análise de restrição**

A análise de restrição procedeu-se utilizando as endonucleases de restrição *Dde* I, *Msp* I e *Hinf* I, utilizando 5µL de DNA amplificado seguindo as orientações do fabricante. O DNA digerido foi analisado em gel horizontal a 3% de agarose em tampão TBE 0,5% por 3 horas a voltagem constante de 75 V onde se utilizou nas laterais do gel o marcador de peso molecular ? X174 (Invitrogen cat. N° 10488-037). Os fragmentos do DNA digeridos foram analisados pelo programa Gel Compar 2.0 (*Applied Maths*, Bélgica) baseado no coeficiente de Jaccard e o método de agrupamento UPGMA para a construção do dendrograma de similaridade.

### **1.3.9-Experimentos em Condições de Casa de Vegetação**

Foram realizados experimentos em condições de casa de vegetação com o intuito de verificar a capacidade das bactérias isoladas em nodular o guandu, segundo os princípios do postulado de Kock, aplicado à rizobiologia. Os testes de nodulação foram conduzidos em 4 etapas sendo a primeira implantada em janeiro e a última em setembro de 2009. Em cada uma dessas etapas foram avaliados 80 isolados bacterianos, com exceção as última onde foram avaliados 66 isolados. Foram utilizados vasos de Leonard modificados e autoclavados, tendo



como substrato areia e vermiculita na proporção de 2:1 (v:v) (VINCENT, 1970). As sementes foram desinfestadas com Peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$  30% p.a.) por três minutos e lavadas 10 vezes seguidas em água destilada estéril (VINCENT, 1970). Foram plantadas quatro sementes em cada vaso e de 7 a 12 DAE foram desbastadas deixando uma planta por vaso.

O cultivar utilizado para todos os experimentos de inoculação foi o cultivar Aratã, devido ao seu ciclo mais curto. Os tratamentos consistiram da inoculação dos isolados bacterianos, um controle absoluto sem qualquer fonte de nitrogênio e dois controles positivos com a inoculação das estirpes BR 2003 e BR 2801, recomendadas para a cultura do guandu. As plantas receberam água autoclavada conforme necessário e após a inoculação das bactérias solução nutritiva isenta de nitrogênio (NORRIS e T'MANNETJE, 1964). As plantas foram colhidas entre 62 e 75 DAE. Os parâmetros avaliados foram massa da parte aérea seca (MPAS); massa da raiz seca (MRS) massa de nódulos secos (MNS) e massa total seca (MTS= MPAS+ MRS+ MNS). O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso em duplicata. Os dados foram analisados através do programa SAEG<sup>®</sup> (Universidade Federal de Viçosa), procedendo-se os testes de distribuição normal dos erros, homogeneidade de variâncias e a análise de variância com o teste Skot-Knot de comparação de médias ao nível de 5% de significância. Os isolados que se destacaram na nodulação e/ou na produção de matéria seca foram avaliados em um teste subsequente de capacidade simbiótica.

A avaliação da capacidade simbiótica foi conduzida nas mesmas condições descritas acima, salvo a coleta das plantas que ocorreu aos 50 DAE e o delineamento experimental que foi em blocos ao acaso com quatro repetições. Os tratamentos consistiram na inoculação dos isolados pré-selecionados (13), a inoculação com as bactérias recomendadas (BR2801 e BR 2003), uma testemunha absoluta sem qualquer fonte de nitrogênio e uma testemunha nitrogenada, que recebeu 100 mg de nitrogênio por semana na forma de nitrato de amônia ( $NH_4NO_3$ ).

## 1.4–RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1.4.1–Nodulação de Guandu Cultivados em Vasos com Amostras dos Horizontes Superficiais dos Diferentes Solos

As cultivares de guandu apresentaram nodulação diferenciada nos solos e em diferentes cultivares. Houve interação significativa entre o tipo de solo e as cultivares utilizadas, conforme pode ser observado no quadro de análise de variância (Tabela 7).

**Tabela 7.** Quadro da análise de variância para o parâmetro número de nódulos

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	Significância
<b>Bloco</b>	2	8641	4321	8275,95	0,000
<b>Solo</b>	7	$9,01 \times 10^7$	$1,29 \times 10^7$	3,06	0,057
<b>Cultivar</b>	2	$2,57 \times 10^7$	$1,29 \times 10^7$	9112,33	0,000
<b>Solo*Cultivar</b>	14	$1,76 \times 10^8$	$1,26 \times 10^7$	9099,89	0,000
<b>Resíduo</b>	46	64983	1413	8921,90	0,000

Comparando a nodulação entre as cultivares, o genótipo Aratã apresentou maior nodulação do que as cultivares Carioca e Fava-Larga nos em todos os solos com exceção do Neossolo Flúvico e do Planossolo do SIPA. Nestes solos a cultivar que apresentou maior nodulação foi a cultivar Fava-Larga (Tabela 8). Comparando-se os solos em relação a formação de nódulos em todas as cultivares, as plantas cultivadas em vasos contendo amostras do Latossolo Amarelo foram as que apresentaram maior nodulação.

Os solos que apresentaram maiores valores para os parâmetros saturação por bases, matéria orgânica e fósforo, considerados como solos de melhor fertilidade foram o Argissolo do SIPA e o Latossolo Amarelo, enquanto os solos com menores valores para esses parâmetros, considerados como o solos de pior fertilidade foram o Argissolo Vermelho e o Neossolo Flúvico, devido à elevadas concentrações de alumínio trocável, baixo pH e baixas concentrações de fósforo (Tabela 6). Foi possível observar que nos solos com melhores parâmetros de fertilidade do solo, a nodulação o guandu foi maior, se comparada com os solos com menores concentrações de nutrientes e maiores concentrações de alumínio trocável (Tabela 8), demonstrando haver forte interação entre as características químicas do solo e a nodulação de leguminosas, mesmo consideradas rústicas como o guandu.

Para a cultivar Fava-Larga, plantas crescidas no Planossolo do terraço apresentaram nodulação menor que aquelas crescidas no Latossolo Amarelo, sendo porém maior que os demais solos (Tabela 8). A cultivar Carioca apresentou igualdade estatística na nodulação das plantas crescidas nos solos das áreas experimentais (SIPA e Campo Experimental) e no Argissolo Acinzentado, sendo este grupo estatisticamente superior ao Neossolo Flúvico e ao Argissolo Vermelho (Tabela 8). A cultivar Aratã foi a que apresentou maior estratificação com relação ao ranqueamento gerado pelo teste de agrupamento de médias Skot-Knot, onde as plantas crescidas em vasos com o Latossolo Amarelo apresentaram maior nodulação, seguido das plantas cultivadas no Argissolo Acinzentado e no Argissolo do terraço, Planossolo do SIPA e Planossolo do Campo Experimental, Argissolo do SIPA, Argissolo Vermelho e por último o Neossolo Flúvico (Tabela 8). Todos os cultivares estudados apresentaram maior nodulação no Latossolo Amarelo (Tabela 8).

Esses resultados sugerem que o uso de inoculantes inespecíficos e com bactérias que apresentem baixa capacidade competitiva podem não alcançar os resultados almejados para a

nodulação, fixação de nitrogênio e produtividade da cultura em diferentes localidades. Os resultados ainda sugerem que a população de rizóbios capazes de nodular o guandu é diferente nos solos estudados, sendo maior no Latossolo Amarelo e menor no Neossolo Flúvico.

Diferentes genótipos de leguminosas podem apresentar nodulação diferenciada tanto em condição de inoculação como em condição de nodulação espontânea. Borges et al. (2007) observaram que diferentes acessos de amendoim apresentaram nodulação e FBN diferenciada em dois solos (Argissolo e Planossolo) havendo ainda diferença na nodulação entre os acessos em um mesmo solo. Resultados similares puderam ser observados quando comparadas as cultivares de soja capazes de nodular com rizóbios nativos de solos da Nigéria (NANGJU, 1980; OKEREKE e ANAEGBU, 1992). Cultivares brasileiros de soja também apresentam diferente capacidade de nodular com estirpes de rizóbio, em condição de inoculação em campo (NICOLÁS et al., 2002).

Leguminosas com capacidade de formar nódulos com uma grande diversidade de espécies de rizóbio, como o feijão-comum e o feijão-caupi podem apresentar influência do genótipo vegetal na formação de nódulos, em condições de inoculação ou sem inoculação (VARGAS e GRAHAM, 1989; CHAVERRA e GRAHAM, 1992; XAVIER et al., 2006; XAVIER et al., 2007b; LEITE et al., 2009).

Assim como o feijão comum e feijão-caupi, o guandu é considerado como uma leguminosa promíscua, ou seja, apresentando a capacidade de formar nódulos com uma gama muito grande de bactérias. Porém, diferentes cultivares de guandu podem apresentar diferenças na nodulação quando inoculadas com diferentes estirpes de bactérias nodulíferas (VALARINI e GODOY, 1994) ou quando cultivadas em diferentes tipos de solos (HERRIDGE e HOLLAND, 1992, NUNES et al, 2009). Além de se associar aos rizóbios, diferentes cultivares de guandu podem ainda se associar com diferentes bactérias rizosféricas solubilizadoras de fósforo (SOUCHIE e ABOUD, 2007). As cultivares de guandu utilizadas no presente estudo são de origens diferentes.

A cultivar Fava-Larga, foi desenvolvido pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), a cultivar Aratã de guandu anão, foi desenvolvida pelo Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) e a cultivar Carioca foi desenvolvida recentemente pela Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF). Estas cultivares são resultados de experimentos de melhoramento e seleção de cultivares em condições ambientais distintas e apresentam características genéticas distintas, o que pode influenciar na capacidade de estabelecer associações com uma gama diferenciada de estirpes de rizóbio, apesar de não se ter informações se esta seleção foi realizada sob condições limitantes de nitrogênio.

A avaliação da correlação linear simples entre os parâmetros da fertilidade do solo e a formação de nódulos nas cultivares de guandu está apresentada na Tabela 9. Dentre os parâmetros da fertilidade do solo, o percentual de matéria orgânica foi o menos informativo nas três cultivares, não apresentando correlações muito altas com a nodulação. Os teores de  $Mg^{2+}$ ;  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}+Ca^{2+}$  foram aqueles que apresentaram maior correlação positiva com o número de nódulos.

**Tabela 8.** Número de nódulos das cultivares de guandu Aratã, Fava-Larga e Carioca, cultivadas em vasos contendo amostras de terra do horizonte superficial de oito solos diferentes.

Solo	Número de nódulos. planta <sup>-1</sup> (Por cultivar)			Média geral
	Aratã	Fava Larga	Carioca	
<b>Latossolo Amarelo</b>	290 aA*	201 aB	174 aC	222a
<b>Argissolo Vermelho</b>	26 eA	3 cB	8 cB	12d
<b>Argissolo Acinzentado</b>	117 bA	75 cB	69 bC	87b
<b>Neossolo Flúvico</b>	5 fB	27 cA	2 cB	11d
<b>Argissolo Vermelho-Amarelo (SIPA)</b>	59 dA	-	48 bB	54c
<b>Planossolo Háptico (SIPA)</b>	94 cB	119 bA	92 bB	102b
<b>Argissolo Vermelho-Amarelo (Campo Experimental)</b>	118 bA	50 cB	41 bC	70b
<b>Planossolo Háptico (Campo Experimental)</b>	79 cA	43 Cc	66 bB	63c
<b>Média geral</b>	99A	74A	63A	

**Tabela 9.** Correlação linear simples (r) entre o número de nódulos e os parâmetros da fertilidade do solo

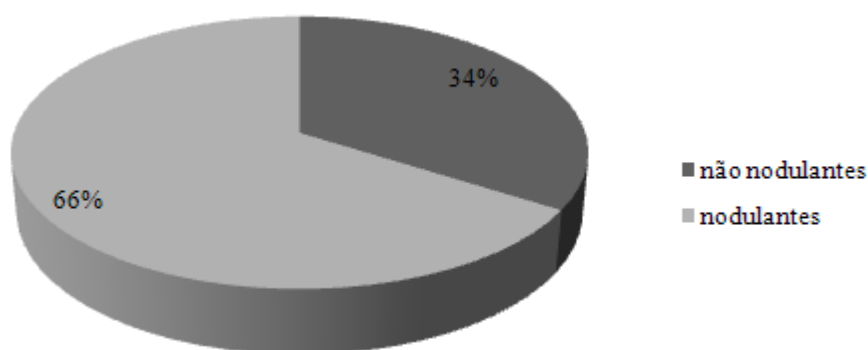
	pH	Al <sup>3+</sup>	Mg <sup>2+</sup> +Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	P	K <sup>+</sup>	MO
<b>Aratã</b>	0,32	-0,60	0,56	0,58	0,54	0,44	0,61	0,04
<b>Fava Larga</b>	0,53	-0,63	0,96	0,88	0,97	0,98	0,66	0,07
<b>Carioca</b>	0,53	-0,70	0,61	0,59	0,60	0,52	0,51	-0,12

O parâmetro Al<sup>3+</sup>, foi o que apresentou maior correlação negativa com o número de nódulos nas três cultivares. A cultivar Fava-Larga foi a cultivar que apresentou correlação positiva muito elevada entre a concentração de fósforo, cálcio e magnésio no solo e o número de nódulos, o que indica que esta cultivar apresenta dependência desses nutrientes para a nodulação. As cultivares Cariosa e Aratã não apresentaram alta correlação entre esses nutrientes e a nodulação, indicando serem menos dependentes da disponibilidade deste elemento para a formação de nódulos com as bactérias nativas. Esses resultados sugerem os genótipos Cariosa e Aratã devem apresentar associação com micorrizas ou com bactérias solubilizadoras de fosfato (SOUZIE e ABOUUD, 2007).

A concentração de alumínio trocável influencia na capacidade de leguminosas em estabelecer associações com estirpes de rizóbio. Aarons e Graham (1989) observaram a influência de pequenas concentrações de alumínio trocável na formação de nódulos em feijão comum. Algumas leguminosas como a forrageira *Trifolium repens* podem ainda apresentar redução da quantidade de pêlos radiculares quando crescida em substrato com concentrações elevadas de Al<sup>3+</sup>, reduzindo a concentração dos sítios de infecção das plantas pelos rizóbios (WOOD et al., 1988).

#### 1.4.2 – Testes de Nodulação

A avaliação da capacidade de nodulação dos isolados permitiu avaliar que 34% (104 isolados) das bactérias foram incapazes de nodular novamente a planta hospedeira, enquanto 66% (202 isolados) foi capaz de induzir a formação de nódulos (Figura 3). A incapacidade de formar nódulos por isolados bacterianos de leguminosa já foi descrita em diversos trabalhos. Principalmente para as bactérias de crescimento rápido, é comum observar a perda da capacidade de induzir a formação de nódulos devido a fatores como a perda de plasmídeos contendo os genes simbióticos (GARCIA DE LOS SANTOS et al., 1996). Sprent (2008) ressalta ainda que as simbioses ineficientes são abundantes na natureza, principalmente nos trópicos.



**Figura 4.** Percentual dos isolados nodulantes e não nodulantes em guandu.

Avaliando a capacidade de nodular de 240 isolados bacterianos de três espécies de mucuna, Lima (2009) verificou que 30% dos isolados não foram capazes de induzir a formação dos nódulos. Recentemente algumas espécies novas tem sido descritas a partir do isolamento de bactérias de nódulos, mesmo sem a capacidade de induzir a formação dos nódulos, como é o exemplo de *Cohnellia phaseoli*, isolada de nódulos de *Phaseolus coccineus* na Espanha (GARCIA-FRAILE et al., 2008) e de *Labrys neptunieae* isolada de nódulos da leguminosa aquática *Neptunia natans* em Taiwan (CHOU et al., 2007). Muresu et al. (2008) sugerem que estas bactérias podem desempenhar algum papel importante como a produção de reguladores de crescimento vegetal quando estão presentes dentro dos nódulos.

#### **1.4.3–Caracterização Cultural dos Isolados Bacterianos**

De um total de aproximadamente 310 nódulos pressionados em placas de Petri, um total de 306 foi caracterizado. Os demais isolados não cresceram no meio de cultura onde os nódulos foram pressionados.

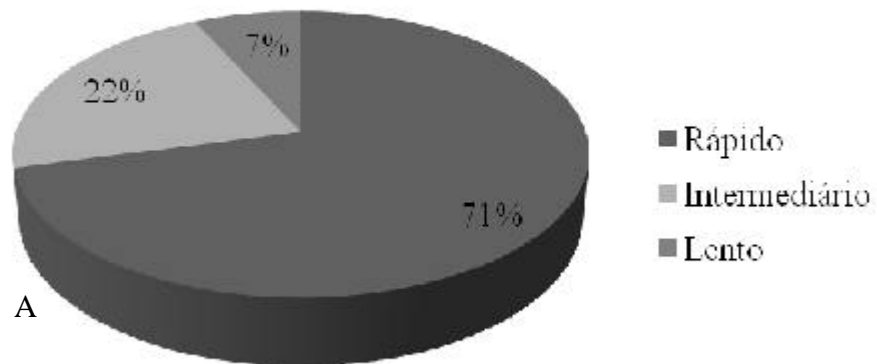
Com relação à alteração do pH do meio, a maioria dos isolados (59%) apresentou reação de pH ácida, enquanto os isolados de que apresentaram reação de pH alcalina ou neutra apresentaram um quantitativo de 25 e 16% respectivamente (Figura 5). O tempo de aparecimento das colônias dos isolados foi predominantemente rápido (71%), seguido de crescimento intermediário (22%) e de crescimento lento (7%) (Figura 5).

Na comparação entre os solos à proporção de isolados que apresentaram reação ácida durante o crescimento foi maior em todos os solos estudados, com exceção do solo Argissolo Acinzentado, onde a maior parte dos isolados apresentou reação neutra (Figura 5). Os solos que apresentaram maiores proporções para os isolados de crescimento alcalino foram os Argissolos Vermelho-Amarelo do Campo Experimental e do SIPA, com 32 e 31% dos isolados respectivamente (Figura 6).

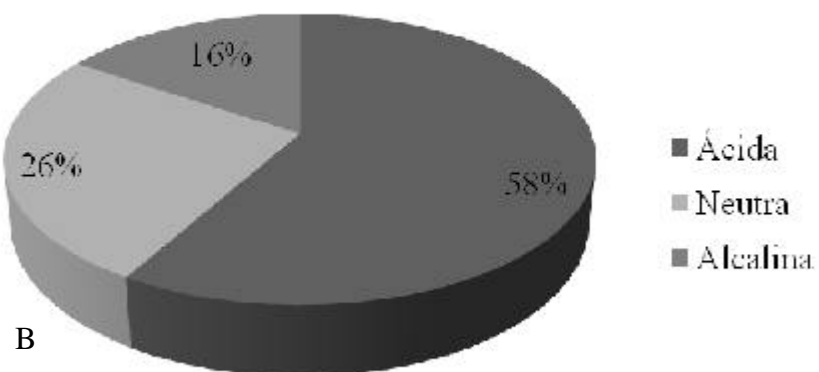
Com relação ao tempo de crescimento, todos os solos apresentaram a maioria dos isolados de crescimento rápido, com destaque para o Neossolo Flúvico e para o Argissolo Vermelho-Amarelo do terraço, com 89 e 83% dos isolados apresentando esta característica cultural (Figura 5). Os solos com maiores proporções de isolados com crescimento lento foram o Argissolo Vermelho-Amarelo do SIPA (16%) e o Latossolo Amarelo (15%). Vale ressaltar ainda, que não foram isolados rizóbios de crescimento lento dos nódulos oriundos de plantas crescidas no Neossolo Flúvico. Os rizóbios de crescimento intermediário foram isolados em maiores proporções de nódulos de plantas crescidas no Latossolo Amarelo (31%), Argissolo Acinzentado (30%) e no Planossolo Háptico do Campo Experimental (29%) (Figura 6). A comparação entre cultivares também permitiu avaliar que todos os três cultivares apresentaram maior número de isolados de reação ácida, com um percentual de 68% para a cultivar Fava Larga, 52% para o cultivar Carioca e 54% para o cultivar Aratã (Figura 7).

Com relação ao tempo de crescimento em meio de cultura, todos os cultivares apresentaram predominantemente rizóbios de crescimento rápido, sendo 75% para o cultivar Fava Larga, 70% para o cultivar Carioca e 67% para o cultivar de guandu anão Aratã (Figura 7).

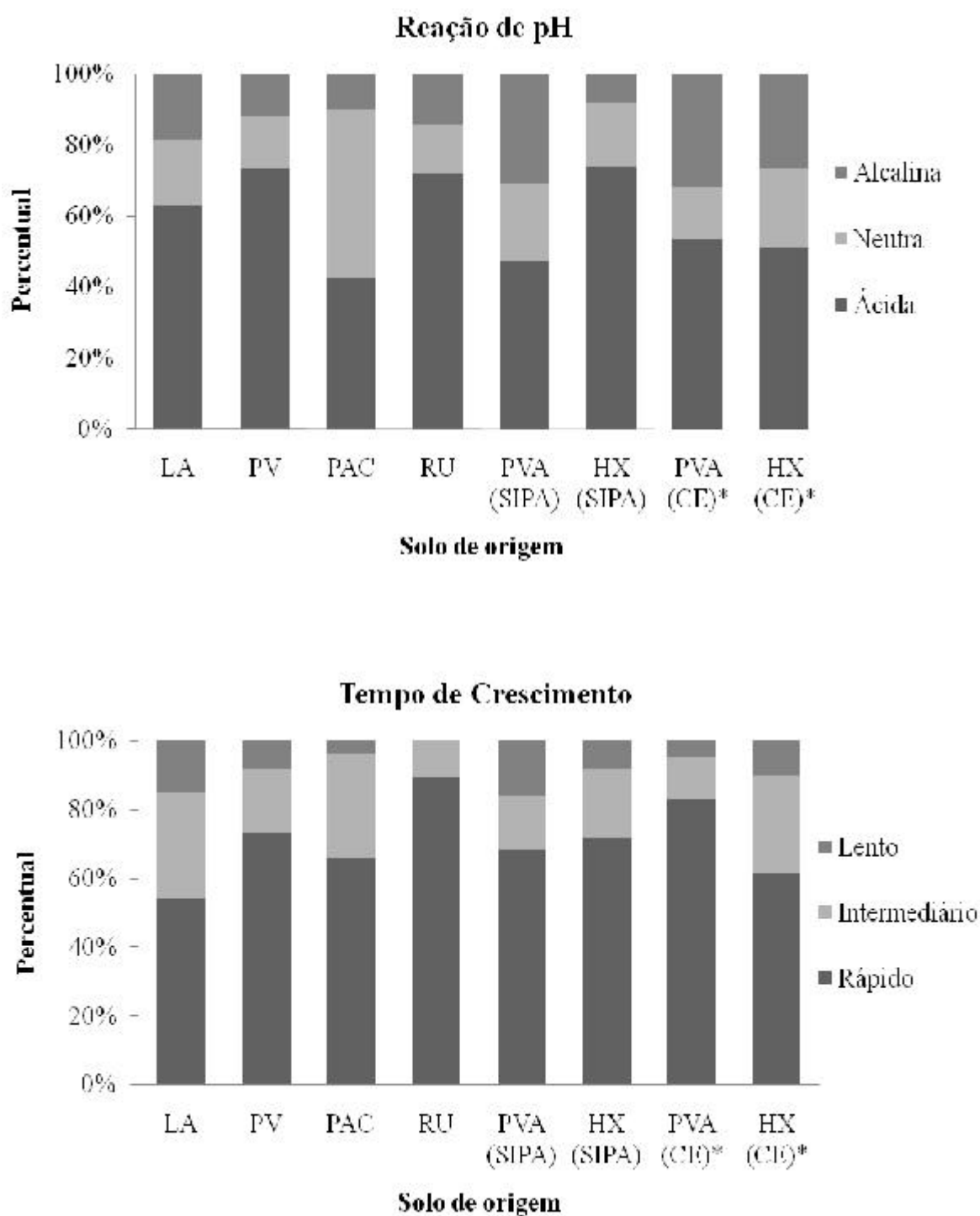
### Tempo de crescimento



### Reação de pH

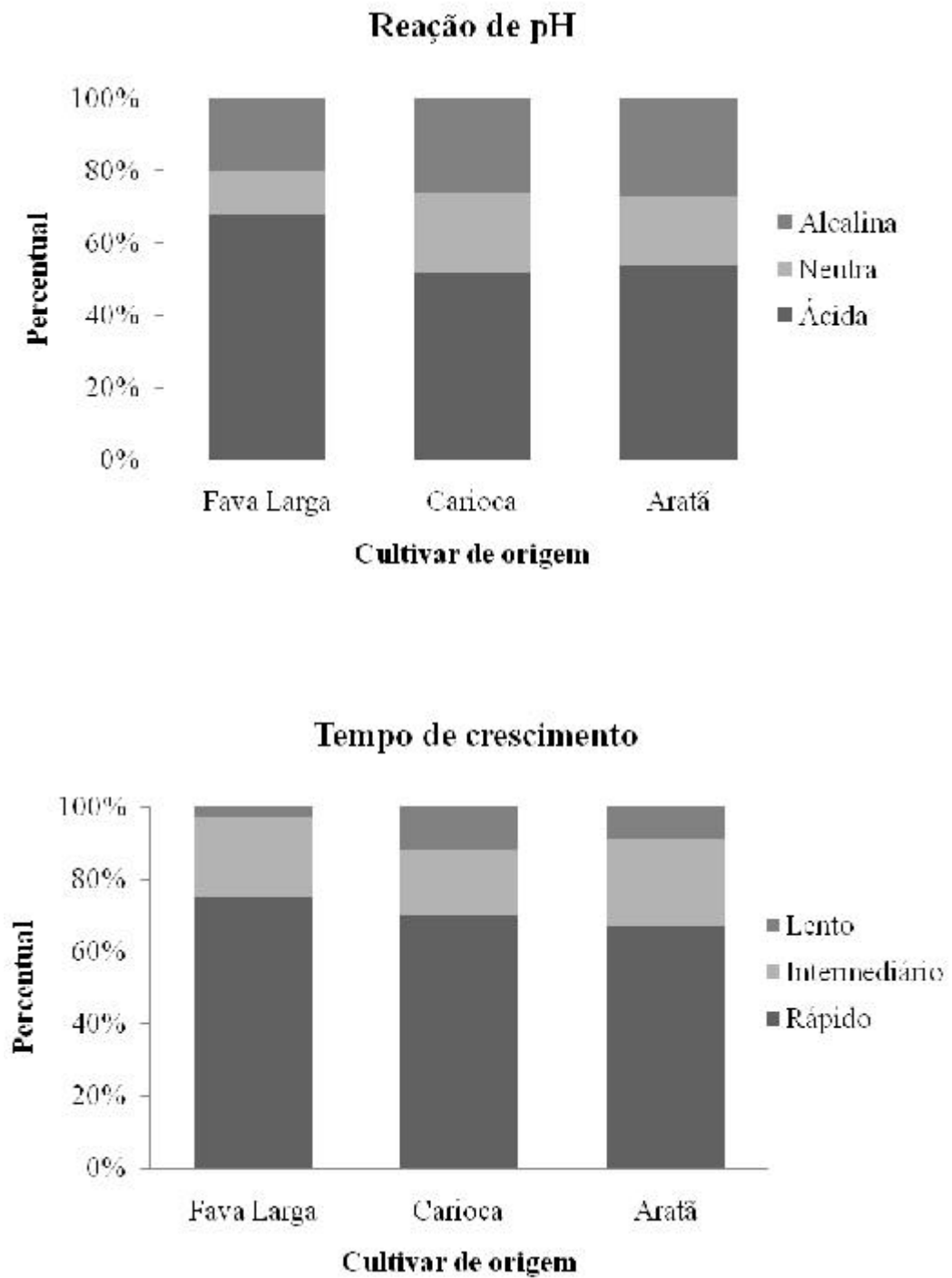


**Figura 5.** Agrupamento dos isolados de acordo com o tempo de crescimento (A) e a alteração do pH do meio (B). Crescimento rápido: até 3 dias; crescimento intermediário: de 4 a 5 dias; crescimento lento; acima de 6 dias.



**Figura 6.** Distribuição dos isolados de bactérias de nódulos de guandu cultivado em solos sob diferentes manejos no Estado do Rio de Janeiro, em função da alteração do pH do meio de cultura YMA (A) e do tempo de crescimento (B). LA= Latossolo Amarelo; PV= Argissolo Vermelho; PAC= Argissolo Acinzentado; RU= Neossolo Flúvico; PVA= Argissolo Vermelho-Amarelo; HX= Planossolo Háplico.\*CE= Campo Experimental





**Figura 7.** Distribuição dos isolados de bactérias de nódulos de três cultivares de guandu em função do tempo de crescimento YMA (A) e da alteração do pH do meio de cultura (B).

A predominância de bactérias de crescimento rápido e que acidificam o meio de cultura para rizóbios isolados de leguminosas cultivadas em regiões tropicais já foi relatado na literatura. Ao avaliar a diversidade de bactérias nodulíferas para diferentes genótipos de feijão-caupi, Leite et al. (2009) demonstraram que a maioria dos isolados (aproximadamente 70%) oriundos dos cinco cultivares estudados apresentaram crescimento rápido e reação ácida no meio YMA. Uma proporção maior de isolados de crescimento rápido e ácido foram isolados de mucunas cinza, anã e preta cultivadas em diferentes solos sob manejo orgânico com diferentes históricos de uso e coberturas vegetais (LIMA, 2009). Outro estudo avaliando a diversidade fenotípica de rizóbios de feijão-caupi na região semi-árida do Estado de Pernambuco também demonstrou maior proporção de isolados de crescimento rápido reação ácida do meio de cultura (SILVA et al., 2007c). Isolados de bacterianos de nódulos de *Desmodium* spp. oriundos do pantanal sul-matogrossense também apresentaram crescimento rápido e alteração ácida do meio de cultura para 75% de uma coleção de 56 isolados (FERREIRA e BRASIL, 2009). Estudo avaliando as características culturais de isolados bacterianos de nódulos de cultivares de guandu cultivados em solos da região semi-árida demonstrou que para dois genótipos vegetais as bactérias foram em sua maioria (entre 85 e 90%) bactérias de crescimento ácido e rápido (NUNES et al., 2009). Também utilizando o feijão-caupi como planta-isca Medeiros et al., (2009) obtiveram uma coleção de 304 bactérias oriundas de diferentes solos da região semi-árida, onde todos os isolados acidificaram o meio de cultura e apresentaram crescimento rápido.

A abundância de isolados de rizóbio de crescimento rápido e reação ácida em solos tropicais pode estar relacionada a fatores como a baixa fertilidade natural e elevada concentração de  $Al^{3+}$  (BUSHBY e MARSHALL, 1977; MOREIRA et al., 1992; MARTINS et al., 1997). O metabolismo ácido é considerado como uma característica derivada do metabolismo alcalino, resultante de uma adaptação às condições adversas no ambiente do solo (MARTINS et al., 1997). Da mesma forma, o crescimento rápido é considerado como uma característica derivada do crescimento lento que também representa uma adaptação às condições edáficas menos favoráveis (MOREIRA et al., 1992). Bactérias de crescimento lento e que tenham capacidade de alcalinizar o meio de cultura são consideradas como mais abundantes em ambientes temperados, enquanto bactérias de crescimento mais rápido e de metabolismo ácido são isoladas geralmente de ambientes tropicais com temperaturas mais elevadas e solos mais intemperizados e ácidos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

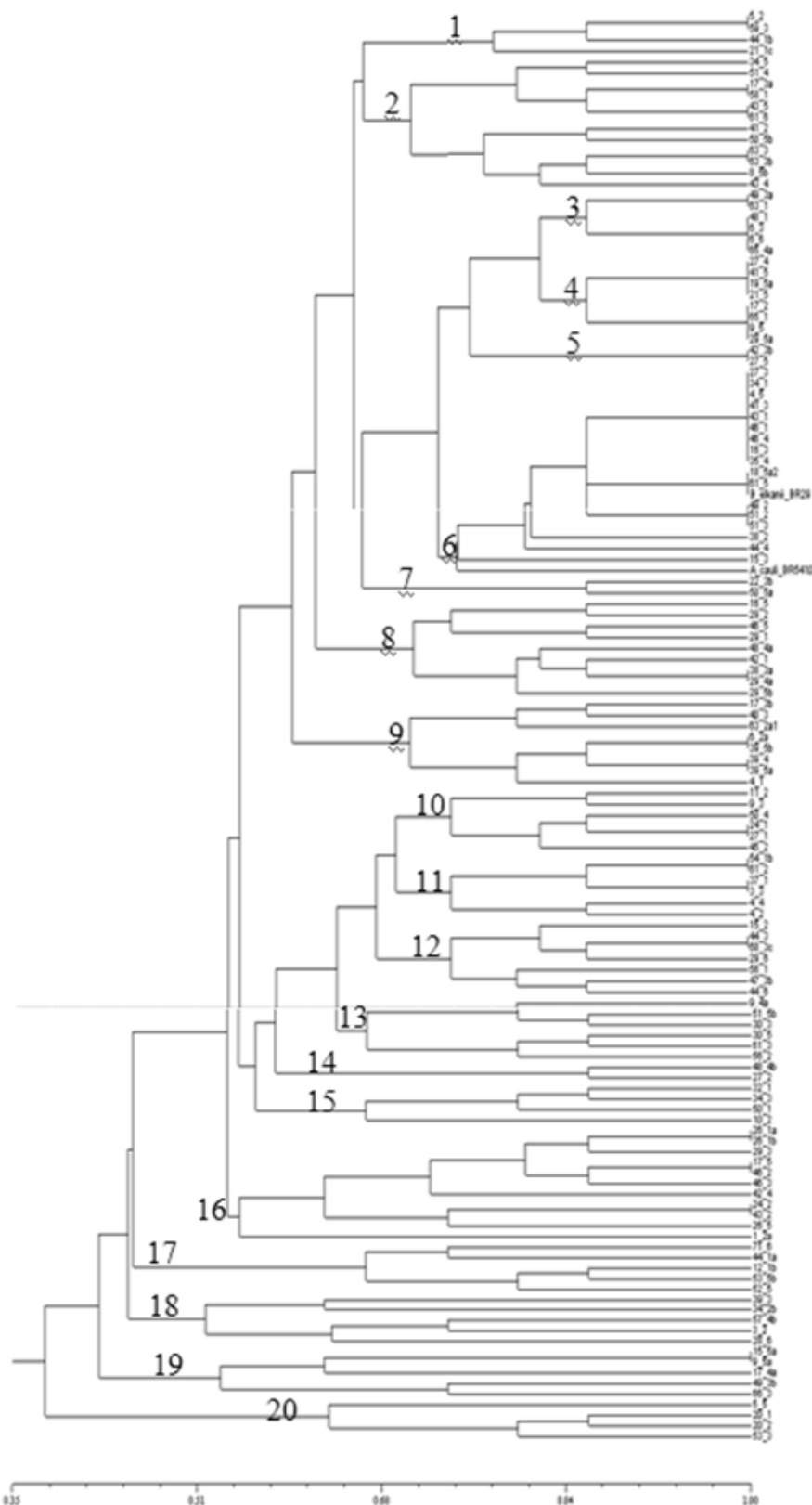
As estirpes de crescimento rápido apresentam uma vantagem competitiva em detrimento às estirpes de crescimento lento devido à capacidade dos isolados mais rápidos em aumentar a sua população mais rapidamente do que as estirpes de crescimento lento (PADMANABAHAN et al., 1990). Dessa forma os isolados de crescimento lento podem estar em concentrações populacionais iguais às populações de crescimento rápido, porém a capacidade de multiplicar a sua população e infectar a planta hospedeira mediante a um estímulo (aumento da concentração de flavonóides, por exemplo) produzido pelo vegetal é maior nas bactérias de crescimento rápido. Poucos estudos têm testado esta hipótese. Fontoura (2007) avaliou a capacidade de formar nódulos entre isolados bacterianos oriundos de nódulos de duas espécies de *Lotus*, isolados de solos do Rio Grande do Sul. Os resultados demonstraram que alguns isolados de crescimento rápido eram capazes de formar nódulos antes de isolados de crescimento lento, indicando que a proliferação das bactérias na rizosfera da planta pode resultar na indução dos mecanismos de “quorum sensing” mais precocemente.

Apesar de a maioria dos estudos, avaliando a diversidade cultural de bactérias formadoras de nódulos, ter demonstrado a prevalência de isolados de crescimento rápido e capaz de acidificar o meio de cultivo em detrimento aos isolados de crescimento alcalino, alguns estudos tem isolado bactérias da região semi-árida do Nordeste brasileiro com o metabolismo alcalino (SANTOS, 2001). No trabalho de Santos (2001), as bactérias de

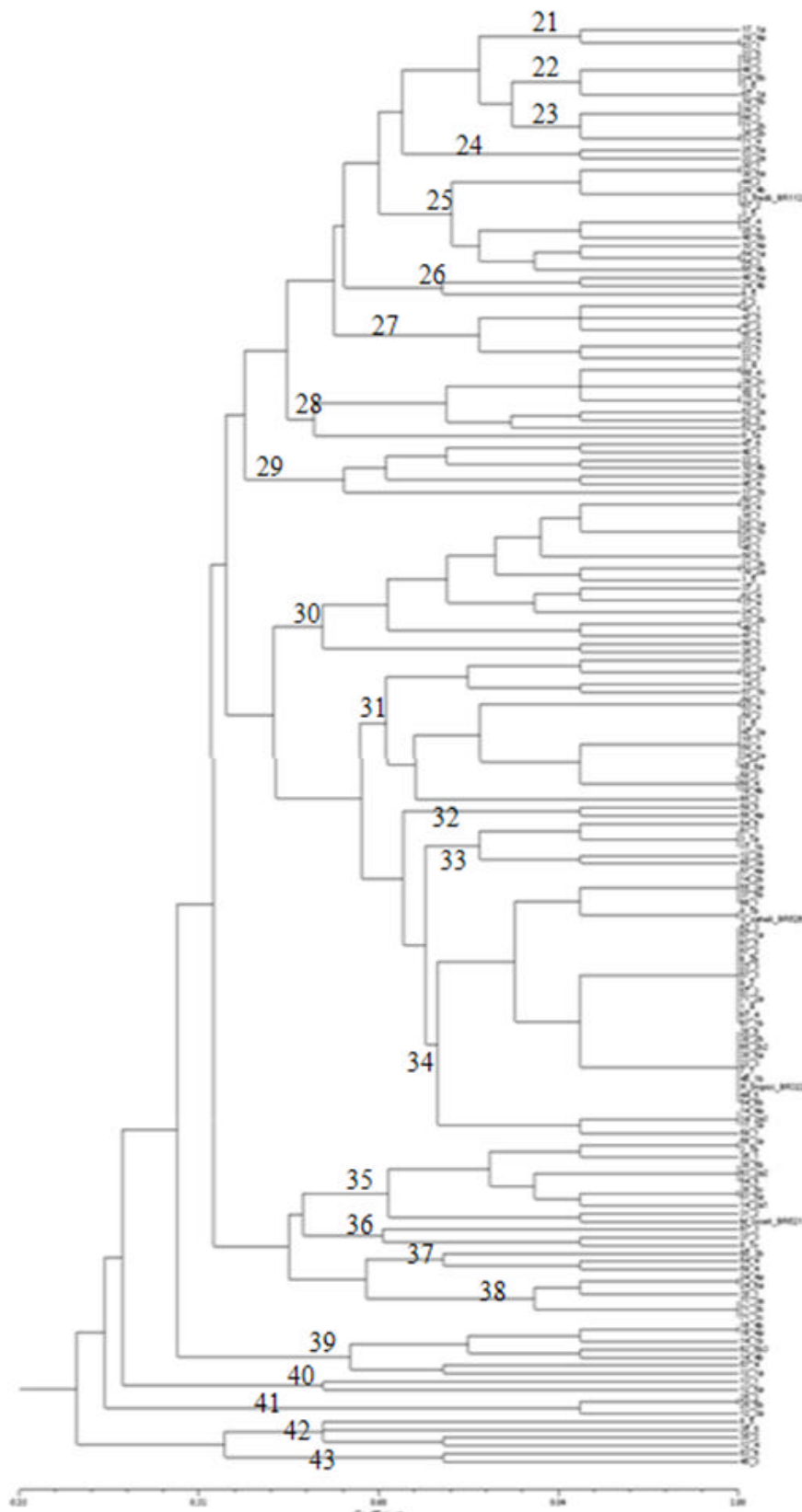
metabolismo alcalino foram mais abundantes quando isoladas de *Stylosantes* na região do sertão, contrariando a expectativa de isolamento preferencial de estirpe de metabolismo ácido. As características e culturais dos rizóbios isolados em diferentes ambientes dependem não só dos fatores edáficos, mas também da planta isca utilizada para a obtenção dos isolados. A avaliação das características culturais de rizóbios isolados de solos do semi-árido nordestino demonstrou que rizóbios isolados da região do agreste oriundos de raízes de *Stylosantes* apresentaram crescimento lento e reação alcalina, enquanto os rizóbios isolados de raízes de *Arachis* apresentaram crescimento rápido e reação ácida e esta proporção entre os isolados de raízes de *Aeschynomene* apresentou foi de 1:1 (SANTOS, 2001). Isolados de raízes de feijão-caupi da região semi-árida do nordeste brasileiro apresentaram a maior proporção de isolados de crescimento lento e que alcalinizavam o meio de cultura no estudo de Martins (1996).

Em um estudo conduzido em Trinidad e Tobago, com rizóbios de isolados de cultivares de guandu de crescimento lento e que alcalinizavam o meio de cultura, observou-se que diversos fatores regionais, podem influenciar na ocupação nodular por bactérias nodulíferas com características culturais e estratégias ecológicas distintas (RAMSUBHAG et al., 2002a).

O agrupamento dos isolados, de acordo com o coeficiente de Jaccard, foi realizado gerando-se dois dendrogramas, um com as bactérias que alcalinizaram ou não alteraram o pH do meio de cultura (Figura 8) e outro com as bactérias de que acidificaram o pH do meio de cultura (Figura 9).



**Figura 8.** Dendrograma de similaridade entre bactérias isoladas de nódulos de três cultivares de grão de bico com reação de pH alcalina ou neutra. Dendrograma gerado a partir da matriz de similaridade utilizando o coeficiente de Jaccard. Agrupamento realizado utilizando o algoritmo UPGMA, programa NTSyS.



**Figura 9.** Dendrograma de similaridade entre bactérias com reação ácida oriundos de nódulos oriundos de raízes de três cultivares de guandu. Dendrograma gerado a partir da matriz de similaridade utilizando o coeficiente de Jaccard. Agrupamento realizado utilizando o algoritmo UPGMA, programa NTSyS.

Como o metabolismo ácido das bactérias capazes de nodular leguminosas é considerado uma característica derivada do metabolismo alcalino, os rizóbios que apresentam metabolismo neutro podem ser considerados como intermediários entre os dois extremos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006), o que permitiu a análise da similaridade utilizando bactérias com estas duas características culturais. O agrupamento destas bactérias permitiu a construção de grupos morfológicos consistentes, conforme será discutido posteriormente.

De acordo com as características culturais das bactérias agrupadas nos dois dendrogramas, foi possível a obtenção de 43 grupos culturais. As características destes grupos, bem como quais isolados pertencem a cada um deles estão sumarizados na tabela 10.

Dentre os 20 grupos formados pelas bactérias com reação de pH alcalina ou neutra, o número de isolados variou de 2 a 17 por grupo, enquanto os isolados de que acidificaram o meio 23 grupos que contêm entre 2 e 32 isolados respectivamente.

O grupo morfológico 6 que compreende 17 isolados com crescimento rápido e lento, reação de pH alcalina, colônias de coloração branca, com diâmetros de colônias 1 a 4 mm, homogêneas, circulares, convexas, translúcidas ou opacas, com bordas inteiras, produção mediana de muco homogêneo, sem elasticidade e não aderente ao meio de cultura, foi o grupo onde se enquadraram as estirpes BR 29 de *Bradyrhizobium elkanii* e BR 5410 de *Azorhizobium caulinodulans*. O grupo morfológico 34 que engloba 32 isolados com crescimento rápido, reação de pH ácida, colônias de coloração amarelada, com diâmetros de colônias iguais ou superiores à 5 mm, heterogêneas ou homogêneas, circulares, convexas, opacas, com bordas inteiras, produção abundante de muco homogêneo ou heterogêneo, sem elasticidade e não aderente ao meio de cultura. Neste grupo, enquadrou-se a estirpe padrão de *Rhizobium tropici* BR 322. Os isolados deste grupo apresentaram características culturais muito próximas à estirpe BR 322, diferenciando em poucas características como a homo/heterogeneidade do muco (Tabela 10).

Outros grupos apresentaram características culturais não usuais para os isolados tradicionais de rizóbio. Os grupos 2 e 4 (dentre outros) apresentaram características de bactérias de crescimento rápido e reação alcalina, assim como o grupo 41 apresentou isolados que produzem quantidade mediana de muco e apresentam crescimento lento e reação ácida. Bactérias com essas características podem pertencer a novos grupos de bactérias nodulantes de guandu, uma vez que espécies de bactérias formadoras de nódulos em leguminosas são descritas constantemente. Bactérias isoladas de nódulos de três espécies de mucuna, foram agrupadas dentro da subclasse  $\alpha$ -proteobactérias através da amplificação do 16S rDNA com iniciadores específicos e apresentaram com características culturais não usuais para os rizóbios tradicionais como o crescimento rápido e reação de pH alcalina (LIMA, 2009).

**Tabela 10.** Características culturais dos 43 grupos obtidos a partir do agrupamento gerado nos dendrogramas.

<b>Grupo</b>	<b>Características culturais</b>	<b>Nº de isolados</b>	<b>Isolados</b>
<b>1</b>	Crescimento intermediário a lento e reação de pH alcalina; colônias de coloração branca, com diâmetros de 1 a 4 mm, homogêneas circulares, convexas e opacas com bordas inteiras de pouca a intermediária produção de muco homogêneo, sem elasticidade e não aderente ao meio de cultura.	4	5.2, 59.3, 44.1b e 21.1c
<b>2</b>	Crescimento de rápido a lento e reação de pH alcalina, colônias com diâmetros de 1 a 4 mm, homogêneas, circulares ou irregulares, convexas translúcidas ou opacas, com bordas inteiras, produção abundante de muco homogêneo sem elasticidade e não aderente ao meio de cultura.	12	34.5, 51.4, 17.3a, 58.1, 43.5, 61.6, 41.2, 50.5b, 63.3, 63.3b, 8.5 e 43.4
<b>3</b>	Crescimento intermediário e reação de pH alcalina, colônias de coloração branca, com diâmetros de 1 a 4 mm, homogêneas, circulares, convexas e opacas com bordas inteiras, produção mediana de muco homogêneo ou heterogêneo, sem elasticidade e não aderente ao meio de cultura.	6	49.3a, 63.1, 48.1, 6.3, 6.6 e 65.4a
<b>4</b>	Crescimento rápido ou lento e reação de pH alcalina, colônias com diâmetros de 1 a 4 mm, homogêneas, circulares e opacas com bordas inteiras, produção mediana de muco homogêneo sem elasticidade e não aderente ao meio de cultura.	8	27.4, 41.5, 19.5, 21.5, 17.2, 65.1, 9.5, 29.5a
<b>5</b>	Crescimento rápido e reação de pH alcalina, colônias de coloração branca, puntiformes, homogêneas, circulares, convexas e opacas com bordas inteiras, produção mediana de muco homogêneo sem elasticidade e não aderente ao meio de cultura.	2	42.3b e 27.5
<b>6</b>	Crescimento de intermediário a lento e reação de pH alcalina, colônias de coloração branca, com diâmetros de 1 a 4 mm, homogêneas, circulares, convexas, translúcidas ou opacas, com bordas inteiras, produção mediana de muco homogêneo sem elasticidade e não aderente ao meio de cultura.	17	27.3, 34.1, 4.5, 41.3, 43.1, 46.1, 46.4, 16.3, 35.4, 18.5a2, 61.5, 49.2, 51.2, 51.3, 38.2, 44.4 e 15.3

<b>7</b>	Crescimento rápido e reação de pH alcalina colônias de coloração branca ou amarelada, com diâmetros de 1 a 4 mm, homogêneas, circulares, convexas, opacas, com bordas inteiras, produção mediana de muco homogêneo sem elasticidade e não aderente ao meio de cultura.	2	22.3 e 50.5a
<b>8</b>	Crescimento rápido e reação de pH alcalina ou neutra, colônias de coloração branca, com diâmetros de 1 a 4 mm, homogêneas, circulares, convexas, opacas, com bordas inteiras, produção mediana a abundante de muco homogêneo ou heterogêneo com elasticidade e não aderente ao meio de cultura.	9	16.5, 29.2, 46.5, 29.1, 48.4a, 42.1, 38.3a, 29.4a e 29.5b
<b>9</b>	Crescimento intermediário e reação de pH alcalina, colônias de coloração branca, com diâmetros de 1 a 4 mm, homogêneas, circulares, convexas, opacas ou translúcidas, com bordas inteiras, produção mediana a abundante de muco homogêneo com ou sem elasticidade e não aderente ao meio de cultura.	8	17.3b, 40.3, 63.2a1, 6.2, 39.5 e 4.1
<b>10</b>	Crescimento rápido, e reação de pH neutra colônias de coloração branca, com diâmetros de 1 a 4 mm, homogêneas, circulares, convexas, opacas, com bordas inteiras, produção pouca ou mediana de muco homogêneo sem elasticidade e aderente ou não ao meio de cultura.	6	11.2, 9.3, 50.4, 24.1, 27.1 e 45.2
<b>11</b>	Crescimento intermediário e reação de pH neutra, colônias de coloração branca ou amarelada, com diâmetros de 1 a 4 mm, homogêneas, circulares, convexas, opacas, com bordas inteiras, produção mediana a abundante de muco homogêneo sem elasticidade, com ou sem aderência ao meio de cultura.	6	54.1b, 61.2, 37.1, 3.3, 4.4 e 4.2
<b>12</b>	Crescimento rápido ou intermediário e reação de pH neutra, colônias de coloração branca ou amarelada, com diâmetros de 1 a 4 mm, homogêneas, circulares, convexas, opacas, com bordas inteiras, produção abundante de muco homogêneo sem elasticidade e sem aderência ao meio de cultura.	7	15.2, 44.3, 68.3c, 29.6, 56.1, 47.3b e 44.6
<b>13</b>	Crescimento intermediário a lento e reação de pH neutra; colônias de coloração branca, com diâmetros de puntiforme (menor que 1 mm) a 4 mm, homogêneas circulares, convexas e opacas ou translúcidas, com bordas inteiras de pouca a intermediária produção de muco homogêneo, sem elasticidade e não aderente ao meio.	6	9.4a, 51.5b, 30.3, 30.5, 61.3 e 56.2



<b>14</b>	Crescimento intermediário e reação de pH neutra, colônias de coloração branca, com diâmetros de 1 a 4 mm, homogêneas, circulares ou irregulares, convexas, opacas, com bordas inteiras, produção mediana muco heterogêneo sem elasticidade, com aderência ao meio de cultura.	2	48.4b e 27.2
<b>15</b>	Crescimento rápido e reação de pH neutra, colônias de coloração branca, com diâmetros de 1 a 4 mm, homogêneas ou heterogêneas, circulares, convexas, transparentes, com bordas inteiras, produção pouca ou mediana de muco heterogêneo sem elasticidade e não aderente ao meio de cultura.	4	32.1, 34.3, 50.1 e 10.2
<b>16</b>	Crescimento rápido a intermediário e reação de pH neutra ou alcalina, colônias de coloração branca, com diâmetros de 1 a 4 mm, homogêneas, circulares, convexas, translúcidas, com bordas inteiras, produção mediana a abundante muco heterogêneo sem elasticidade e não aderente ao meio.	11	26.1a, 26.1b, 29.3, 17.5, 46.2, 46.3, 42.4, 24.2, 43.2 e 26.5
<b>17</b>	Crescimento rápido, e reação de pH neutra, colônias de coloração branca ou amarelada, com diâmetros de 1 a 4 mm, heterogêneas, circulares, convexas, opacas, com bordas inteiras, produção abundante de muco heterogêneo com elasticidade e sem aderência ao meio de cultura.	5	71.6, 44.1a, 12.1b, 53.5b e 52.5
<b>18</b>	Crescimento rápido a intermediário e reação de pH neutra ou alcalina, colônias de coloração branca, com diâmetros de puntiforme (menor que 1 mm) a 4 mm, homogêneas, circulares, convexas ou planas, translúcidas ou opacas, com bordas inteiras, produção pouca a mediana de muco homogêneo sem elasticidade e não aderente ao meio de cultura.	5	39.3, 34.2b, 57.4b, 3.2 e 28.6
<b>19</b>	Crescimento lento, neutro ou alcalino, colônias de brancas, com diâmetros entre 1 e 4 mm, homogêneas, irregulares, planas, transparentes, com bordas inteiras, produção mediana de muco homogêneo sem elasticidade e não aderente ao meio.	5	15.5a, 9.5a, 17.4a, 49.3b e 66.3

<b>20</b>	Reação de pH neutra, colônias de coloração branca, com diâmetros entre 1 e 4 mm, irregulares ou circulares, planas ou convexas, opacas com bordas irregulares, produção de mediana a abundante de muco heterogêneo sem elasticidade e não aderente ao meio de cultura.	4	5.5, 20.1, 20.2 e 53.3
<b>21</b>	Crescimento rápido e reação de pH ácida, colônias de coloração amarelada com diâmetros entre 1 e 4 mm, homogêneas ou heterogêneas, circulares, convexas, opacas com bordas inteiras, produção de pouca a mediana de muco homogêneo sem elasticidade e não aderente ao meio de cultura.	3	17.1a, 19.4a e 53.1
<b>22</b>	Crescimento rápido ou lento e reação de pH ácida, colônias de coloração amarelada homogêneas, com diâmetros entre 1 e 4 mm, homogêneas, circulares, convexas, opacas com bordas inteiras, produção mediana de muco homogêneo sem elasticidade e não aderente ao meio de cultura.	6	23.5, 18.3, 48.3, 24.6b, 3.6 e 67.1a
<b>23</b>	Crescimento rápido, colônias de coloração amarelada homogêneas, com diâmetros acima 1 mm, heterogêneas, circulares, convexas, opacas com bordas inteiras, produção mediana de muco homogêneo sem elasticidade e aderência ao meio de cultura	6	19.5b, 39.1, 56.3, 71.2b, 26.2b e 71.4
<b>24</b>	Crescimento rápido, colônias de coloração amarelada homogêneas, com diâmetros entre puntiforme (menor que 1 mm) e 4 mm, homogêneas, circulares, convexas, opacas com bordas inteiras, produção mediana de muco homogêneo com elasticidade e sem aderência ao meio de cultura	2	25.5a e 33.2a
<b>25</b>	Crescimento rápido e reação de pH ácida, colônias de coloração amarelada com diâmetros maiores que 1, homogêneas, circulares ou irregulares, convexas, opacas ou translúcidas com bordas inteiras, produção de mediana a abundante de muco homogêneo sem elasticidade e não aderente ao meio.	13	30.1, 30.6a, 44.2, 29.4b, 67.2, 3.5, 41.4, 28.4, 48.5b, 10.4a, 54.1a, 54.3 e 65.4b

<b>26</b>	Crescimento rápido ou lento e reação de pH ácida, colônias de coloração branca homogêneas, com diâmetros entre 1 e 4 mm, homogêneas , circulares, convexas, opacas com bordas inteiras, produção pouca ou abundante de muco homogêneo sem elasticidade e não aderente ao meio.	3	48.5a, 24.4b e 6.5
<b>27</b>	Crescimento rápido e reação de pH ácida, colônias de coloração amarelada homogêneas, com diâmetros puntiformes, homogêneas , circulares, convexas, opacas, translúcidas ou transparentes com bordas inteiras, produção pouca ou mediana de muco homogêneo sem elasticidade e não aderente ao meio de cultura.	8	8.2, 47.1, 47.5, 47.2, 47.4, 23.4, 23.5 e 22.1
<b>28</b>	Crescimento de rápido a lento e reação de pH ácida, colônias de coloração amarelada, com diâmetros de puntiformes (menor que 1 mm) a 4 mm, homogêneas , circulares ou irregulares, convexas, opacas, com bordas inteiras, produção mediana de muco heterogêneo sem elasticidade e aderente ou não ao meio de cultura.	10	3.4, 69.4, 39.2c, 20.3, 19.1a, 19.2, 52.3a, 62.5, 52.2a e 8.1a
<b>29</b>	Crescimento rápido e reação de pH ácida, colônias de cor amarela, com diâmetros de maiores que 1 mm, homogêneas ou heterogêneas, circulares ou irregulares, convexas, opacas ou translúcidas, com bordas inteiras ou irregulares, produção de mediana a abundante de muco homogêneo sem elasticidade e não aderente ao meio.	7	47.6, 40.1, 22.2, 10.4b, 39.2b, 45.4, e 17.1b
<b>30</b>	Crescimento rápido a intermediário e reação de pH ácida, colônias de coloração amarelada ou branca, com diâmetros de 1 a 4mm, heterogêneas , circulares, convexas, translúcidas ou transparentes, com bordas inteiras, produção de mediana a abundante de muco heterogêneo com/sem elasticidade e não aderente ao meio.	20	50.3, 26.4, 16.1, 25.1a, 25.1b, 25.3, 45.1, 58.5, 21.3b, 39.2a, 1.5, 37.2, 62.4, 17.4, 24.3, 33.2b, 49.1, 41.1, 56.5, 26.3
<b>31</b>	Crescimento rápido a intermediário e reação de pH ácida, colônias de coloração amarelada, com diâmetros iguais ou superiores a 5mm, homogêneas ou heterogêneas, circulares, convexas, translúcidas, com bordas inteiras, produção abundante de muco homogêneo ou heterogêneo com ou sem elasticidade e não aderente ao meio de cultura.	18	28.3, 21.1a, 16.2, 14.3, 57.1b, 69.1, 53.4, 58.2, 1.6, 47.3, 15.1, 58.4, 34.2a, 59.6a, 50.2, 68.4, 19.4b e 65.3

<b>32</b>	Crescimento rápido e reação de pH ácida, colônias de coloração amarelada, com diâmetros iguais ou superiores a 5mm, heterogêneas , circulares, convexas, opacas, com bordas inteiras, produção pouca ou abundante de muco heterogêneo com elasticidade e não aderente ao meio de cultura.	2	59.5 e 56.4
<b>33</b>	Crescimento rápido e reação de pH ácida, colônias de coloração amarelada, com diâmetros superiores a 1mm, heterogêneas , circulares, convexas, opacas, com bordas inteiras, produção mediana ou abundante de muco heterogêneo sem elasticidade e não aderente ao meio de cultura.	6	54.6, 61.1, 3.1a, 11.1b, 12.3b e 68.3a
<b>34</b>	Crescimento rápido e reação de pH ácida, colônias de coloração amarelada, com diâmetros iguais ou superiores a 5 mm, heterogêneas ou homogêneas, circulares, convexas, opacas, com bordas inteiras, produção abundante de muco homogêneo ou heterogêneo sem elasticidade e não aderente ao meio de cultura.	32	57.4a, 57.3, 57.1a, 57.2, 14.2b, 14.4a, 14.2a2, 55.3a, 37.5b, 66.1, 8.1b, 62.3, 67.1b, 67.5, 9.2, 71.2a, 1.4, 61.4, 38.6, 30.2b, 65.2b2, 38.5a, 22.3, 7.1, 46.1b, 44.5, 54.6b, 11.3a e 59.1
<b>35</b>	Crescimento rápido a intermediário e reação de pH ácida, colônias de coloração amarelada, com diâmetros de 1 a 4mm, homogêneas ou heterogêneas, circulares, convexas, opacas, com bordas inteiras, produção abundante de muco homogêneo com elasticidade e não aderente ao meio de cultura.	10	56.3a, 3.1b, 35.1, 38.5b, 63.2a2, 54.4, 38.5c, 51.5a, 14.2a1 e 31.2
<b>36</b>	Crescimento rápido a intermediário e reação de pH ácida, colônias de coloração amarelada ou branca, com diâmetros superiores a 5 mm, homogêneas, circulares, convexas, opacas, com bordas inteiras, produção abundante de muco homogêneo com ou sem elasticidade e não aderente ao meio de cultura.	3	67.3, 37.3 e 8.1c
<b>37</b>	Crescimento rápido ou lento e reação de pH ácida, colônias de coloração amarelada ou branca, com diâmetros de puntiforme (menor que 1 mm) a superiores a 5 mm, homogêneas, circulares, convexas, opacas, com bordas inteiras, produção abundante de muco homogêneo com elasticidade e aderente ao meio de cultura.	3	68.3b, 54.4 e 59.4

<b>38</b>	Crescimento rápido e reação de pH ácida, colônias de coloração amarelada com diâmetros iguais ou superiores a 5 mm, heterogêneas, circulares, convexas, opacas, com bordas inteiras, produção abundante de muco homogêneo com ou sem elasticidade e aderente ao meio de cultura.	6	10.1, 24.4a, 24.6a, 71.3a, 71.3b e 71.3c
<b>39</b>	Crescimento rápido e reação de pH ácida, colônias de coloração amarelada, com diâmetros superiores a 1 mm, heterogêneas, circulares, convexas, opacas ou translúcidas, com bordas inteiras, produção mediana de muco homogêneo com ou sem elasticidade e aderente ou não ao meio.	7	16.4a, 16.4b, 14.1b, 62.5b3, 14.4b, 57.4 e 12.1a
<b>40</b>	Crescimento rápido ou lento e reação de pH ácida, colônias de coloração branca, com diâmetros de puntiforme (menor que 1 mm) a 4 mm, homogêneas, circulares, convexas, translúcidas ou transparentes, com bordas inteiras, produção mediana de muco homogêneo sem elasticidade e não aderente ao meio de cultura.	2	13.1 e 12.5a
<b>41</b>	Crescimento intermediário e reação de pH ácida, colônias de coloração amarelada ou branca, com diâmetros iguais ou superiores a 5 mm, homogêneas, irregulares, convexas, translúcidas, com bordas inteiras, produção mediana de muco homogêneo sem elasticidade e não aderente ao meio de cultura.	3	25.2, 25.5b e 12.3a
<b>42</b>	Crescimento de rápido ou intermediário, colônias de coloração amarelada, com diâmetros puntiformes, homogêneas, circulares ou irregulares, planas, translúcidas ou transparentes, com bordas inteiras, pouca produção de muco homogêneo sem elasticidade e não aderente ao meio de cultura.	4	8.5, 35.5, 35.2 e 12.4
<b>43</b>	Crescimento rápido e reação de pH ácida, colônias de coloração amarelada, com diâmetros de 1 a 4 mm, homogêneas, circulares ou irregulares, planas, opacas, com bordas inteiras ou irregulares, pouca produção de muco homogêneo sem elasticidade e não aderente ao meio de cultura.	2	53.6 e 45.3

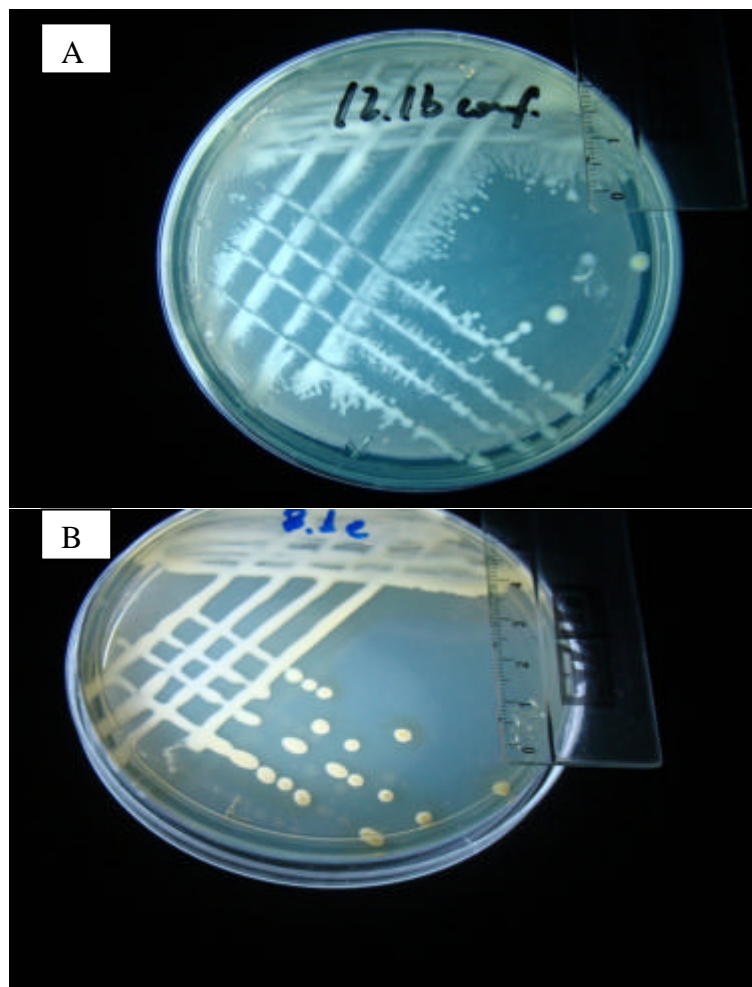
Outras características peculiares podem ser destacadas. No caso da bactéria 12.1b (grupo 17), que apresentou crescimento intermediário e produção abundante de muco, foi observado também a formação de “projeções” de crescimento bacteriano a partir dos riscos em uma placa de Petri (Figura 10A). Este tipo de projeção é descrito na literatura científica como “swarming” (espalhamento) e pode representar uma estratégia para a colonização de zonas das placas de meio de cultura abundantes em nutrientes e com poucas células, representando baixa competição entre as células bacterianas (BRAEKEN et al., 2008). Este comportamento é muito bem estudado para a espécie *R. etli* (BRAEKEN et al., 2008). A capacidade de nodulação deste isolado foi confirmada no teste de nodulação. O isolado 8.1c (grupo 36) apresentou a produção abundante de muco e com a formação de um halo de coloração marrom ao redor das colônias e das estrias riscos de crescimento bacteriano, sugerindo a produção de alguma substância que se difunde no meio de cultura (Figura 10B). Este isolado também foi capaz de produzir grande quantidade de polihidroxibutirato e exopolissacarídeos, conforme será discutido no Capítulo 2.

Dentre os grupos identificados, apenas 7 (16%) apresentaram produção de pouco muco. Os demais grupos apresentaram capacidade de produção mediana ou abundante de muco. Esta característica pode ter importantes funções na ecologia destes isolados, uma vez que a produção de muco tem sido correlacionada com a adaptação dos isolados a fatores edáficos e ambientais, como elevadas temperaturas, elevada concentração de alumínio trocável e longo período de seca (HOLLINGSWORTH et al., 1985).

Além disso, os rizóbios com maior produção de muco geralmente são mais resistentes a antibióticos do que rizóbios com colônias mais secas (SINCLAIR e EAGLESMAN, 1984), trazendo importantes informações a respeito da ecologia dessas bactérias. A resistência a metais pesados também foi avaliada para diversas estirpes de rizóbio por Matsuda et al. (2002), que demonstraram que estirpes de *Rhizobium* spp. que produziam elevada quantidade de muco eram mais resistentes que estirpes de *Bradyrhizobium* ou *Mesorhizobium*, produtoras de menor quantidade de exopolissacarídeos.

As bactérias isoladas de nódulos de plantas cultivadas no Argissolo Vermelho nos três cultivares de guandu não apresentaram a abundância de muco condizente com as características edáficas, sugerindo existir nestes isolados outras estratégias para mitigar os efeitos das elevadas concentrações de alumínio e baixas concentrações de matéria orgânica. No Planossolo Háptico do Campo Experimental os isolados oriundos de nódulos dos cultivares Fava-Larga e Aratã apresentaram predominantemente abundante produção de muco. Vale ressaltar que este é o solo com menor teor de matéria orgânica dentre os estudados e que esta característica pode influenciar na comunidade bacteriana capaz de formar nódulos, selecionando bactérias ou desenvolver estratégias para resistência a condições de baixa umidade e CTC determinada pela baixa concentração dos teores de matéria orgânica.

A análise da distribuição dos grupos morfológicos por solos permitiu avaliar que os solos, Argissolo Vermelho e Argissolo Acinzentado, apresentaram uma menor representatividade no que diz respeito ao número de grupos morfológicos dos isolados (15 e 16 respectivamente) (Tabela 11). Vale ressaltar que estes solos são os solos que apresentam maior quantidade de  $Al^{3+}$ , apresentando ainda baixas concentrações de potássio, magnésio, cálcio e fósforo. Este dado pode indicar que estes solos concentrem uma quantidade de bactérias com certas características que auxiliam na persistência em condições não favoráveis. Dentre os solos estudados, o solo com maior quantidade de grupos morfológicos foi o Argissolo Vermelho-Amarelo do SIPA, com 37 dos 43 grupos morfológicos. Este solo foi coletado de área sob manejo orgânico e caracterizado por apresentar altos teores de fósforo, potássio, magnésio e matéria orgânica, ausência de  $Al^{3+}$  titulável e pH 6,4.



**Figura 10.** Isolados 12.1b (A) e 8.1c (B) cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura YMA.

Isolados bacterianos capazes de crescer em meio de cultura contendo maiores concentrações de  $Al^{3+}$  já foram isolados, de regiões com solos álicos, porém a diversidade da coleção muito baixa (HARA e OLIVEIRA, 2004). Além dos solos com maiores concentrações de  $Al^{3+}$  apresentarem menor quantidade de grupos, a maioria desses grupos são aqueles que apresentaram características de crescimento rápido e reação alcalina, conforme já demonstrado (HARA e OLIVEIRA, 2004; CHAGAS JÚNIOR et al., 2009). A toxidez do alumínio para rizóbios também já foi demonstrada em meios de cultura, onde a adição de baixas concentrações de  $Al^{3+}$  é capaz de reduzir a proliferação das células rizobianas (KEYSER e MUNNS, 1979; WOOD et al., 1988; PAUDYAL et al., 2007), alterando ainda algumas características culturais, como reação de pH e tempo de crescimento, além de influenciar negativamente no estabelecimento da simbiose com adubos verdes tropicais como *Mucuna pruriens* (PAUDYAL et al., 2007).

Este resultado indica que um solo com melhor fertilidade pode conter maior variedade de grupos (possivelmente taxonômicos) de bactérias, inclusive daquelas capazes de induzir a formação de nódulos em leguminosas. Ao avaliar a diversidade bacteriana em solos de diversos biomas e áreas agrícolas de todo o continente Americano pela técnica de PCR-DGGE, Fierer e Jackson, (2006) encontraram maior diversidade para os solos com menores concentrações de  $Al^{3+}$ , e maiores concentrações de nutrientes como o fósforo, por exemplo. Ao avaliar a diversidade de populações de bactérias formadoras de nódulos em siratro (*Macropitium artropurpureum*) em diferentes sistemas de uso de terra na Amazônia, Jesus et

al. (2005) observaram que o sistema de manejo onde a fertilidade do solo era mais alta, o maior número de grupos foi encontrado. Em outro estudo avaliando as populações de rizóbios nodulantes de adubos verdes na China, Liu et al. (2007) também demonstraram que em regiões tropicais os grupos taxonômicos de rizóbios são diferentes em solos com diferentes características de fertilidade e de cobertura vegetal.

Comparando a quantidade total de grupos nos Argissolos Vermelho-Amarelos, o solo com manejo convencional (Campo Experimental) apresentou menos grupos morfológicos (22) se comparado com o solo sob manejo orgânico (37). Vale ressaltar que no momento da coleta estes solos estavam cultivados com milho, uma gramínea que tradicionalmente é citada pela capacidade de reduzir as populações de rizóbios nos solos, porém ao diminuir a quantidade total das bactérias capazes de nodular as leguminosas ocorre uma alteração na estrutura das comunidades, reduzindo a dominância e aumentando a equitabilidade conforme já relatado (ROSENBLUETH e MARTNEZ-ROMERO, 2004).

Foi observada elevada representatividade de bactérias pertencentes a quase todos os grupos morfológicos capazes de nodular o guandu presentes no Argissolo Vermelho-Amarelo do SIPA, sob cultivo do milho, se comparada com a representatividade desses grupos morfológicos presentes no Argissolo Vermelho-Amarelo do Campo Experimental. Este fato indica além da influência da cobertura vegetal na estrutura da comunidade bacteriana, haver influência do manejo na diversidade dessas bactérias. Estes resultados estão em consonância com dados da literatura para rizóbios capazes de nodular guandu (COUTINHO et al., 1999), feijão comum (ANDRADE et al., 2002; KASCHUK et al., 2006) e feijão-caupi (LEITE et al., 2009).

Os resultados sugerem que as populações de bactérias formadoras de nódulos na área de Planossolo Háptico sob manejo orgânico foi maior nesse solo apesar de haver a cobertura vegetal com uma espécie desfavorável à manutenção dos rizóbios de forma saprofítica. A elevada diversidade de bactérias capazes de nodular adubos verdes em solos sob manejo orgânico já foi demonstrada para mucunas (LIMA, 2009) e crotalária (BRATTI et al., 2004).

A distribuição dos grupos morfológicos em função dos cultivares estudados demonstrou que os cultivares Fava Larga, Carioca e Anão Aratã apresentaram um total de 37, 32 e 36 grupos respectivamente, (Tabela 12, Figura 11). Alguns grupos morfológicos foram isolados preferencialmente de alguns cultivares. Dos 17 isolados do grupo 6, 8 foram oriundos de nódulos do cultivar Carioca e 8 oriundos de nódulos do cultivar Anão Aratã e apenas 1 isolado foi isolado de nódulos de cultivar Fava Larga (Tabela 12, Figura 11). Esses dados sugerem que pode haver especificidade entre determinados grupos de rizóbios em nodular determinados genótipos, conforme já foi determinado para culturas como o feijão-caupi (LEITE et al., 2009) e feijão comum (FRANCO et al., 2003; AGUILAR et al., 2004).

A especificidade entre os isolados bacterianos e as plantas de origem reflete um exemplo de coevolução entre os pares simbioses. O guandu não foi cultivado em nenhuma das áreas, na época da amostragem onde foram coletados os solos para a obtenção das bactérias. Porém em áreas tropicais, os rizóbios apresentam a tendência a apresentar uma maior plasticidade fenotípica, resultando em uma faixa hospedeira maior, devido ao reconhecimento de uma diversidade de flavonóides muito grande e à versatilidade metabólica desses isolados (PERRET et al., 2000).

A capacidade da nodulação dos isolados no guandu pode estar relacionada à possível co-evolução dessas bactérias com plantas taxonomicamente próximas ao guandu, que pertencem à subtribo Cajaninae da tribo Phaseolae (VAN DER MAESEN, 1986), tribo que engloba plantas nativas da América do Sul e plantas cultivadas difundidas em todo o Brasil, como feijão comum, feijão-caupi e lablab. O contato dessas bactérias com outras plantas da tribo Phaseolae, pode ter sido fator importante na seleção dos isolados nos solos de origem.



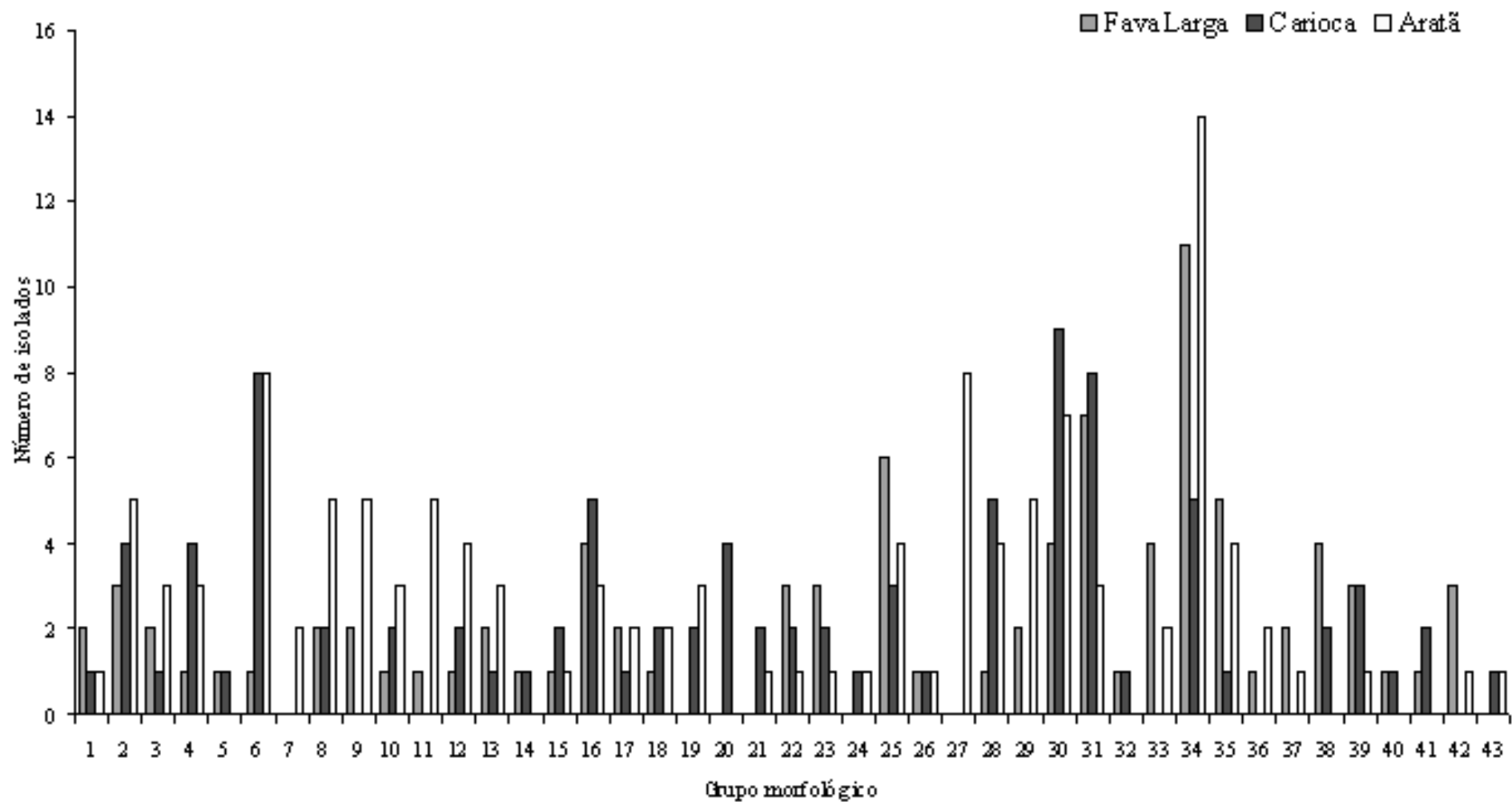
**Tabela 11.** Distribuição dos diferentes isolados de bactérias de nódulos de guandu nos grupos e em funções dos solos de origem.

pH	GRUPO	Nº de isolados	LA*	PV	PAC	RU	PVA (SIPA)	HX (SIPA)	PVA (CE**)	HX (CE**)
Isolados que alcalinizam ou não alteram o pH do meio de cultura	1	4	1		1		1	1		
	2	12	1	1	3	1		1	2	3
	3	6	2	1	2				1	
	4	8		2	3		1		1	1
	5	2			1	1				
	6	17	1	4	1		2		4	5
	7	2			2					
	8	9			1	1	1		5	
	9	8	1	1	2					2
	10	6		1	2		2			1
	11	6	3	2		1				
	12	7					2	2	1	2
	13	6	1				1	2		2
	14	2			2					
	15	4			1	1			1	1
	16	11	3			1	3		2	2
	17	5					2	2	1	
	18	5	1		1			2		1
	19	5	1				1	1	1	1
	20	4	1				2		1	
Isolados que acidificam o meio de cultura	21	3			1			1		1
	22	6	2		1		1		1	1
	23	6	1		2				2	1
	24	2	1			1				
	25	13	2	2	1	2	1	3	2	
	26	3	1		1		1			
	27	8			1			5	2	
	28	10	1		4	1	3	1		
	29	7			2			1	1	3
	30	20	6	1	3	2	2	1	1	4
	31	18	1	4	3		6	1	3	7
	32	2						1		1
	33	6	2	1		1		1		1
	34	32	5	5	1	5	4	7	1	1
	35	10	1	3	1	2			1	2
	36	3	2					1		
	37	3				1		1		1
	38	6					2		4	
	39	7				2	1	2	2	
	40	2		1				1		
	41	3	2					1		
	42	4						2	2	
	43	2						1		1
<b>Total</b>		<b>306</b>	<b>43</b>	<b>27</b>	<b>44</b>	<b>28</b>	<b>31</b>	<b>48</b>	<b>39</b>	<b>41</b>
<b>Grupos por solo</b>			<b>25</b>	<b>15</b>	<b>25</b>	<b>16</b>	<b>37</b>	<b>25</b>	<b>22</b>	<b>23</b>

\*LA=Latossolo Amarelo; PV=Argissolo Vermelho; PAC=Argissolo Acinzentado; RU=Neossolo Flúvico; PVA=Argissolo Vermelho-Amarelo; HX=Planossolo Háplico  
 \*\*CE=Campo Experimental

**Tabela 12.** Distribuição dos grupos morfológicos em funções dos cultivares origem.

pH	Grupo	Nº de isolados	Fava Larga	Carioca	Aratã
Isolados que alcalinizam ou não alteram o pH do meio de cultura	1	4	2	1	1
	2	12	3	4	5
	3	6	2	1	3
	4	8	1	4	3
	5	2	1	1	
	6	17	1	8	8
	7	2			2
	8	9	2	2	5
	9	8	2		5
	10	6	1	2	3
	11	6	1		5
	12	7	1	2	4
	13	6	2	1	3
	14	2	1	1	
	15	4	1	2	1
	16	11	4	5	3
	17	5	2	1	2
	18	5	1	2	2
	19	5		2	3
	20	4		4	
Isolados que acidificam o meio de cultura	21	3		2	1
	22	6	3	2	1
	23	6	3	2	1
	24	2		1	1
	25	13	6	3	4
	26	3	1	1	1
	27	8			8
	28	10	1	5	4
	29	7	2		5
	30	20	4	9	7
	31	18	7	8	3
	32	2	1	1	
	33	6	4		2
	34	32	11	5	14
	35	10	5	1	4
	36	3	1		2
	37	3	2		1
	38	6	4	2	
	39	7	3	3	1
	40	2	1	1	
	41	3	1	2	
	42	4	3		1
	43	2		1	1
<b>Total</b>		<b>306</b>	<b>91</b>	<b>92</b>	<b>123</b>
<b>Grupos por solo</b>		<b>-</b>	<b>37</b>	<b>32</b>	<b>36</b>



**Figura 11.** Agrupamento de bactérias isoladas de nódulos de guandu em função do cultivar de origem.

A partir da distribuição dos grupos morfológicos através dos solos estudados, foram calculados os índices de diversidade de Shannon-Weaver, o de abundância de Simpson e o de riqueza de Margaleff (Tabela 13).

**Tabela 13.** Índice de diversidade de Shannon-Weaver, de abundância de Simpson e de riqueza de Margalef baseado na diversidade cultural de bactérias isoladas de nódulos de três cultivares de guandu cultivados em oito solos diferentes.

Solo	Índice Ecológico		
	Shannon-Weaver	Margalef	Simpson
<b>Latossolo Amarelo</b>	4,23	5,89	0,06
<b>Argissolo Vermelho</b>	3,63	4,25	0,10
<b>Argissolo Acinzentado</b>	4,45	6,34	0,05
<b>Neossolo Flúvico</b>	3,87	4,80	0,08
<b>Argissolo Vermelho Amarelo (SIPA)</b>	4,00	4,95	0,07
<b>Planossolo Háplico (SIPA)</b>	4,26	6,20	0,07
<b>Argissolo Vermelho-Amarelo (Campo Experimental)</b>	4,22	5,73	0,06
<b>Planossolo Háplico (Campo Experimental)</b>	4,29	5,92	0,06

O índice de Shannon-Weaver aponta para a maior diversidade presente no Argissolo Acinzentado, enquanto a menor diversidade foi verificada no Argissolo Vermelho. Assim como o cálculo da diversidade de Shannon-Weaver, o índice de riqueza de grupos indica que o Argissolo Acinzentado é o solo com maior índice de Margalef e menor índice de Simpson (Tabela 13). Vale ressaltar que o Argissolo Acinzentado apresentou um número baixo de grupos, porém a maior diversidade foi apontada pelo índice de Shannon-Weaver. Este índice é calculado utilizando não só a quantidade de grupos taxonômicos estudados, mas também a frequência de cada um dos grupos.

O índice de Shannon-Weaver foi proposto para ser utilizado em análise da diversidade de comunidades biológicas por Ramon Margalef em 1956 (PINTO-COELHO, 2000). O cálculo deste índice representa o cálculo de incerteza de qual espécie (ou grupo) será amostrada em uma determinada área. Quanto maior o índice de Shannon-Weaver, menor será a chance de se determinar qual a espécie (ou grupo) pode ser o “capturado” na amostra (ou maior será a incerteza) (PINTO-COELHO, 2000). O índice de Simpson é um índice de dominância e representa a probabilidade de dois indivíduos amostrados ao acaso, no mesmo tempo, em uma mesma área pertençam ao mesmo grupo. Dessa forma quanto maior a abundância relativa de um determinado grupo, menor a diversidade e maior a probabilidade de amostrar indivíduos deste mesmo grupo (PINTO-COELHO, 2000).

As áreas amostradas eram cultivadas (no caso do SIPA e do Campo Experimental) ou tinham uma cobertura de gramíneas, o que colabora para a redução das populações de rizóbio naturalmente presentes nos solos. Além disso, as condições edáficas desfavoráveis (como a concentração elevada de  $Al^{3+}$ , por exemplo) provavelmente influenciaram na redução da abundância de grupos de bactérias. Este fato pode reduzir principalmente os grupos mais abundantes, reduzindo a dominância e aumentando a frequência relativa dos grupos presentes

em menor concentração (MIETHLING et al., 2000). Zilli (2001) avaliou a diversidade de rizóbio em solos de Cerrado subseqüentemente a diferentes culturas. Em solos cuja cultura precedente foi soja, o índice de Simpson foi muito elevado, atingindo 0,88, enquanto em uma área após o cultivo de arroz o índice de Simpson foi de 0,10. Comparando a estrutura de comunidades de bactérias capazes de formar nódulos em feijão-caupi, Leite et al. (2009) demonstraram que isolados oriundos de solos sob cultivo de gramínea (milho) apresentaram maior diversidade, e maior equitabilidade se comparados com as comunidades de bactérias nodulíferas de solos cultivados com leguminosas ou outras espécies botânicas. Estes resultados corroboram o papel das gramíneas na alteração da estrutura das comunidades de bactérias formadoras de nódulos em leguminosas após o cultivo com gramíneas em determinada área.

A aplicação dos índices de diversidade para o estudo da ecologia de bactérias é criticada por alguns autores sob o argumento de que estes índices foram criados ou adaptados para estudos de diversidade de outros grupos de organismos, muito menos diversos que os microrganismos (HUGHES et al., 2001). Todavia a utilização destes índices é amplamente difundida na literatura devido à sua simplicidade e facilidade na comparação de comunidades distintas (ZILLI, 2001; JESUS et al., 2005), tanto para caracterização fenotípica de rizóbios quanto para as técnicas que empregam métodos moleculares como ARDRA e RAPD dentre outras (McINNES et al., 2004).

Avaliando os índices ecológicos entre os cultivares, é possível observar que todos os cultivares apresentaram índices muito parecidos para a dominância, riqueza e diversidade (Tabela 14), indicando que apesar de haver certa especificidade entre o genótipo vegetal e o microbiano (Tabela 12), ao se analisar todos os isolados não foi possível identificar esta tendência através dos índices ecológicos aplicados.

**Tabela 14.** Índice de diversidade de Shannon-Weaver, de abundância de Simpson e de riqueza de Margalef baseado na diversidade cultural de isolados de rizóbio de guandu de três cultivares de guandu.

Cultivar	Índice Ecológico		
	Shannon-Weaver	Margalef	Simpson
Fava Larga	3,32	7,76	0,05
Carioca	3,27	7,30	0,05
Aratã	3,32	7,31	0,05

A utilização de índices ecológicos na avaliação da estrutura de comunidades microbianas associadas a plantas tem sido adotada em diversos estudos de ecologia de rizóbio (McINNES et al., 2004; JESUS et al., 2005; LEITE et al., 2009). Porém vale ressaltar que estes índices são índices faunísticos que preconizam avaliações regionais da estrutura das comunidades (MAGURRAN, 1989).

#### **1.4.4—Avaliação da Capacidade de Isolados de Rizóbio de Guandu em Metabolizar Diferentes Fontes de Carbono**

A capacidade de isolados de rizóbio em metabolizar fontes de carbono foi avaliada para 160 isolados e 4 estirpes de rizóbio. Todos os isolados foram capazes de crescer em meio de cultura suplementado com manitol (controle) e com sacarose (Tabelas 15 e 16).

**Tabela 15.** Distribuição de isolados de nódulos de guandu e grupos de acordo com a fonte de carbono metabolizada em meio de cultura YMA modificado.

<b>Grupo</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<b>Fonte de carbono*</b>	todas	gli; xil; malt; fru; lac;	gli; xil; malt; fru;	gli; xil; malt; lac; amal	gli; xil; malt; lac	gli; xil;; fru; lac; amal	gli; xil; fru; lac	gli; xil; fru	lac; gli; xil	gli; malt; fru; lac; amal
<b>N° de isolados</b>	<b>28</b>	<b>75</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>7</b>	<b>10</b>	<b>5</b>	<b>3</b>
<b>Grupo</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	<b>20</b>
<b>Fonte de carbono</b>	gli; malt; fru; lac	gli; malt; lac	gli; fru; lac; amal	gli; lac; amal	gli; fru	gli.	xil; malt; fru; lac.	malt.; lac	malt; amal	gli; xil; malt; fru; amal.
<b>N° de isolados</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>7</b>

\*gli.=glicose; xil.=xilose; malt.=maltose; fru.=frutose; lac.=lactose; amal.= ácido málico

**Tabela 16.** Percentual dos isolados capazes de metabolizar as oito fontes de carbono

	<b>Fonte de carbono</b>							
	<b>Manitol</b>	<b>Glicose</b>	<b>Xilose</b>	<b>Maltose</b>	<b>Frutose</b>	<b>Sacarose</b>	<b>Lactose</b>	<b>Ácido Málico</b>
<b>Isolados com crescimento positivo</b>	100%	93%	85%	67%	85%	100%	79%	32%

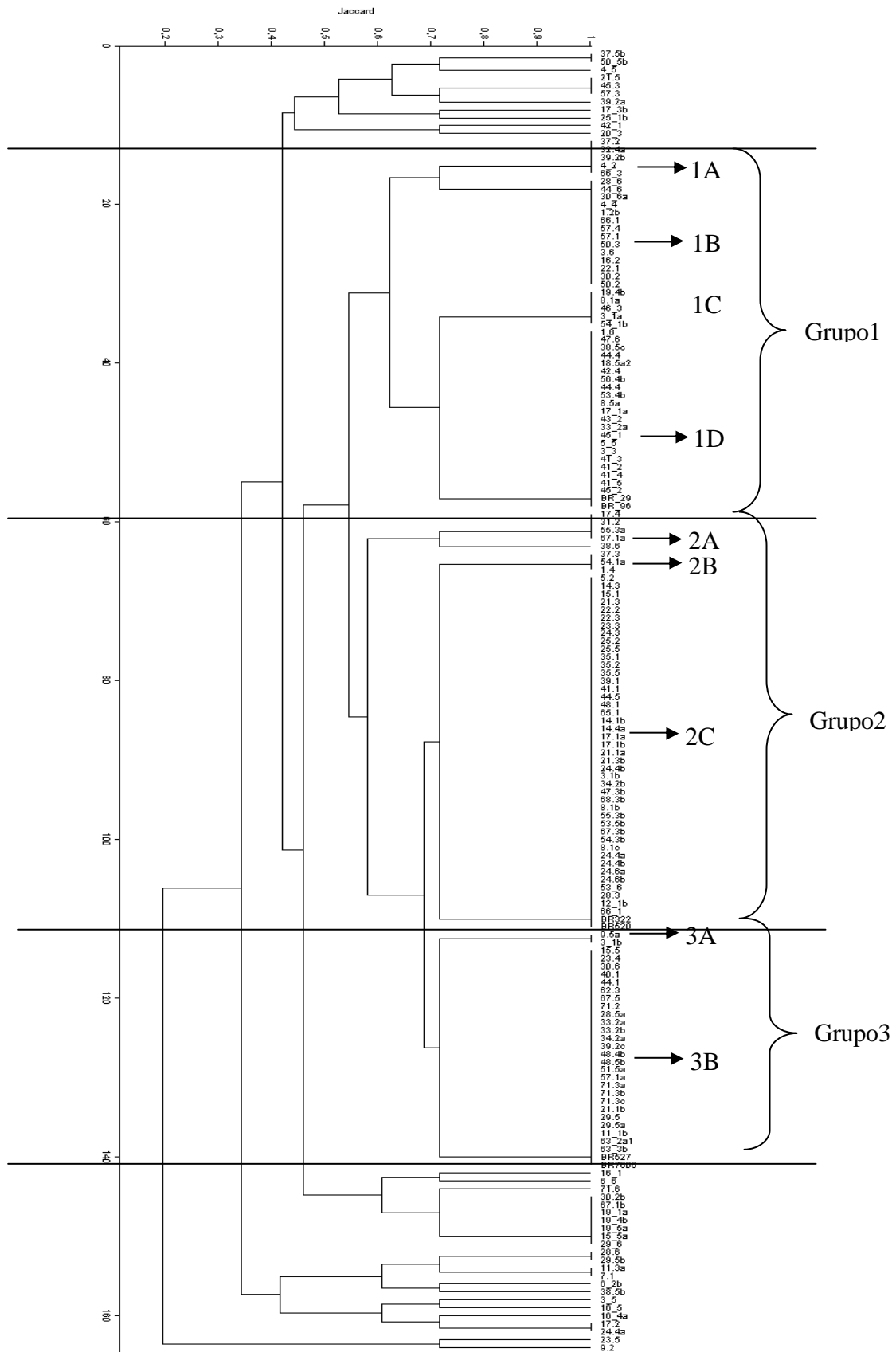
O percentual de isolados que foi capaz de crescer em meios de cultura suplementado com as demais fontes de carbono foi de 93, 85, 67; 85, 79 e 32% para as fontes glicose, xilose, maltose, frutose, lactose e ácido málico, respectivamente (Tabela 16). Diversas estirpes de rizóbio são capazes de crescer em fontes de carbono formada de monossacarídeos como glicose e xilose, por exemplo (VALVERDE et al., 2007). O percentual de isolados que foram capazes de apresentar crescimento em meio de cultura contendo maltose e lactose foi relativamente baixo, se comparado com o percentual de isolados capazes de crescer em meios de cultura contendo outras fontes de carbono como xilose ou sacarose. Resultados similares foram encontrados para rizóbios nodulantes de leguminosas nativas da região mediterrânea (EL IDRISSE e ABDELMOUMEN, 2008).

Poucos isolados foram capazes de crescer utilizando o ácido málico como fonte de carbono (Tabela 16). Outros isolados de rizóbio também apresentaram baixa capacidade em utilizar ácidos dicarboxílicos como fonte de carbono, como por exemplo, oxalacetato e malato (VALVERDE et al., 2006, BERGE et al., 2009), entretanto estirpes de *Azorhizobium caulinodans*, apresenta preferência por metabolizar ácidos dicarboxílicos em detrimento a monossacarídeos como glicose e frutose (TSUKADA et al., 2009). Este mesmo comportamento é apresentado para bactérias diazotróficas pertencentes a gêneros como *Burkholderia*, uma vez que o malato é a fonte de carbono do meio JMV, utilizado para o isolamento e identificação destas bactérias.

O dendrograma baseado na capacidade das bactérias em metabolizar as diferentes fontes de carbono também apresentou elevada diversidade entre os isolados, uma vez que a o coeficiente de Jaccard de similaridade entre todos os isolados foi de aproximadamente 20% (Figura 12). A análise do dendrograma gerado em função da capacidade dos isolados bacterianos em metabolizar diferentes fontes de carbono permite delinear três grupos bem definidos e seus subgrupos, cujas características estão descritas na Tabela 17.

A avaliação da capacidade de isolados bacterianos em metabolizar diferentes fontes de carbono, resultou em um dendrograma onde o metabolismo de fontes como o ácido málico foi fundamental para a formação dos três grupos principais. Estes grupos contem 81% dos isolados e os demais isolados formaram grupos menores divergindo do padrão metabólico da maioria dos isolados. Dessa forma, estes isolados podem representar novos grupos de bactérias com uma versatilidade metabólica muito diferente daquelas apresentadas por estirpes de rizóbio já descritas. Isolados bacterianos de nódulos de raízes de adubos verdes como a crotalária e a canavália também apresentaram a capacidade de metabolizar diversas fontes de carbono, apresentando um perfil metabólico muito diverso em um estudo realizado com bactérias isoladas de solos de regiões costeiras na Índia (SRIDHAR et al., 2005).

Diversas espécies de rizóbio tem sido descritas recentemente apresentando a peculiaridades em seu metabolismo. *Rhizobium cellulositycum* foi descrita recentemente isoladas da maravalha de álamo branco (*Populus alba*) na Espanha e apresenta elevada capacidade de degradar celulose, sendo ainda capaz de nodular alfafa (GARCIA-FRAILE et al., 2007) *Rhizobium selenireducens* também foi descrita recentemente o epípeto específico desta espécie diz respeito à capacidade desta espécie em reduzir selênio em meio de cultura (HUNTER et al., 2008). *Burkholderia ferrarie* que não é capaz de nodular leguminosas, porém é muito próxima às espécies nodulantes *B. tuberum* e *B. mimosarum* descrita recentemente e isolada de grânulos de minério de ferro (VALVERDE et al., 2006).



**Figura 12.** Dendrograma de similaridade em função do metabolismo de diferentes fontes de carbono por 160 isolados bacterianos oriundos de nódulos de guandu, utilizando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard.



**Tabela 17.** Caracterização dos grupos gerados através do agrupamento das bactérias em função da capacidade de metabolizar diferentes fontes de carbono.

<b>Grupo 1:</b> Cresce em manitol, glicose, xilose, sacarose e não cresce em ácido málico.	<b>Subgrupo 1A:</b> Não cresce em lactose e cresce em frutose e maltose.
	<b>Subgrupo 1B:</b> Não cresce em lactose e maltose. Cresce em frutose.
	<b>Subgrupo 1C:</b> Não cresce em frutose e maltose. Cresce em lactose.
	<b>Subgrupo 1D:</b> Não cresce em lactose e maltose. Cresce em frutose.
<b>Grupo 2:</b> Cresce em manitol, sacarose, xilose, maltose. Não cresce em ácido málico.	<b>Subgrupo 2A:</b> Não cresce em frutose e maltose e cresce em lactose e glicose (Exceção para o isolado 38.6 que não cresce em lactose).
	<b>Subgrupo 2B:</b> Não cresce em glicose, crescendo em frutose e maltose e lactose.
	<b>Subgrupo 2C:</b> Cresce em frutose e maltose e lactose.
<b>Grupo 3:</b> Cresce em manitol, glicose, sacarose, xilose, frutose, lactose, ácido málico.	<b>Subgrupo 3A:</b> Não cresce em maltose.
	<b>Subgrupo 3B:</b> Cresce em todas as fontes de carbono

Avaliando o percentual de isolados capazes de metabolizar as diferentes fontes de carbono oriundos de cada um dos solos estudados (Tabela 18), é possível observar diferenças não só na capacidade dos isolados de um determinado solo em metabolizar as diferentes fontes de carbono, como também respostas distintas com relação à capacidade de isolados dos diferentes solos em metabolizar a mesma fonte de carbono.

**Tabela 18.** Percentual de isolados capazes de crescer em meio de cultura suplementados com diferentes fontes de carbono, de acordo com o solo de origem.

Solo	Glicose	Xilose	Maltose	Frutose	Lactose	Ácido Málico
	%					
<b>Latossolo Amarelo</b>	87,0	82,6	56,5	82,6	73,9	26,1
<b>Argissolo Vermelho</b>	94,4	77,8	50,0	66,7	77,8	5,6
<b>Argissolo Acinzentado</b>	100,0	87,5	79,2	95,8	70,8	45,8
<b>Neossolo Flúvico</b>	92,9	78,6	71,4	85,7	78,6	14,3
<b>Argissolo Vermelho-Amarelo (SIPA)</b>	93,8	100,0	68,8	81,3	87,5	31,3
<b>Planossolo Háplico (SIPA)</b>	90,0	75,0	80,0	80,0	75,0	65,0
<b>Argissolo Vermelho-Amarelo (CE)*</b>	96,0	92,0	64,0	92,0	72,0	28,0
<b>Planossolo Háplico (CE)*</b>	94,7	89,5	63,2	89,5	94,7	31,6

\*CE=Campo Experimental

Dentre as fontes de carbono avaliadas, a glicose proporcionou melhor crescimento dos isolados, uma vez que apresentou menor variabilidade no percentual de isolados capazes de metabolizar este açúcar, variando de 87% no Latossolo Amarelo a 100% no Argissolo Acinzentado (Tabela 18). A fonte de carbono que apresentou maior variabilidade entre os isolados oriundos dos solos estudados foi o ácido málico, que proporcionou o crescimento de apenas 5,6 % dos isolados oriundos do Argissolo Vermelho, enquanto 65% dos isolados do Argissolo Vermelho-Amarelo do SIPA foram capazes de metabolizar estas fontes de carbono (Tabela 18). Outra informação importante com relação aos percentuais dos isolados capazes de crescer em meio suplementado com ácido málico é a grande diferença entre os isolados oriundos do Planossolo Háptico do SIPA (65%) e do Planossolo Háptico do Campo Experimental (31,6%), indicando haver influência do manejo do solo na capacidade das populações de bactérias em metabolizar diferentes fontes de carbono (Tabela 18).

Avaliando o percentual de isolados capazes de crescer em meio de cultura com diferentes fontes de carbono agrupando por cultivar de origem, é possível avaliar que para a maioria das fontes de carbono testadas o crescimento foi uniforme para os isolados das três cultivares (Tabela 19). A fonte de carbono que apresentou maior variabilidade no crescimento bacteriano foi a maltose, que permitiu o desenvolvimento de 60 e 63% das bactérias testadas isoladas das cultivares Aratã e Carioca, enquanto 79,2 % dos isolados da cultivar Fava Larga foram capazes de crescer utilizando esta fonte de carbono (Tabela 19).

**Tabela 19.** Percentual de isolados capazes de crescer em meio de cultura suplementada com diferentes fontes de carbono, de acordo com a cultivar de origem.

Cultivar	Glicose	Xilose	Maltose	Frutose	Lactose	Ácido Málico
	%					
<b>Fava Larga</b>	97,9	89,6	79,2	87,5	83,3	39,6
<b>Carioca</b>	95,7	89,1	63,0	87,0	78,3	26,1
<b>Aratã</b>	89,2	80,0	60,0	81,5	73,8	30,8

A capacidade de diferentes bactérias em metabolizar fontes de carbono apresenta influência da planta hospedeira, porém principalmente do genótipo bacteriano de origem, conforme demonstrado para isolados da bactéria diazotrófica *Gluconacetobacter diazotrophicus* obtidos de diferentes genótipos de cana-de-açúcar originários de diferentes regiões do Brasil (BARBOSA et al., 2006; GUEDES et al., 2008). A capacidade de bactérias de nódulos de leguminosas em metabolizar diferentes fontes de carbono sofre influência do genótipo vegetal de origem, mas principalmente do solo (SRIDHAR et al., 2005), conforme sugerido pelos dados do presente estudo (Tabelas 18 e 19).

A utilização de meio YMA para o isolamento de bactérias de nódulos de leguminosas é recomendada desde a década de 1970. Porém a utilização deste meio de cultura pode estar determinando qual a diversidade de rizóbio será acessada, uma vez que a fonte de carbono do meio é o manitol. A utilização de meios de cultura com outras fontes de carbono já foi proposta no intuito de aumentar o espectro de bactérias que são isoladas dos nódulos de leguminosas, principalmente para os estudos de diversidade. Além de apresentar contribuições à taxonomia de rizóbio, os grupos de bactérias nodulantes recentemente descritos podem representar fontes de materiais de interesse biotecnológico conforme será discutido no Capítulo 2.

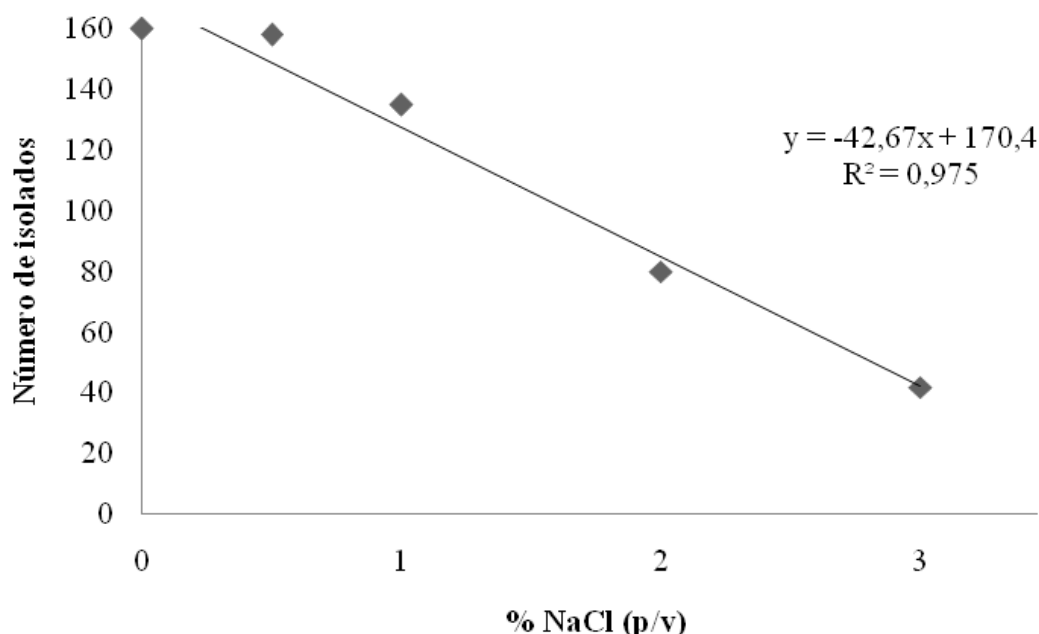
#### 1.4.5–Avaliação da Capacidade de Isolados de Rizóbio de Guandu em Crescer em Meios de Cultura Suplementados com Diferentes Concentrações de NaCl

Os mesmos isolados avaliados com relação à capacidade de crescer em meios de cultura com diferentes fontes de carbono também foram avaliadas com relação à capacidade de crescer em meios de cultura contendo diferentes concentrações de NaCl. Na concentração mais baixa (0,5%) apenas 4% dos isolados não foi capaz de crescer (Tabela 20). Avaliando a concentração de 1%, 18% dos isolados não cresceram. Este percentual aumentou para 52% na concentração 2% e para 75% na concentração 3% (Tabela 20).

**Tabela 20.** Capacidade de bactérias isoladas de nódulos de guandu em crescer em meios de cultura com diferentes concentrações de NaCl.

	Concentração de NaCl (p/v)				
	Controle	0.50%	1%	2%	3%
<b>Isolados com crescimento positivo</b>	160	158	135	80	42
<b>Percentual</b>	100%	96%	82%	48%	25%

O efeito das concentrações de NaCl pode ser observado na Figura 12. Avaliando a origem dos isolados, é surpreendente o grande percentual de rizóbios capazes de crescer em meio com 3% de NaCl. Isolados de rizóbio apresentando crescimento positivo em meio de cultura suplementado com 3% de NaCl já foi observado, porém estes estudos avaliaram o crescimento de isolados de solos salinos de regiões semi-áridas (MEDEIROS et al., 2007; XAVIER et al., 2007b).



**Figura 13.** Efeito da concentração de NaCl no crescimento de isolados de bactérias de nódulos de guandu meio de cultura YMA suplementado com 0; 0,5; 1; 2 e 3% (p/v) deste sal.

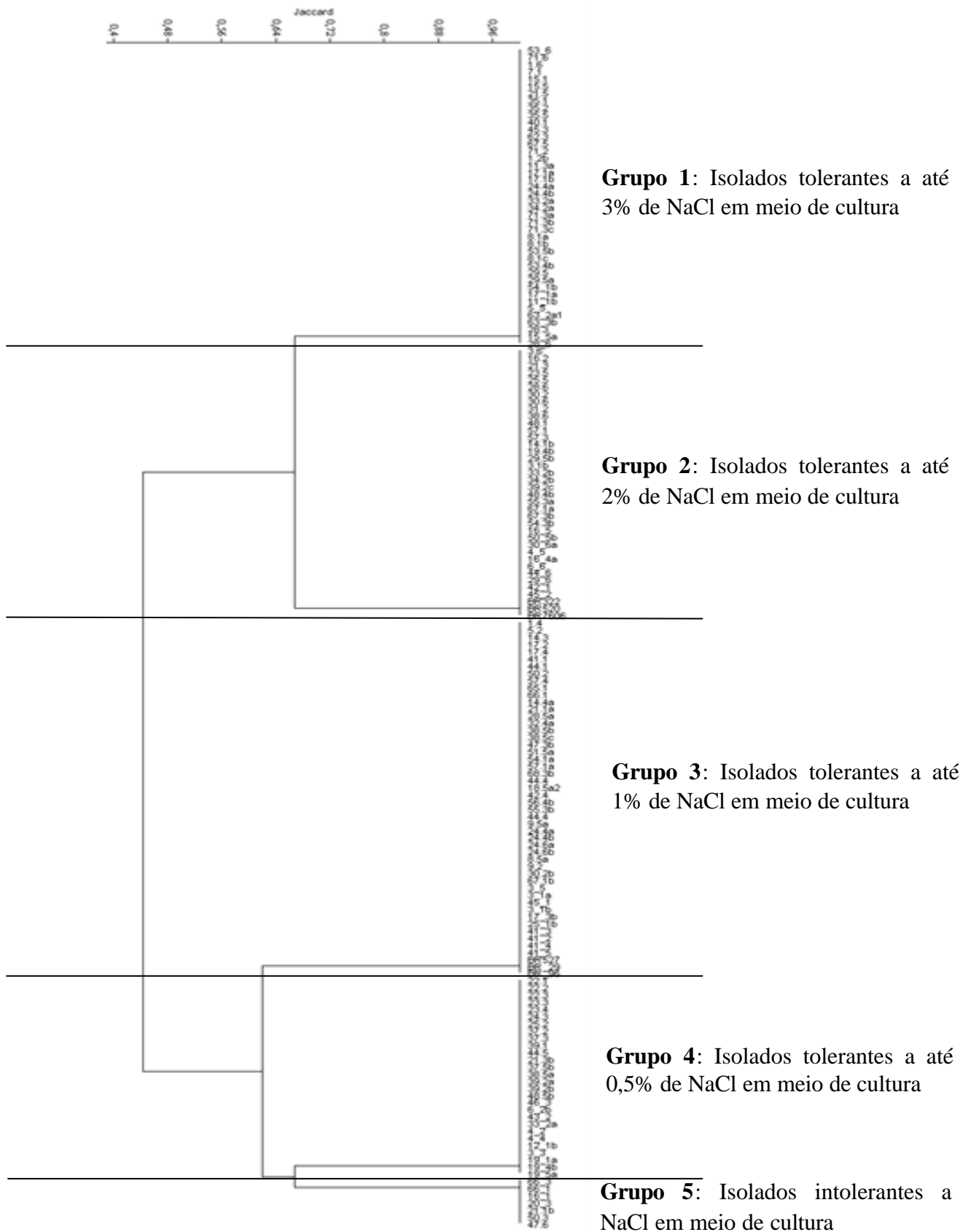
A presença de elevadas concentrações de sais não é uma característica dos solos utilizados neste estudo, portanto esta pressão de seleção não está presente, atuando sobre as populações rizobianas. Porém outros fatores edáficos podem estar relacionados à determinação desta característica, como ocorre com a determinação da resistência intrínseca a antibióticos por isolados rizobianos, por exemplo. Fatores como a concentração de  $Al^{3+}$ , a disponibilidade de fósforo e a produção de antibióticos por microrganismos do solo, pode determinar a capacidade de resistência a antibióticos por rizóbios (XAVIER et al., 1998). Dessa forma, outros fatores edáficos podem estar influenciando na resistência dos rizóbios de guandu a concentrações elevadas de NaCl.

Avaliando o dendrograma gerado a partir da tolerância dos isolados a diferentes concentrações de NaCl, é possível visualizar a formação de cinco grupos com similaridade decrescente, desde a tolerância a 3% de NaCl no meio de cultura até a total intolerância a este sal (Figura 14).

Ao avaliar a capacidade de isolados de rizóbio em crescer em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de NaCl, em função do solo de origem, é possível avaliar que os solos apresentaram influência no comportamento dos isolados (Tabela 21). Isolados bacterianos oriundos dos dois solos do Campo Experimental e do Planossolo Háptico do SIPA, apresentaram um maior percentual de isolados capazes de crescer em meio com 3% de NaCl. Os solos de Pinheiral não apresentaram um percentual de isolados capazes de crescer em solos com 3% de sal, apresentando 8,7 e 11,1% para o Latossolo Amarelo e para o Argissolo Vermelho respectivamente (Tabela 21).

Ao avaliar a capacidade de bactérias isoladas de diferentes solos em crescer em meios de cultura suplementados com NaCl, é comum observar que bactérias oriundas de solos depauperados e de baixa fertilidade natural apresentam a capacidade de crescer em níveis elevados de NaCl (ZAHAN, 1999; NÓBREGA et al., 2004a). Estes resultados não foram encontrados para as bactérias oriundas dos solos Neossolo Flúvico e Argissolo Vermelho, solos com baixa fertilidade e grande quantidade de alumínio trocável. O outro extremo também é relatado na literatura, onde solos com elevada fertilidade não são fonte comum de bactérias capazes de tolerar estresses osmóticos. Os resultados encontrados indicam que os solos com elevada fertilidade representaram fonte de um percentual muito grande de bactérias tolerantes a 3% de NaCl. O Latossolo Amarelo, que apresentou fertilidade muito elevada demonstrou um percentual de bactérias tolerantes ao NaCl muito baixo, corroborando com os dados da literatura.

A capacidade de bactérias dos solos estudados em crescer em meios suplementados com NaCl pode ser avaliada através do coeficiente angular da reta da análise de regressão a partir do percentual de isolados capazes de crescer em cada um dos solos (Figura 15). Bactérias isoladas dos quatro solos de Pinheiral apresentaram coeficientes angulares mais negativos, se comparadas com o perfil das bactérias isoladas dos solos de Seropédica, com exceção para o Argissolo Vermelho-Amarelo do SIPA, que também apresentou coeficiente de regressão linear mais negativo do que o calculado encontrado para os demais solos de Seropédica. Este comportamento pode representar adaptações destas bactérias aos solos com diferentes características químicas. Ao avaliar o perfil de tolerância à salinidade de isolados de bactérias de feijão-caupi de diferentes solos de municípios do Estado do Rio Grande do Norte foi observado resultados similares de tolerância a este sal (MEDEIROS et al., 2007). O mesmo comportamento pode ser observado avaliando a capacidade de isolados bacterianos também de feijão-caupi oriundo de diferentes biomas no nordeste brasileiro (XAVIER et al., 2007).



**Figura 14.** Dendrograma de similaridade em função do crescimento em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de NaCl por 160 isolados bacterianos oriundos de nódulos de guandu. (algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard).

**Tabela 21.** Proporção de isolados capazes de crescer em meio de cultura suplementados com diferentes 0,5; 1; 2 e 3 % de NaCl (p/v), de acordo com o solo de origem.

Solo	Concentração de NaCl (p/v)			
	0,5%	1%	2%	3%
	<b>Percentual de isolados</b>			
<b>Latossolo Amarelo</b>	91,3	65,2	34,8	8,7
<b>Argissolo Vermelho</b>	100,0	83,3	33,3	11,1
<b>Argissolo Acinzentado</b>	91,7	45,8	37,5	12,5
<b>Neossolo Flúvico</b>	92,9	85,7	50,0	21,4
<b>Argissolo Vermelho-Amarelo (SIPA)</b>	100,0	81,3	25,0	18,8
<b>Planossolo Háptico (SIPA)</b>	90,0	80,0	80,0	50,0
<b>Argissolo Vermelho-Amarelo (CE)*</b>	96,0	88,0	68,0	44,0
<b>Planossolo Háptico (CE)*</b>	100,0	100,0	52,6	42,1

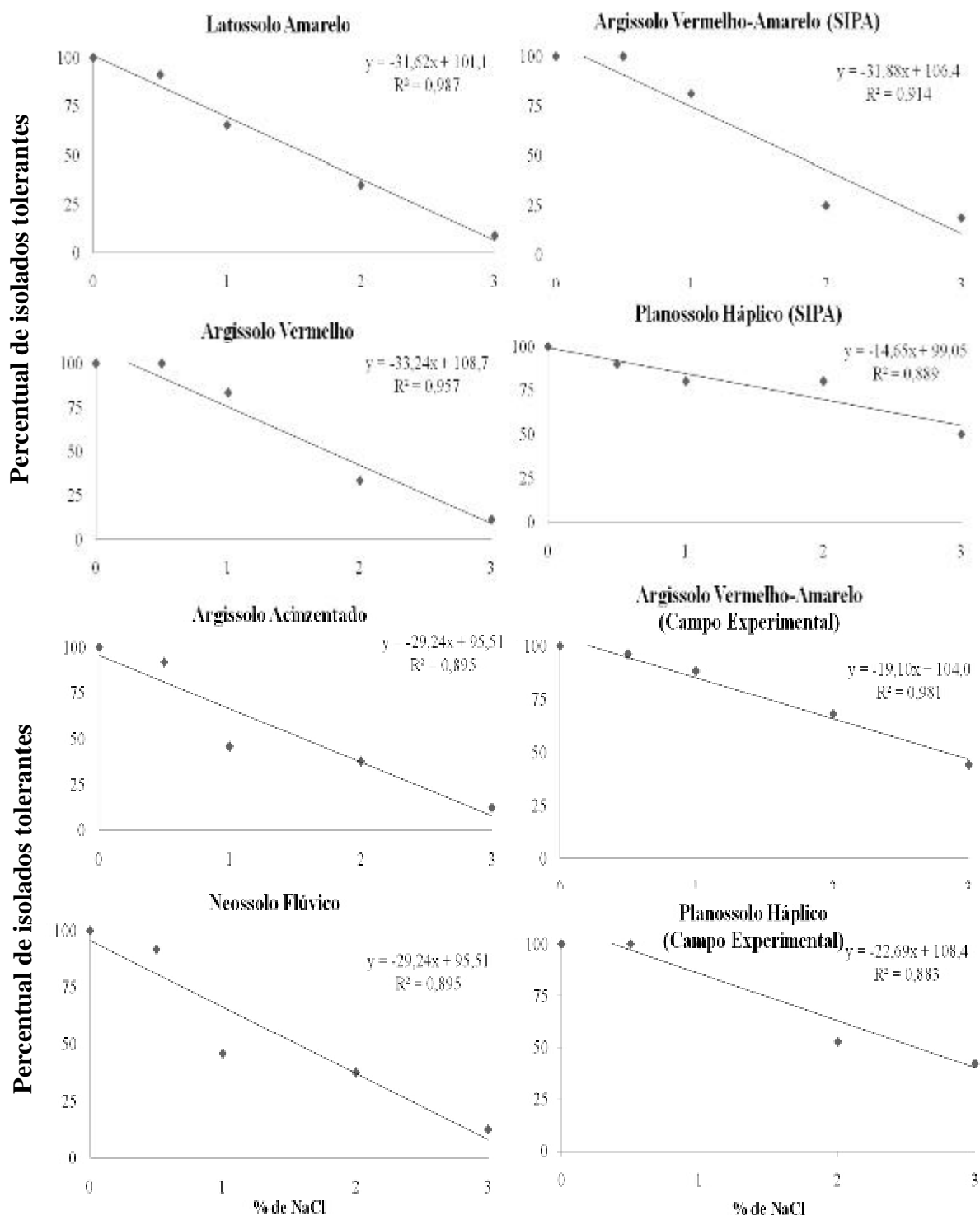
\*CE=Campo Experimental

Os solos amostrados no município de Pinheiral estavam sob pastagens, porém em diferentes situações topográficas e possuem diferentes características químicas. Porém avaliando o perfil de tolerância à salinidade das bactérias isoladas destes solos o manejo parece ter influenciado na seleção de bactérias pouco tolerantes ao NaCl. Já avaliando o perfil das bactérias isoladas dos solos de Seropédica, para os Argissolos, há efeito do manejo no perfil de tolerância dos isolados a NaCl, já que a análise de regressão do perfil de bactérias isoladas do solo com manejo orgânico apresentou coeficiente angular mais negativo, se comparado o perfil do Argissolo Vermelho-Amarelo sob manejo convencional (Figura 15). Para os Planossolos Hápticos, não há indicativo da influência do manejo, pois os coeficientes angulares das análises de regressão apresentaram valores muito próximos e pouco negativos (Figura 14).

A avaliação da sobrevivência de bactérias através do coeficiente angular da reta da análise de regressão já foi proposta para o estudo da sobrevivência de rizóbio em veículos de inoculação (FERNANDES JÚNIOR et al., 2009). Já a proposta da avaliação do coeficiente angular da reta da análise de regressão para a capacidade de bactérias em tolerar diferentes níveis de salinidade coloca-se como uma nova forma de análise para esse estresse abiótico.

Estes resultados sugerem que além das características dos solos, outros fatores estão envolvidos na capacidade de bactérias isoladas de nódulos de guandu em tolerar elevadas concentrações de NaCl. Dentre esses fatores o cultivar de origem, apresentou pouca influência no total de isolados tolerantes a 3% de NaCl, conforme demonstrado na Tabela 22. Os isolados da cultivar Aratã apresentaram apenas 18% com capacidade de crescer em meios de cultura suplementados com 3% de NaCl. Isolados da cultivar Fava Larga apresentaram grande tolerância ao meio de cultura com 2% de NaCl, e foi a cultivar que apresentou isolados com maior tolerância a 3% de NaCl (Tabela 22).

Um efeito bem mais pronunciado da cultivar de origem na tolerância à salinidade de bactérias isoladas de guandu em crescer em meio YMA com diferentes concentrações de NaCl foi encontrado por Nunes et al. (2009). Esses autores observaram que aproximadamente 30% dos isolados (de uma coleção de 76 isolados) apresentam resistência a 3% de NaCl em meio de cultura, havendo um cultivar que apresentou mais de 50% dos isolados tolerantes a 3% de NaCl, enquanto outra cultivar apresentou menos de 15% dos isolados. Estes isolados foram originários da região semi-árida sendo, portanto resistentes a estresses osmóticos.



**Figura 15.** Análises de regressão linear simples entre diferentes concentrações de NaCl em meio de cultura YMA e o percentual de tolerância de isolados de bactérias de nódulos de guandu em função do solos de origem. Todos os coeficientes das equações de regressão foram significativos ao nível de 5% de significância.

**Tabela 22.** Percentual de isolados capazes de crescer em meio de cultura suplementados com 0,5; 1; 2 e 3 % de NaCl (p/v), de acordo com a cultivar de origem.

Cultivar	Concentração de NaCl % (p/v)			
	0,5	1	2	3
Percentual				
<b>Fava Larga</b>	95,8	89,6	64,6	35,4
<b>Carioca</b>	95,7	78,3	43,5	28,3
<b>Aratã</b>	93,8	67,7	40,0	18,5

Mais uma vez, vale ressaltar a capacidade de bactérias oriundas de regiões de solos não salinos que também apresentam elevada resistência a NaCl. Outros estudos avaliando a resistência a salinidade de rizóbios em ambientes áridos e semi-áridos do norte da África também isolaram bactérias que apresentaram tolerância a concentrações muito altas de NaCl em meio de cultura (BRHADA et al., 2001; ESSENDUBI et al., 2007). Avaliando a capacidade de bactérias diazotróficas associativas em tolerar concentrações diferentes de NaCl em meio de cultura, Nóbrega et al. (2004a) encontraram muitos isolados tolerantes a 3% de NaCl em meio de cultura e ainda um isolado tolerante a 5% de NaCl no meio (além de um isolado do respectivo estudo, a estirpe tipo de *Azospirillum irakense* também foi tolerante a 5% de NaCl). Estes isolados foram oriundos de área de mineração de bauxita em Minas Gerais, indicando que a presença de determinados estresses ambientais (no caso a degradação da área) pode resultar na seleção de bactérias que apresentam tolerância a outros estresses conforme discutido anteriormente. Outros trabalhos também ressaltaram que a tolerância a diferentes metais pesados como cobre e cádmio pode estar relacionadas à tolerância a outros estresses ambientais, como a tolerância a estresses osmóticos e a elevadas temperaturas (ZAHAN, 1999; MATSUDA et al., 2002).

Porém, a tolerância a salinidade por rizóbios não oriundos de regiões onde os estresses osmóticos são mais comuns já tem sido relatados na literatura. Resultados similares aos encontrados no presente estudo foram observados ao avaliar a resistência de isolados de *Sinorhizobium* spp. de diferentes plantas em solos sob diferentes sistemas de manejo em Portugal, havendo maior correlação entre solos de origem das bactérias se comparadas com a correlação entre a tolerância/susceptibilidade e o genótipo vegetal de origem (FARELEIRA et al., 2007). Outra espécie de *Sinorhizobium* (*S. arboris*) isolada de *Acacia* spp. também apresentou susceptibilidade a níveis de aproximadamente 3% de salinidade em meio de cultura e, esta resposta apresentou correlação com a nodulação dessas bactérias em solos sódicos (RÄSÄNEN et al., 2004).

Avaliando o padrão de tolerância de estirpes rizobianas à salinidade, Nóbrega et al. (2004b) demonstraram que diversas estirpes de feijão-caupi apresentaram tolerância a 3% de NaCl em meio de cultura YMA. Duas estirpes de solo salino do Ceará também apresentaram elevada tolerância a NaCl e uma estirpe de solo não salino da Amazônia também apresentaram o mesmo padrão de tolerância. Diversos mecanismos podem estar envolvidos na tolerância a estresses osmóticos em bactérias do solo, dentre os quais a produção de trealose (STREETER, 2003; VRIEZEN et al., 2006), PHB (ARORA et al., 2006), betaína e glutamina (RÄSÄNEN et al., 2004). Estes mecanismos estão presentes tanto em bactérias isoladas de solos com maiores concentrações de sais, como em bactérias oriundas de solos não salinos. Este fator pode explicar em parte a presença de um grande número de isolados bacterianos oriundos de solos não submetidos a estresses osmóticos de NaCl em meio de cultura.



A adição de concentração de NaCl em meios de cultura pode representar uma estratégia para aumentar a capacidade de bactérias em tolerar a estresses osmóticos (VRIEZEN et al., 2006). Porém o crescimento de rizóbios em meios de cultura suplementados com diferentes concentrações de NaCl, pode culminar com a redução da viabilidade e/ou a culturabilidade das células rizobianas (LIPPI et al., 2000). Dessa forma a seleção de bactérias que apresentem naturalmente esta tolerância pode representar uma estratégia para a prática da agricultura em regiões marginais, com elevado risco de desertificação e até mesmo para a recuperação de áreas degradadas, decorrente de atividades que aumentem a concentração de sais no solo, como por exemplo, a exploração mineral. O uso equivocado do solo, com práticas culturais não adaptadas às regiões eco-climáticas onde estas se encontram tem colaborado para o aumento da área de solos salinos no mundo todo. É estimado que aproximadamente 40% da superfície terrestre do planeta sejam áreas com potenciais problemas de salinidade (LAL e KHANNA, 1995). A avaliação da capacidade de bactérias em resistir a salinidade “*in vitro*” tem demonstrado correlação com a capacidade dessas bactérias em estabelecer a associação com plantas nestes ambientes (SHAMSELDIN e WERNER, 2005).

A recuperação destas áreas e a adoção de práticas agrícolas nestes solos requerem a introdução de organismos (plantas e microrganismos) resistentes a estresses osmóticos decorrentes da elevada concentração de sais na solução do solo. Vriezen et al. (2006) ressaltaram que estresses osmóticos podem danificar estruturas celulares de bactérias não tolerantes a esses estresses. Mesmo bactérias e genótipos vegetais tolerantes ao estresse salino, podem apresentar FBN ineficiente, em condições de solos salinos, requerendo uma constante prospecção de materiais para a aplicação em solos com estas características (LOPÉZ et al., 2008). O guandu é uma espécie que é adaptada ao cultivo em regiões com solos de baixa fertilidade natural e muitas das vezes salinos, já tendo sido utilizado inclusive para a recuperação de áreas degradadas de solos de área de Mata Atlântica (BELTRAME e RODRIGUES, 2007). Dessa forma, a seleção de rizóbios capazes de nodular o guandu e crescer em meios com elevada concentração de NaCl potencializa a utilização destes pares simbioses em áreas salinas.

#### **1.4.6–Avaliação da Capacidade de Bactérias Isoladas de Nódulos de Guandu em Crescer em Meios de Cultura Incubados em Diferentes Temperaturas.**

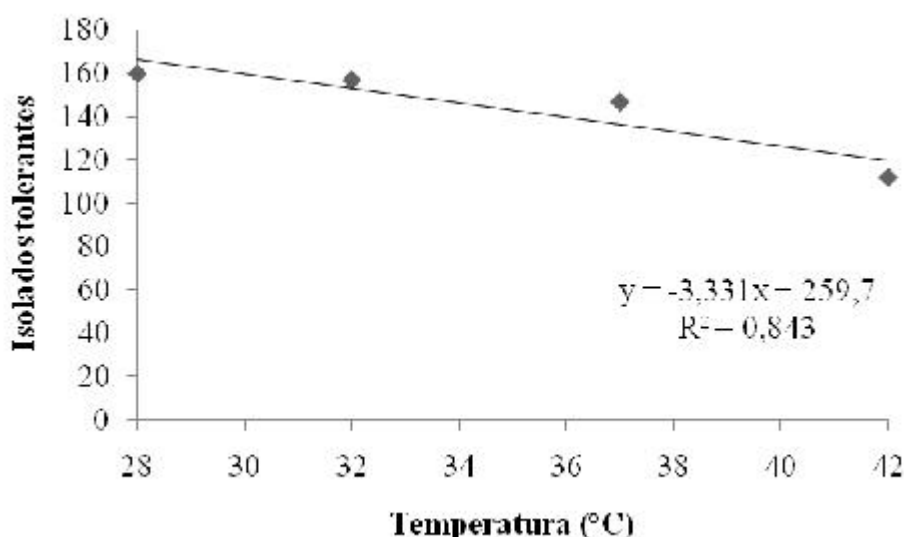
Os mesmos isolados avaliados com relação à tolerância à salinidade foram testados com relação à capacidade de crescer em meio de cultura YMA submetidos a diferentes temperaturas de incubação. Um percentual muito grande dos isolados (73%) foi capaz de sobreviver quando crescido na temperatura mais elevada (42° C) (Tabela 23). Este comportamento pode ser observado por bactérias isoladas de clima tropical, uma vez que estes solos alcançam facilmente temperaturas superiores aos 42° C. Dessa forma, a pressão de seleção por bactérias capazes de se manter viáveis em condições de elevada temperatura existe nos solos estudados. A seleção de isolados bacterianos capazes de crescerem em meios de cultura submetidos a elevadas temperaturas pode ter correlação com o seu desempenho em condições de campo, resultando em bactérias altamente competitivas, capazes de nodular e fixar elevadas quantidades de nitrogênio (MARTINEZ-ROMERO et al., 1991).

**Tabela 23.** Percentual de crescimento de isolados de rizóbio em meio de cultura YMA incubados a 28, 32, 37 e 42° C.

	Temperatura de incubação (°C)			
	28	32	37	42
<b>Isolados com crescimento positivo</b>	<b>160</b>	<b>157</b>	<b>147</b>	<b>112</b>
<b>Percentual</b>	100%	98%	92%	73%

O efeito da temperatura no crescimento das bactérias isoladas de nódulos de guandu pode ser observado na Figura 16, onde a regressão linear aponta para um efeito na redução do crescimento com a incubação em temperaturas mais elevadas.

Conforme discutido anteriormente, a temperatura dos solos estudados pode facilmente alcançar 42°C ou mais, devido às oscilações que naturalmente ocorrem no ambiente tropical, porém as regiões estudadas não apresentam déficit hídrico e a pluviosidade acumulada alcança a faixa de 2000 mm anuais, o que resulta em uma retenção de determinada quantidade de água no solo, atuando como um fator importante, reduzindo as oscilações de temperatura.



**Figura 16.** Efeito da temperatura de incubação no crescimento de isolados de bactérias isoladas de nódulos de guandu meio de cultura YMA.

Bactérias isoladas de nódulos de guandu em região semi-árida do nordeste brasileiro apresentam a capacidade de resistir a mais de 42° C crescendo em meio YMA, conforme demonstrado por Nunes et al. (2009), onde em uma coleção de 76 isolados, mais de 85% foi capaz de crescer quando incubados em temperaturas de 41°C, e mais de 50% foi capaz de crescer quando incubados a temperatura de 45°C. Outro rizóbio (BR 3267 de *Bradyrhizobium* sp.) isolado de solos do semi-árido nordestino, apresenta capacidade de crescer em elevadas temperaturas, e é muito eficiente quando inoculado em feijão-caupi em diversas regiões eco-climáticas do Brasil (MARTINS et al., 2003). Avaliando a capacidade de isolados de bactérias oriundas de nódulos de feijão-caupi em solos do Estado do Rio Grande do Norte, Medeiros et al. (2007) também demonstraram que tolerância a temperaturas elevadas pode ser uma característica intrínseca às bactérias de nódulos oriundas do semi-árido.

A análise do agrupamento gerado através do algoritmo UPGMA, através do

coeficiente de similaridade de Jaccard permitiu destacar a formação de um grande grupo (grupo 1) de isolados capazes de apresentar crescimento, quando incubados até 42°C. Outro grupo menor foi formado por isolados capazes de crescer em temperatura de incubação de até 37°C (grupo 2). O grupo 3, composto por apenas dois isolados é formado por bactérias capazes de crescer apenas no controle a 28°C, enquanto o grupo 4 apresenta bactérias crescidas em meio de placas incubadas em até 32 °C (Figura 17).

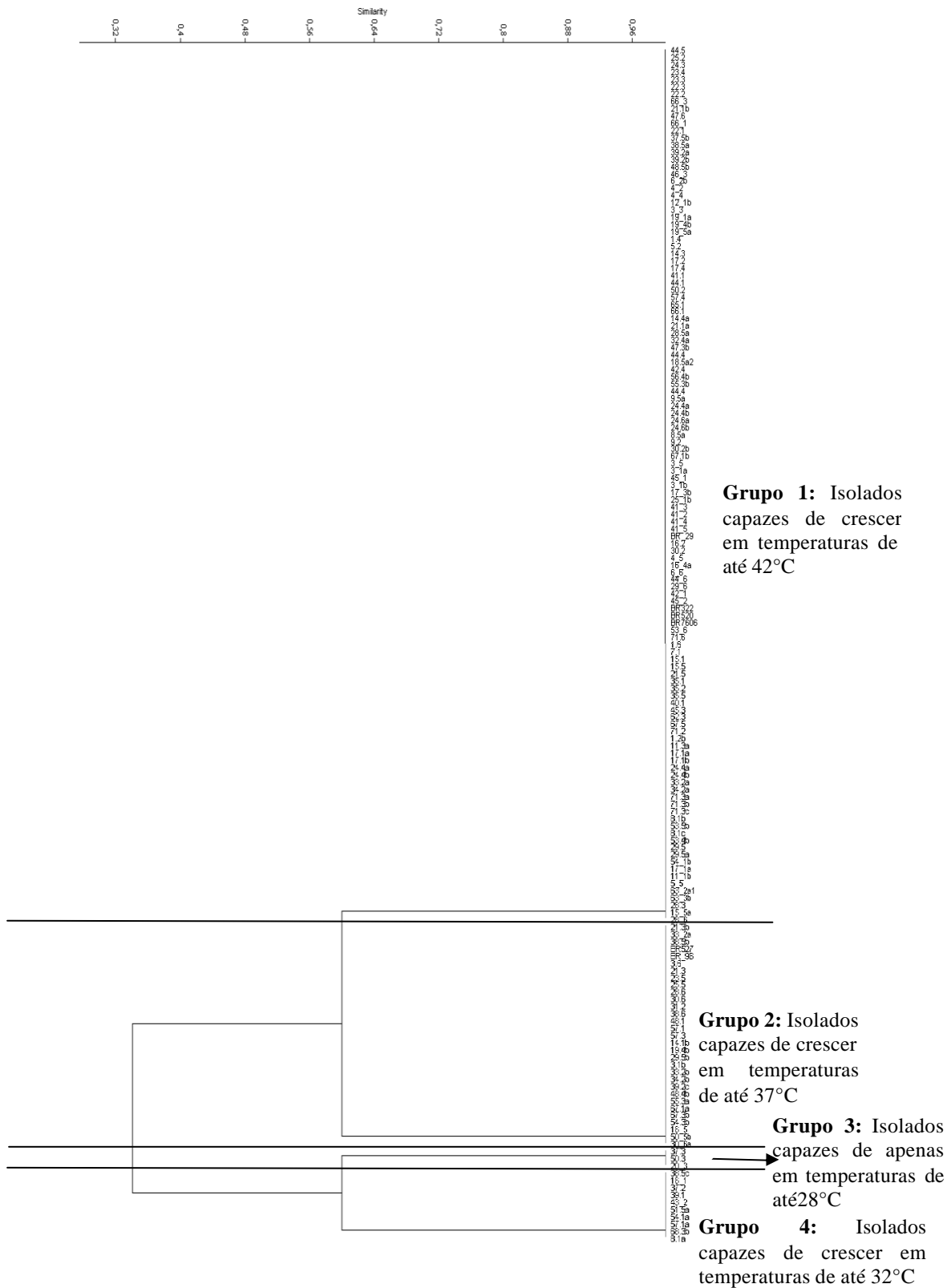
A resistência a salinidade e a temperaturas elevadas são determinadas por diferentes mecanismos celulares, porém costumam ser comuns a bactérias isoladas de regiões de clima árido e condições extremas (ZAHAN, 1999). Das 8 áreas onde foram amostrados os solos utilizados neste estudo, 6 são áreas localizadas no terço superior de paisagem, sendo portanto, solos bem drenados (Tabela 5), que podem resultar em temperaturas elevadas em períodos de estiagens prolongados e veranicos no Estado do Rio de Janeiro. Estas elevadas temperaturas podem atuar como pressão de seleção para as populações de rizóbio existentes no solo, resultando em isolados com maior resistência ao estresse térmico.

Michiels et al. (1994) ressaltam que as bactérias submetidas constantemente a estresses térmicos podem ser resistentes a essas condições “*in vitro*”, porém podem apresentar baixa eficiência para culturas como o feijão comum. Por outro lado, a seleção de bactérias que apresentam a capacidade de resistir a elevadas temperaturas pode resultar em um isolado autóctone, com eficiência para a inoculação em regiões com características semelhantes, como por exemplo, a estirpe BR 3267, isolada da região semi-árida do Nordeste brasileiro e recomendada para a produção de inoculantes para o feijão-caupi no Brasil (MARTINS et al., 2003).

A seleção de materiais genéticos com capacidade de crescer em elevadas temperaturas, e teores de sais representa uma estratégia para a seleção de material biológico com potencial para a utilização em um futuro cenário de mudanças climáticas com o agravamento do efeito estufa e o aumento de áreas marginais com solos depauperados e salinos. Além disso, a seleção desses materiais pode auxiliar na introdução de espécies resistentes em ambientes já degradados em processos eventuais de recuperação dessas áreas (POTVIN e TOUSIGNANT, 1996; BROECKER, 2004). A utilização dos isolados de rizóbios de guandu na planta hospedeira original e em outras leguminosas capazes de estabelecer a associação com estas bactérias, pode representar uma estratégia para recuperação de alguns ambientes em fase de degradação ou já degradados.

Muitos dos isolados que apresentaram crescimento a 42°C também apresentaram crescimento em concentrações de 2 e 3% de NaCl, o que abre a possibilidade de introdução destas bactérias em ambientes muito quentes e de solos salinos, para utilização da cultura do guandu. Como forrageira, o guandu pode representar uma alternativa muito interessante para a produção de gado bovino e caprino em regiões onde há déficit hídrico ou má distribuição das chuvas durante o ano, como no semi-árido do nordeste brasileiro. Uma das limitações para a produção animal extensiva neste bioma é a falta de forragem e de pastagens naturais, além da dificuldade do estabelecimento de uma pastagem sem o sistema de irrigação. Neste contexto e conforme foi descrito para as características fenotípicas das bactérias isoladas no presente estudo, a disponibilidade de um material de alta tolerância a seca e capacidade de resistir a estresse salino pode representar uma estratégia para a pecuária no semi-árido.

Assim como o guandu, outras leguminosas já foram avaliadas com relação à capacidade de fornecer proteína ao rebanho bovino em condições de escassez de gramíneas devido ao pastoreio intensivo e falta de água por reduzida pluviosidade, e o *Stylosantes* foi uma leguminosa que apresentou elevada robustez e capacidade de sustentar grande quantidade de cabeças de gado por hectare (AYARZA et al., 1997).



**Figura 17.** Dendrograma de similaridade em função do crescimento em meio de cultura YMA de 160 isolados de bactérias de nódulos de guandu incubados em diferentes temperaturas (algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard).

#### 1.4.7–Avaliação da Resistência Intrínseca a Antibióticos por Bactérias Isoladas de Nódulos de Guandu

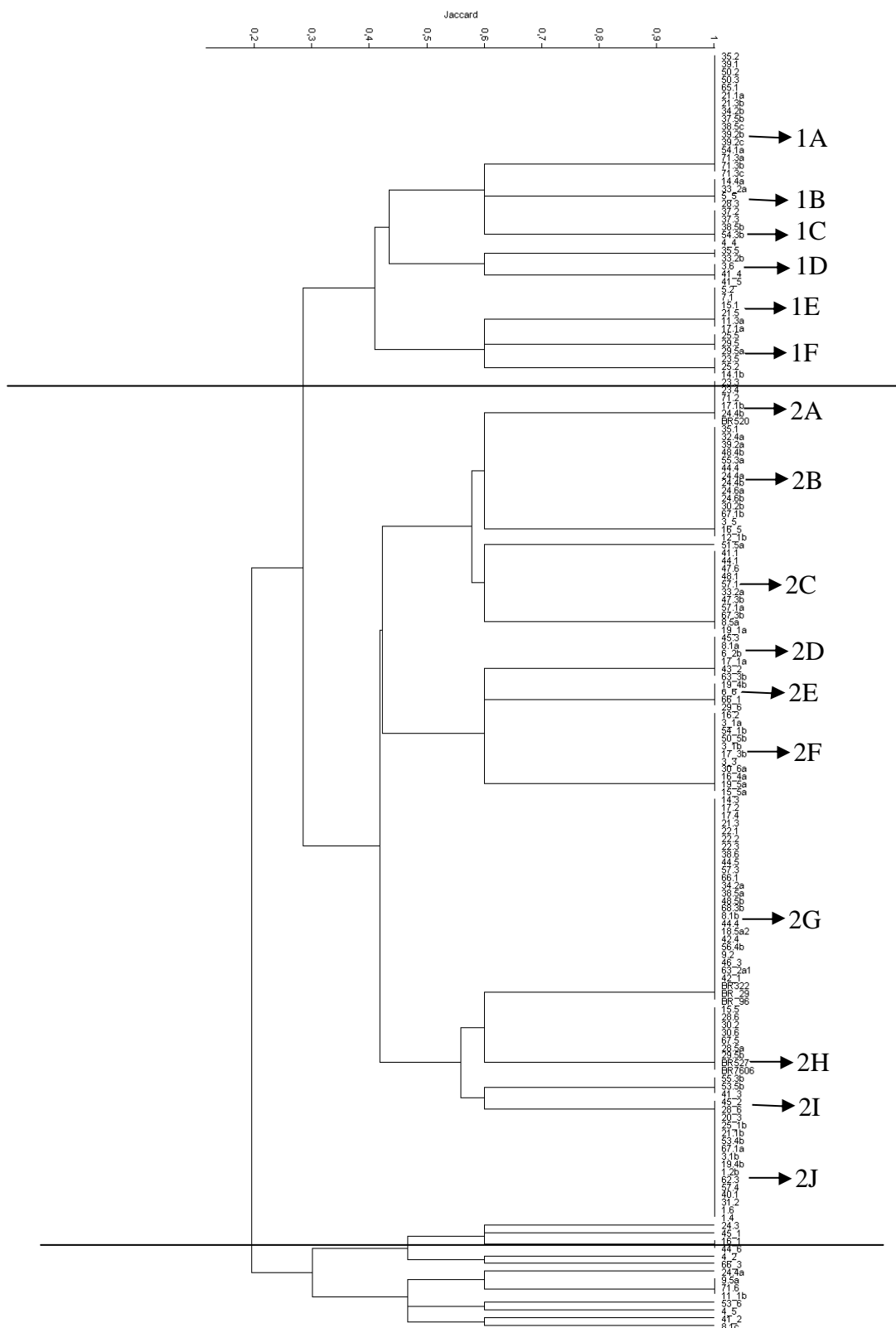
A capacidade dos isolados de guandu em apresentar resistência a antibióticos foi bastante variável. Nenhum isolado avaliado apresentou nível de resistência 3 (capaz de crescer no terceiro terço da placa de Petri, com concentrações de antibióticos entre 332 e 500 mg.L<sup>-1</sup>) a canamicina. Entretanto, a resistência a estreptomina e a ampicilina foi bastante elevada (Figura 18, Tabela 24). No dendrograma podem ser observados dois grupos, o grupo 1 com todos os isolados que apresentaram níveis de resistência 1 (capaz de crescer apenas no primeiro terço da placa de Petri, com concentrações de antibióticos entre zero e 166 mg.L<sup>-1</sup>) a canamicina e 2 (capaz de crescer no segundo terço da placa de Petri, com concentrações de antibióticos entre 166 e 332 mg.L<sup>-1</sup>) a cloranfenicol, e o grupo dois onde a maioria dos isolados também apresentou este padrão (Figura 18, Tabela 24). Os subgrupos se formaram de acordo com o padrão de resistência dos isolados a cada um dos demais antibióticos. O grupo 2I foi representado por apenas 3 isolados, porém foi o grupo onde os indivíduos apresentam resistência nível 2 a canamicina.

A resistência de isolados rizobianos a antibióticos fornece importantes informações a respeito da ecologia dessas bactérias. Estirpes resistentes a diversos antibióticos geralmente apresentam elevada recalcitrância no solo devido à capacidade de resistir à antibióticos produzidos por outros microrganismos (JOSEY et al., 1979).

Diversos fatores genéticos estão relacionados à resistência intrínseca a antibióticos e estirpes muito próximas como as estirpes BR322 e BR520 de *Rhizobium tropici* podem apresentar resistência diferenciada a antibióticos como o cloranfenicol e a canamicina (SOUZA et al., 2003).

No presente estudo, isolados que apresentaram características culturais muito semelhantes foram muito divergentes com relação ao agrupamento no dendrograma gerado. A análise de redundância (RDA) demonstrou elevada correlação entre os parâmetros da fertilidade do solo e os padrões de resistência intrínseca a antibióticos (Figura 19).

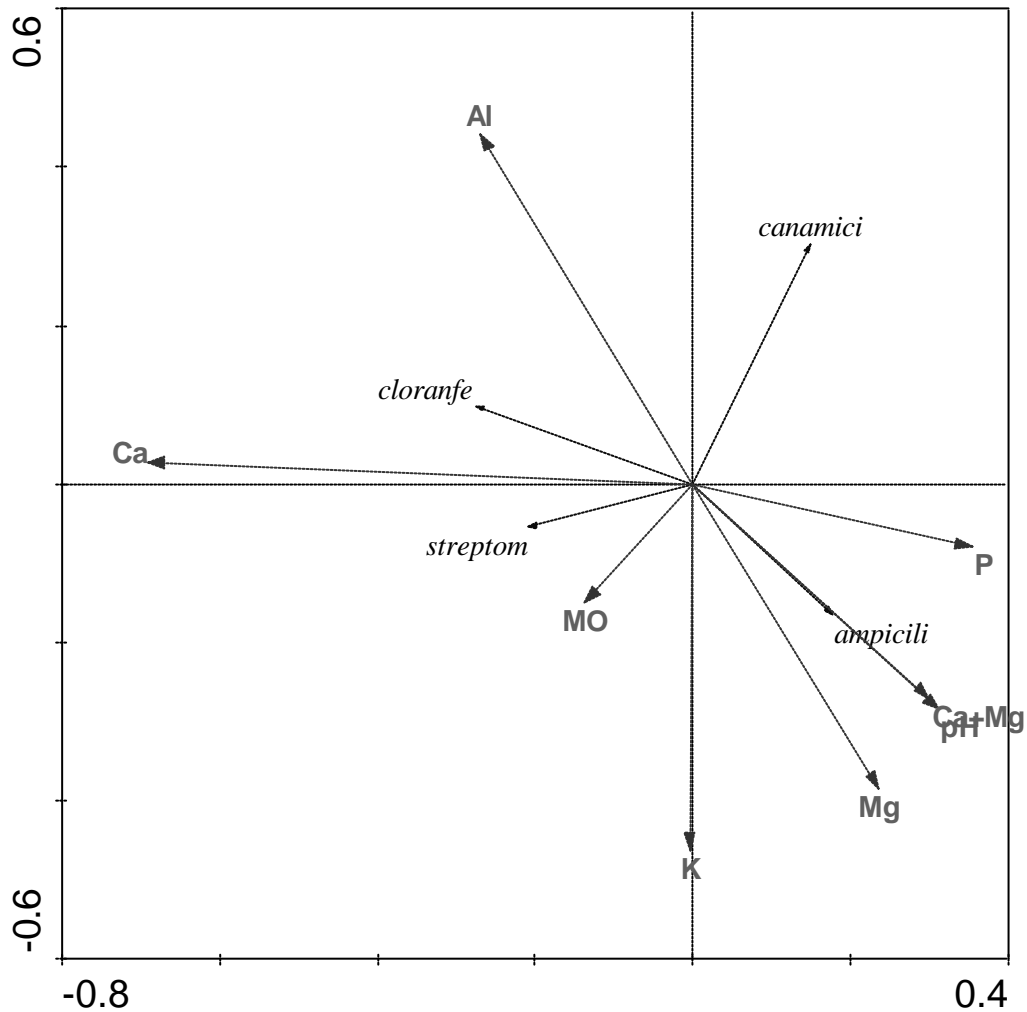
O eixo I, horizontal, explica 38,7% da variabilidade enquanto o eixo II, vertical, explica 29,5% da variabilidade. A resistência intrínseca a ampicilina está fortemente correlacionada aos parâmetros Ca+Mg e pH do solo. A resistência intrínseca a cloranfenicol apresenta correlação com a Al<sup>3+</sup> e Ca<sup>2+</sup>, enquanto a resistência a estreptomina apresentou correlação com a matéria orgânica e com Ca<sup>2+</sup>. A resistência a canamicina apresentou baixa correlação com os parâmetros da fertilidade dos solos avaliados (Figura 19). Avaliando a resistência aos antibióticos de *Rhizobium* spp. isolados de solos da Espanha, Rodriguez-Navarro et al. (2000) foram capazes de identificar isolados que também não se enquadravam nos principais padrões descritos pela maioria dos isolados. Os resultados encontrados no presente estudo, mostrados nas Figuras 18 e 19, corroboram os resultados obtidos por esses autores.



**Figura 18.** Dendrograma de similaridade em função da resistência intrínseca a antibióticos por 160 isolados bacterianos oriundos de nódulos de guandu, utilizando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard.

**Tabela 24:** Descrição dos grupos formados através do agrupamento no dendrograma a partir dos resultados de resistência intrínseca a antibióticos de bactérias isoladas de nódulos de guandu

<b>Grupo 1:</b> Nível de resistência 1 em canamicina e 2 em cloranfenicol	<b>Subgrupo 1A:</b> Resistência 2 em ampicilina e em estreptomicina
	<b>Subgrupo 1B:</b> Resistência 3 em ampicilina e 2 em estreptomicina.
	<b>Subgrupo 1C:</b> Resistência 1 em ampicilina e 2 em estreptomicina.
	<b>Subgrupo 1D:</b> Resistência 2 em ampicilina e 1 em estreptomicina.
	<b>Subgrupo 1E:</b> Resistência 3 em ampicilina e em estreptomicina
	<b>Subgrupo 1F:</b> Resistência 2 em ampicilina e em 3 estreptomicina
<b>Grupo 2:</b> Nível de resistência 1 em cloranfenicol	<b>Subgrupo 2A:</b> Resistência 2 em ampicilina e 3 em estreptomicina e 1 em canamicina
	<b>Subgrupo 2B:</b> Resistência 1 em ampicilina e 2 em estreptomicina e 1 em canamicina
	<b>Subgrupo 2C:</b> Resistência 2 em ampicilina e 1 em estreptomicina e 1 em canamicina
	<b>Subgrupo 2D:</b> Resistência 3 em ampicilina e em estreptomicina e 1 em canamicina
	<b>Subgrupo 2E:</b> Resistência 1 em ampicilina e 2 em estreptomicina e 1 em canamicina
	<b>Subgrupo 2F:</b> Resistência 1 em ampicilina e 3 em estreptomicina e 1 em canamicina
	<b>Subgrupo 2G:</b> Resistência 1 em ampicilina e 2 em estreptomicina e 1 em canamicina
	<b>Subgrupo 2H:</b> Resistência 1 em ampicilina em estreptomicina e em canamicina.
	<b>Subgrupo 2I:</b> Resistência 1 em ampicilina em estreptomicina e 2 em canamicina.
	<b>Subgrupo 2J:</b> Resistência 1 em ampicilina em estreptomicina e em canamicina.



**Figura 19.** Análise de redundância (RDA) relacionando a resistência intrínseca a antibióticos e os parâmetros da fertilidade do solo.

Alguns estudos têm apontado para os fatores edáficos como os principais determinantes da resistência intrínseca aos antibióticos por rizóbios. Xavier et al. (1998) avaliaram a resistência a nove antibióticos por estirpes de rizóbio de feijão-caupi e constataram que os principais responsáveis pelos padrões de resistência aos antibióticos foram os parâmetros  $Al^{3+}$  e fósforo. Karanja e Wood (1988) também avaliaram a capacidade de estirpes de rizóbio em resistir aos antibióticos estreptomomicina e espectinomomicina, evidenciando a relação entre as características dos solos de origem e o padrão de resistência aos antibióticos. Os padrões de resistência a antibióticos não explicados pelos fatores edáficos podem ser relacionados com a transferência horizontal de genes entre estirpes de rizóbio ou entre isolados rizobianos e outras bactérias conforme já descrito para os genes relacionados à simbiose com a planta hospedeira (SULLIVAN e RONSON, 1998).

Rizóbios capazes de nodular guandu isolados da região dos Tabuleiros Costeiros em Sergipe apresentaram elevada resistência a cloranfenicol, sendo capaz de crescer no nível 3, porém também muito sensível a canamicina, crescendo apenas no nível de resistência 1 (FERNANDES et al., 2003a). Comparando com os resultados observados no presente estudo, também foi encontrada elevada sensibilidade a canamicina, porém a resistência a elevadas concentrações de cloranfenicol não foram observadas. Outros isolados de rizóbio oriundos de nódulos de guandu também apresentaram elevada sensibilidade a canamicina, porém, diferentemente dos resultados encontrados no presente estudo, a maioria dos isolados também



foi muito susceptível a estreptomicina (EL HASAN et al., 1986).

Avaliando a resistência intrínseca a antibióticos de bactérias isoladas de nódulos de *Sesbania cannabina*, Chen e Lee (2001) demonstraram que todos os isolados apresentaram sensibilidade a cloranfenicol e a estreptomicina. Alguns dos isolados utilizados neste estudo, também apresentaram resistência a concentrações medianas de canamicina. Recentemente em um estudo de caracterização polifásica de bactérias isoladas de nódulos de plantas nativas da China, Wei et al (2008) encontraram um padrão de resistência onde a maioria dos isolados avaliados apresentou elevada sensibilidade a baixas concentrações de cloranfenicol. Em outro estudo de caracterização polifásica de bactérias formadoras de nódulos em leguminosas utilizadas como forrageiras e adubos verdes na região do Mediterrâneo, na Itália, Safranová et al. (2004) observaram que mais de 50% dos isolados apresentaram elevada susceptibilidade a canamicina e a ampicilina, sendo porém resistentes a estreptomicina. A resistência intrínseca a antibióticos já foi utilizada como uma ferramenta para a identificação de estirpes de rizóbio baseado no perfil de resistência que as estirpes conhecidas apresentavam, em comparação com os perfis apresentados por isolados do solo (BROMFIELD et al., 1982). Atualmente a resistência intrínseca a antibióticos para as estirpes isoladas de nódulos de leguminosa fornece informações relacionadas à fisiologia dessas bactérias bem como à sua adaptação ao meio de origem, sendo muito interessante na caracterização fenotípica e polifásica destes isolados (ALEXANDRE et al., 2006; SPRIGGS e DAKORA, 2009), bem como na avaliação da competitividade de estirpes (SOUZA et al., 2003; BOGINO et al., 2008).

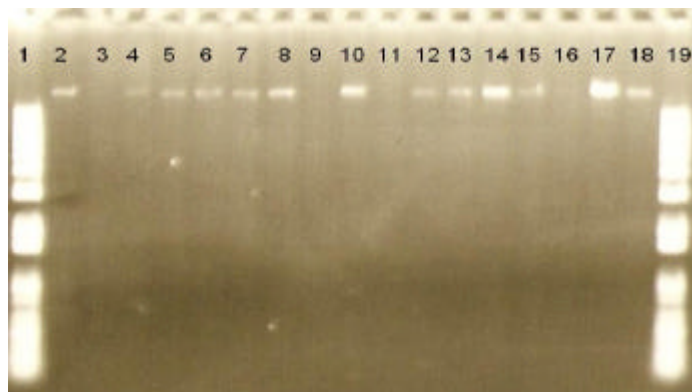
Além de ser relacionada com os parâmetros de fertilidade do solo, a resistência intrínseca a antibióticos pode ser determinada pela seleção de microrganismos devido a competição no ambiente. Diversos microrganismos do solo são capazes de produzir diversos antibióticos e essa capacidade denota uma vantagem competitiva em relação aos demais microrganismos, uma vez que a produção de antibióticos e sua exsudação no meio tende a eliminar os microrganismos susceptíveis. Por sua vez as bactérias resistentes podem competir com os microrganismos produtores de antibióticos do solo. Dessa forma a, a resistência intrínseca a antibióticos por bactérias do solo pode ser determinada tanto por fatores relacionados às características químicas do solo, quanto pela competição entre microrganismos (ALONSO et al., 2001). Os estudos da resistência a antibióticos “*in vitro*” é uma estratégia para a seleção destas bactérias.

Resultados contraditórios em relação à resistência intrínseca a diferentes antibióticos, são esperados, uma vez que diversos fatores ambientais, peculiares dos locais de origem das bactérias podem influenciar no desenvolvimento da resistência intrínseca ou da tolerância a antibióticos (ALONSO et al., 2001).

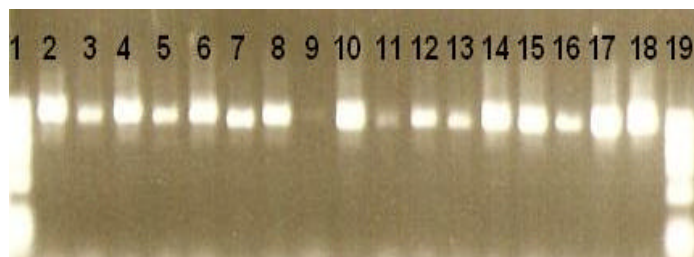
#### **1.4.8–Variabilidade Genética de Isolados Nodulantes Seleccionados Através da Técnica de ARDRA**

A extração de DNA e a amplificação através da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os iniciadores 27F e 1492R (SUZUKI e GIOVANNONI, 1996) foram bem sucedidas (Figuras 20 e 21).

A variabilidade genética de isolados bacterianos através da técnica de ARDRA, utilizando três enzimas de restrição de corte freqüente permitiu a formação de três principais grupos com 20% de similaridade calculado através do coeficiente de similaridade de Jaccard (Figura 22). O grupo 1 foi formado por bactérias do gênero *Azospirillum*, *Azorhizobium* e *Methylobacterium*. O gênero *Azospirillum* compreende bactérias diazotróficas associativas, enquanto os demais foi composto por bactérias capazes de nodular leguminosas, mas que apresentam características genéticas muito peculiares, se comparados com os rizóbios dos gêneros mais “clássicos” como *Rhizobium* ou *Bradyrhizobium* (JAMES et al., 1997; RENIER et al., 2008).



**Figura 20.** Resultado da reação em cadeia da polimerase (PCR) com os iniciadores 27F e 1492R (SUZUKI e GIOVANNONI, 1996) para as bactérias isoladas de nódulos de guandu. Correspondência das linhas: 1- marcador de peso molecular ? 174; 2=24.4a; 3=18.5a2; 4=30.3a1.; 5=18.6; 6=54.3; 7=56.4b; 8=29.5b; 9=14.4; 10=29.5c; 11=42.4; 12=46.4; 13=8.1c; 14=24.4b; 15= 21.5; 16=16.2; 17=16.6; 18= amostra de rizóbio de mucuna (não analisada); 19= marcador de peso molecular ? 174.



**Figura 21.** Extração de DNA de bactérias nodulantes isoladas de nódulos de guandu. Correspondência das linhas: 1- marcador de peso molecular ? 174; 2=24.4a; 3=18.5a2; 4=30.3a1.; 5=18.6; 6=54.3; 7=56.4b; 8=29.5b; 9=14.4; 10=29.5c; 11=42.4; 12=46.4; 13=8.1c; 14=24.4b; 15= 21.5; 16=16.2; 17=16.6; 18= amostra de rizóbio de mucuna (não analisada); 19= marcador de peso molecular ? 174.

O grupo 2, cujos isolados apresentam pouco mais de 45% de similaridade, apresentou uma subdivisão em dois grupos, o grupo 2a, com bactérias pertencentes aos gêneros *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium* e o grupo 2b (65% de similaridade) que engloba os rizóbios do gênero *Rhizobium* e 5 isolados de nódulos de guandu. O agrupamento 3 (aproximadamente 40% de similaridade) apresentou dois subgrupos, um contendo os isolados 56.4b, 8.1c, 54.1, 18.6 e 18.5a2 (50% de similaridade), o subgrupo 3b (50% de similaridade) englobou os isolados 42.4, 30.6a1, 46.4 e as estirpes BR 114 (*B. japonicum*) e BR 2811 (*B. elkanii*) (Figura 22).

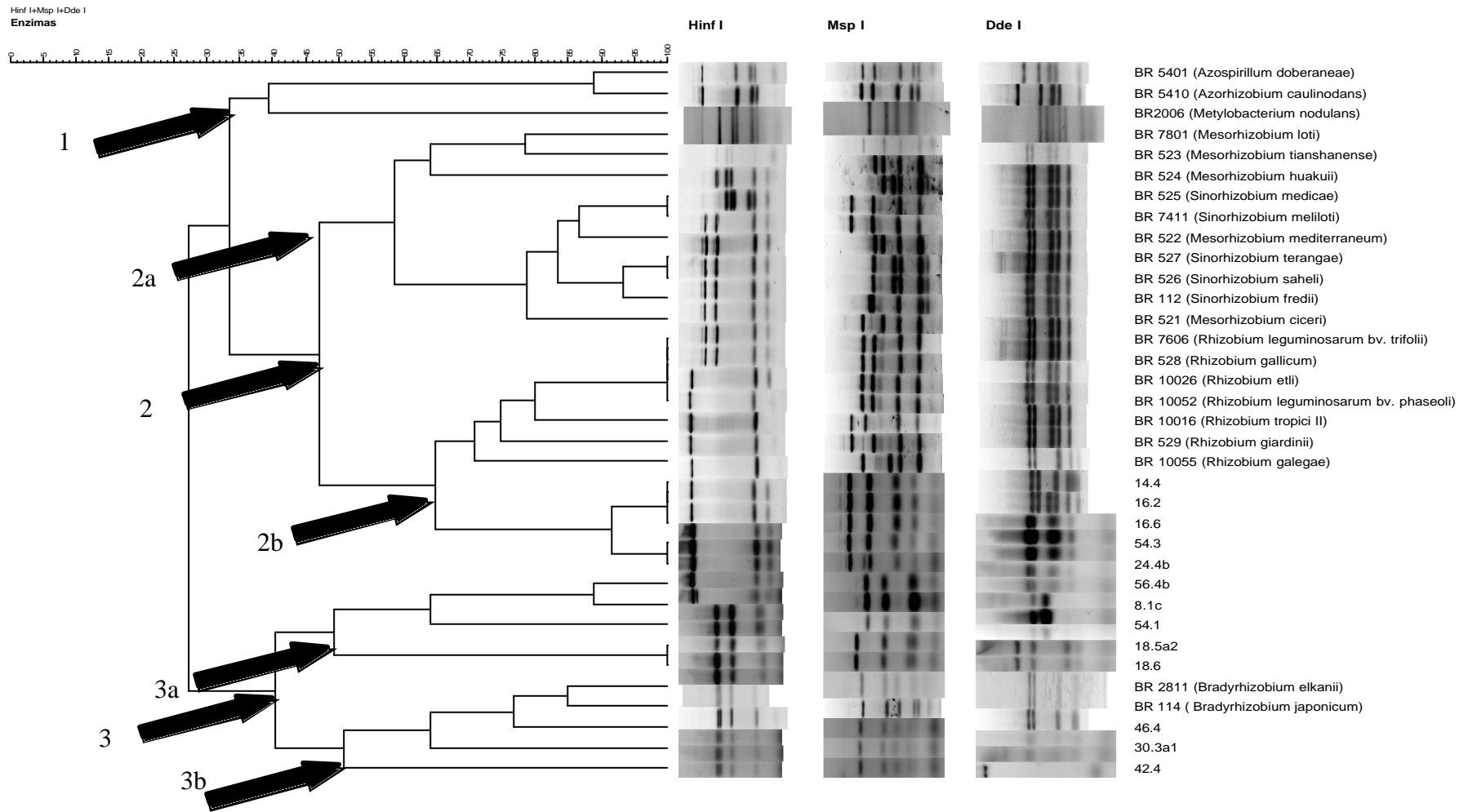
Os isolados 54.1; 8.1c e 56.4b são isolados de crescimento rápido e que acidificam o meio de cultura. Estes isolados foram agrupados com as estirpes do gênero *Bradyrhizobium*, apresentando assim um agrupamento não esperado de acordo com as características culturais. Ao avaliar os géis foi possível visualizar que os perfis de restrição gerados pela enzima *Hinf* I foram muito similares para estes isolados e para as estirpes de *Bradyrhizobium*, assim como observado para a mesma enzima e os gêneros *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium*. Porém grande diferença pode ser observada nos perfis de restrição gerados pelas enzimas *Msp* I e *Dde* I. As características genotípicas de isolados de rizóbio podem não condizer com as características

fenotípicas observadas nas bactérias, daí a importância de uma abordagem polifásica para a caracterização destes isolados, uma vez que integrando as observações dos isolados crescidos em placas de Petri e as avaliações genéticas é possível elucidar com mais clareza as relações entre essas bactérias. O agrupamento de isolados de crescimento rápido com estirpes de *Bradyrhizobium* também já foi demonstrado ao se avaliar a diversidade genética de isolados de nódulos de guandu oriundos dos tabuleiros costeiros no Estado de Sergipe (FERNANDES et al., 2003b). Neste estudo também foram encontrados resultados similares utilizando a técnica BOX-PCR, demonstrando a viabilidade da técnica do ARDRA (técnica molecular de um custo relativamente baixo) para a avaliação da variabilidade genética entre isolados de bactérias capazes de nodular leguminosas.

O agrupamento 2b englobou bactérias de crescimento rápido e intermediário, junto com bactérias do gênero *Rhizobium*, porém não apresentando alta similaridade com nenhuma das espécies utilizadas nesta análise. Estes isolados possivelmente pertençam a este gênero, uma vez que *Rhizobium* é um gênero cosmopolita e contém mais de 28 espécies descritas, e diversas outras propostas segundo o NCBI. *Rhizobium* apresenta espécies com uma gama de características metabólicas, uma vez que as espécies variam de acordo com a velocidade de crescimento, capacidade de metabolizar diferentes fontes de carbono, resistência a antibióticos e produção de biopolímeros. As características de crescimento e produção de muco dos isolados agrupados com estes rizóbios no grupo 2 não são características de espécies de *Rhizobium* utilizadas no agrupamento, porém devido à heterogeneidade que este gênero apresenta, este agrupamento pode plenamente ocorrer.

Estudos utilizando a técnica de ARDRA para o agrupamento de isolados de rizóbio têm demonstrado agrupamentos muito peculiares. Lima (2009) avaliando o perfil de restrição de isolados de mucuna, com as três enzimas também utilizadas neste estudo, demonstrou a formação de grupos muito específicos, onde os padrões de rizóbio não se agruparam com nenhum dos isolados de mucuna avaliados, havendo ainda a formação de um grupo exclusivamente formado com os isolados de mucuna preta, podendo segundo o autor indicar especificidade nessa interação simbiótica. Ao avaliar a diversidade de bactérias formadoras de nódulos em feijão-caupi, com as três enzimas utilizadas neste estudo, Leite et al. (2009) também detectaram o agrupamento de isolados com estirpes de *Rhizobium*, e a formação de outros grupos com um grau de similaridade próximo ao encontrado para as bactérias formadoras de nódulos em guandu. No mesmo estudo, os autores também encontraram a formação de outro grupo de isolados de nódulos de feijão-caupi com as estirpes de *Bradyrhizobium* spp. BR 2811 e BR 114.

Estudando bactérias isoladas de nódulos de feijoeiro através da técnica de ARDRA, Stocco et al. (2009) também detectaram elevada diversidade entre os isolados e a formação de grupos com similaridade em torno dos 60% também foi obtida entre os as bactérias oriundas dos nódulos radiculares do feijoeiro e estirpes do gênero *Rhizobium*. O agrupamento de bactérias de crescimento lento com estirpes de *Bradyrhizobium* também foi demonstrado em um estudo da diversidade genética entre isolados bacterianos de *Cratilia* spp. oriundos da região semi-árida do nordeste brasileiro (TEIXEIRA et al., 2010). Ao avaliar a diversidade genética de bactérias de crescimento lento de guandu, alguns isolados destoaram muito do agrupamento com as estirpes de *Bradyrhizobium* spp. utilizando diversas técnicas moleculares como o ARDRA o AFLP em um estudo com rizóbios de crescimento lento realizado com isolados de Trinidad e Tobago (RAMSUBHAG et al., 2002b). Este padrão não foi obtido na análise de restrição realizada no presente estudo uma vez que as bactérias nodulantes de crescimento lento utilizadas agruparam com os bradirizóbios utilizados. O agrupamento de bactérias de crescimento lento e *Bradyrhizobium* spp. também foi encontrado ao avaliar a diversidade genética de isolados de feijão-caupi em solos do cerrado através da técnica de ARDRA (ZILLI et al., 2004).



**Figura 22.** Dendrograma de similaridade entre 13 bactérias capazes de induzir a formação de nódulos em guandu e estirpes de rizóbio através da técnica de ARDRA utilizando as enzimas de restrição *Hinf I*, *Msp I* e *Dde I*.

Resultados contrastantes para a caracterização de bactérias oriundas de nódulos de leguminosas, principalmente para os adubos verdes são comuns na literatura, revelando uma surpreendente diversidade genotípica entre isolados de diferentes plantas e oriundos de diferentes regiões, desde isolados tropicais e isolados de regiões temperadas.

Ao avaliar a diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de adubos verdes, o agrupamento encontrado geralmente revela o desconhecimento sobre essas bactérias (RAMSUBHAG et al., 2002b; FERNANDES et al., 2003b; LIU et al., 2007; LEITE et al., 2009; LIMA, 2009), o que pode indicar a presença de uma biodiversidade muito grande ainda não acessada, com inúmeras novas espécies ainda não descritas.

Estudos avaliando a diversidade de bactérias em relação à sua versatilidade metabólica são muito importantes para o entendimento da ecologia das bactérias isoladas de nódulos. A capacidade de metabolizar diferentes fontes de carbono, apresentar um determinado perfil de resistência a antibióticos, capacidade de crescer em diferentes temperaturas além da utilização de técnicas moleculares para avaliar a diversidade genética entre isolados, representam uma parte muito importante de uma caracterização bacteriana com a abordagem polifásica. A descrição de diversas espécies de bactérias de nódulos de leguminosas utilizam além de técnicas moleculares como a hibridização DNA-DNA e o sequenciamento total do 16S rDNA a caracterização fenotípica proposta neste estudo. Ainda neste contexto o somatório dessas avaliações fenotípicas traz informações complementares para a descrição minuciosa dos grupos de isolados encontrados, por exemplo, na obra de referência o Manual Bergey's.

#### **1.4.9–Avaliação do Estabelecimento da Simbiose entre Isolados Selecionados nos Testes de Nodulação e o Guandu.**

A partir dos testes de nodulação foram selecionados treze isolados para a realização dos testes para avaliar a capacidade simbiótica (Tabela 24). Avaliando a variável massa de parte aérea seca (MPAS), doze dos treze isolados testados não apresentaram diferença estatística comparando com os tratamentos inoculados com as estirpes recomendadas e ao tratamento que recebeu nitrogênio mineral (Tabela 24). Para a variável massa de nódulos secos (MNS), sete dos tratamentos inoculados com os rizóbios isolados foram estatisticamente iguais aos tratamentos inoculados com as bactérias recomendadas, com destaque para o isolado 18.5a2, que atingiu massa de nódulos secos 10% superior ao tratamento inoculado com a estirpe BR 2801 e 40% superior ao tratamento inoculado com a estirpe BR 2003 (Tabela 24).

Avaliando a variável massa de raiz seca (MSR) todos os tratamentos inoculados foram estatisticamente iguais entre si e apenas um isolado (29.5) foi estatisticamente igual à testemunha absoluta (sem fonte de nitrogênio) (Tabela 24). A massa seca total dos tratamentos inoculados e do tratamento que recebeu nitrogênio mineral apresentou igualdade estatística e apenas dois isolados apresentaram igualdade estatística à testemunha absoluta (Tabela 24).

Resultados similares foram encontrados ao avaliar a capacidade de nodulação e de estabelecer a simbiose entre isolados de rizóbio obtidos de um sistema de produção agroecológica e as estirpes recomendadas para aquela cultura em experimentos em condições de casa de vegetação (PAULO et al., 2009). Também estudando a mesma cultura, Silva et al. (2007a) verificaram nodulação igual entre os isolados testados e a testemunha inoculada com a estirpe recomendada.

**Tabela 24.** Avaliação dos parâmetros do desenvolvimento vegetal de plantas de guandu no experimento de casa de vegetação para avaliar a capacidade do estabelecimento da simbiose por isolados selecionados nos testes de nodulação.

Tratamento	MPAS	MSR	MNS	MST
	mg.planta <sup>-1</sup>			
<b>11.1b</b>	720a	460a*	60b	1333a
<b>53.4r</b>	904a	534a	48b	1842a
<b>29.5b</b>	866a	642a	105ab	1520a
<b>34.6</b>	482b	280ab	57b	913ab
<b>22.1b</b>	596a	312a	66b	1004a
<b>71.6</b>	798a	416a	108ab	1301a
<b>42.4</b>	1082a	770a	150a	1982a
<b>28.3</b>	600a	402a	129ab	1221a
<b>29.5</b>	506ab	244ab	90ab	849ab
<b>56.4b</b>	658a	316a	126ab	1256a
<b>57.3b</b>	612a	494a	60b	1267a
<b>18.5a2</b>	938a	734a	189a	2001a
<b>30.6a2</b>	1052a	644a	162a	1732a
<b>BR2801</b>	998a	614a	135a	1842a
<b>BR2003</b>	912a	648a	174a	1642a
<b>Testemunha nitrogenada</b>	1012a	770a	-	1666a
<b>Testemunha absoluta</b>	422b	210b	-	735b
<b>Coefficiente de variação (%)</b>	43,2	32,4	29,8	37,6

MPAS= Massa de parte aérea seca;

MSR= Massa de raiz seca;

MNS= Massa de nódulos secos;

MST= Massa seca total.

\*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%

O mesmo padrão de nodulação observado entre os isolado e as estirpes recomendadas indica o potencial destes isolados para futuros experimentos em condições não estéreis e de campo. Bactérias isoladas de mucuna também foram capazes de apresentar a nodulação igual àquela apresentada por estirpes recomendadas (LIMA, 2009). Segundo o protocolo da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbiológicos de Interesse Agrícola (RELARE), bactérias candidatas a recomendação devem apresentar desempenho igual ou superior àquelas recomendadas para determinada cultura.

Ao avaliar a nodulação e a fixação do nitrogênio em feijão-caupi, guandu e feijão de porco em condições de casa de vegetação, Fernandes et al. (2003) também avaliaram que alguns dos isolados selecionados apresentaram nodulação estatisticamente igual àquela apresentada pelas estirpes recomendadas.

Dessa forma a nodulação e a produção de matéria seca, principalmente, na parte aérea demonstram o potencial destes isolados para futuros testes em condições não estéreis de casa de vegetação e de campo, indo ao encontro da necessidade de selecionar novas bactérias para a inoculação de adubos verdes como o guandu.

## 1.5–CONCLUSÕES

Isolados de rizóbio de guandu apresentam elevada diversidade fenotípica em todos os solos e cultivares avaliados.

Os isolados de guandu apresentam elevada diversidade com relação aos padrões de resistência a antibióticos, salinidade, temperaturas e capacidade de metabolizar diferentes fontes de carbono. A tolerância a 3% de NaCl foi encontrada em 25% dos isolados enquanto a capacidade de crescer incubados a 42°C foi encontrada em 73% dos isolados.

As variáveis relacionadas à fertilidade do solo estão relacionadas a alguns padrões de resistência a antibióticos, porém outros padrões não apresentam relação com estas variáveis.

O agrupamento em função do perfil de restrição do 16S rDNA agrupou parte dos isolados com estirpes do gênero *Rhizobium* e parte com estirpes do gênero *Bradyrhizobium*, sendo este grupo formado com isolados de crescimento rápido e ácido, intermediário e lento e alcalino.

Os isolados selecionados apresentaram a mesma capacidade de nodular que as estirpes recomendadas, demonstrando o potencial destes isolados para a inoculação nesta espécie, com destaque para o isolado 18.5a2.

## **CAPÍTULO II**

### **PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS, POLIHIDROXIBUTIRATO E AMILASES POR BACTÉRIAS ISOLADAS DE NÓDULOS DE GUANDU**



## RESUMO

Os biopolímeros microbianos têm sido aplicados em diversos setores da indústria. Dentre esses biopolímeros de aplicações diversas destacam-se o polihidroxibutirato (PHB) sintetizados por bactérias e utilizados como reserva de carbono pela célula e os exopolissacarídeos (EPS) e diversas enzimas. A espécie utilizada pela indústria para a produção de PHB é *Ralstonia eutropha*, embora diversas bactérias do solo, como rizóbios tenham essa habilidade, representando fontes alternativas para a produção de destes materiais. Os EPS são produzidos principalmente por estirpes de *Xanthomonas* spp. O objetivo deste estudo foi avaliar a produção de PHB e EPS por bactérias de nódulos de guandu. Foram cultivados 37 desses isolados em meio de cultura YEM líquido e a detecção do PHB foi realizada através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os três isolados que produziram maior quantidade de PHB, foram selecionados para a avaliação da produção de deste polímero após crescimento em meio de cultura suplementado com seis fontes de carbono. Os EPS foram produzidos pelas bactérias em meio líquido, quantificados e avaliados reologicamente. A produção de amilases pela coloração de tintura de iodo também foi avaliada em outro ensaio. Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Dos isolados testados cinco foram capazes de produzir mais de 10 mg de PHB por litro meio de cultura, e ainda produzirem altas concentrações totais de PHB (cerca de 50% da total biomassa). O cultivo de isolados em diferentes fontes de carbono demonstrou que a melhor fonte de carbono para a produção total de PHB foi o manitol, porém fontes como o amido e a xilose também se destacaram tanto para a produção de PHB como para a produção de EPS. As bactérias apresentaram elevada variabilidade quanto à produção de EPS, tendo forte influência da fonte de carbono. Os EPS selecionados para as análises reológicas apresentaram um comportamento não-newtoniano pseudoplástico, embora tenha havido diferenças entre os isolados. Com relação à produção de amilases os um isolado se destacou bastante dos demais onde a halo de degradação do amido atingiu mais de 2,7 vezes o tamanho da colônia. Estes resultados demonstram o potencial biotecnológico dessas bactérias para a produção de biopolímeros.

**Palavras chave:** Biopolímeros. Inovação tecnológica. Reologia. Fluidos não-Newtonianos. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Rizóbio.

## ABSTRACT

Microbial biopolymers had been applied in several industrial sectors. Among the polymers with several applications stands out the polyhydroxybutyrate (PHB) produced by bacteria and used as carbon reserve, the exopolysaccharides (EPS) and several enzymes. The specie used by the industry to produce the PHB is *Ralstonia eutropha*, in spite of several soil bacteria, such as rhizobia, that are able to produce this polymer. The EPS are produced principally by strains of *Xanthomonas* spp. The aim of this study was to evaluate the production of PHB, EPS and amylase by bacteria isolated from pigeonpea root nodules. There were cultured 37 isolates in YEM culture media and the detection of PHB was realized through high precision liquid chromatography (HPLC). The three isolates that produced higher quantities of PHB were selected to evaluate the production of this polymer in culture media with other six carbon sources. The EPS produced by bacteria cultured in liquid media were quantified and rheologically evaluated. Furthermore, the amylolytic activity was evaluated through staining with iodine solution in another assay. The experiments were conducted in a completely random design with three replications. Among the isolates tested five were able to produce more than 10 mg of PHB per liter of media and still produced high concentrations of total PHB (about 50% of total biomass). The cultivation of isolates showed that the better carbon source were the mannitol but other sources such as starch and xylose also pointed out either to the production of PHB and EPS. All bacteria presented high variability regarding the EPS production, with high influence of carbon source. The EPS selected to rheological analyses presented a non-Newtonian pseudoplastic behavior, despite of the differences observed among the isolates. The amylase production evaluation one isolate stands out where the degradation halo reached more than 2.7 folds the colony size. These results show the biotechnological potential of these bacteria for the biopolymers production.

**Keywords:** Biopolymers. Technological innovation. Rheology. Non-Newtonian fluids. High precision liquid chromatography (HPLC). Rhizobia.

## 2.1-INTRODUÇÃO

A utilização de recursos genéticos em vários ramos da indústria, como a farmacêutica, de alimentos, têxtil, dentre outros não é recente na história destas corporações. A aplicação dos insumos biológicos na indústria iniciou com a utilização de biomassa, principalmente vegetal, como na indústria têxtil, utilizando fibras de algodão, ou na indústria alimentícia com a utilização de amido, sacarose dentre outras substâncias oriundas da biomassa vegetal. Atualmente a utilização de biomassa nos ramos industriais ainda ocorre fortemente, porém hoje existe grande aplicação de microrganismos como catalisadores de processos industriais ou como biofábricas de moléculas de interesse (SUTHERLAND, 1998).

Diversos microrganismos são utilizados neste contexto, e três grupos de substâncias podem ser destacados os exopolissacarídeos (EPS), polihidroxibutirato (PHB) e enzimas hidrolíticas como as amilases, por exemplo. Os EPS são amplamente utilizados em indústrias de alimentos, cosméticos e farmacêutico, enquanto o PHB é utilizado principalmente na indústria dos termoplásticos. As amilases também apresentam aplicações principalmente na indústria alimentícia.

O Brasil vem desenvolvendo desde o final da década de 1980, um grande “*know-how*” para a produção de plásticos biodegradáveis, integrando a indústria sucro-alcooleira e a indústria de plásticos, através da seleção contínua de microrganismos e da aprimoração de métodos de produção, extração e purificação de PHB. Essa integração se deu através de um trabalho de cooperação entre a Coopersucar, a Universidade de São Paulo e o Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo. Em 2001 a Coopersucar tinha a capacidade de produzir aproximadamente 10 mil toneladas de PHB por ano, a um custo de produção muito baixo (NONATO et al., 2001). Hoje a maior empresa produtora de PHB e outros polihidroxialcanoatos no Brasil é a Biocycle S.A., localizada no Estado de São Paulo, com a capacidade de produção de 30 mil toneladas de PHB por ano.

O EPS mais utilizado no Brasil é a goma xantana. Grande parte da goma xantana produzida no Brasil é importada, não havendo produção significativa no país, apesar de haver grupos de pesquisa com tradição e bastante estruturados na pesquisa de microrganismos mais capazes de produzir este polímero bem como a utilização de diversos substratos. Alemzadeh (2009) estima que os Estados Unidos, utilizem mais de 10 mil toneladas anuais de gomas produzidas a partir de EPS microbianos. Dessa forma a seleção de bactérias capazes de produzir estas moléculas é interessante do ponto de vista industrial e pode representar alternativas para setores da indústria, uma vez que há esse nicho vago no mercado brasileiro.

A produção de biopolímeros de interesse industrial, nas mesmas condições em que são cultivados os rizóbios na indústria de inoculantes no Brasil, pode representar uma atividade alternativa para este setor, uma vez que a produção de inoculantes no Brasil é muito dependente do plantio da soja, vendendo inoculantes entre o período de agosto a setembro, na época da semeadura desta cultura em todo o país.

No contexto da seleção, a prospecção de novos microrganismos que sejam capazes de incrementar a produção destes polímeros é importante e pode fornecer à indústria recursos genéticos com potencial para novas aplicações desses materiais. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de exopolissacarídeos, polihidroxibutirato e amilases por bactérias isoladas de guandu.

Este trabalho tem como hipótese científica: Isolados bacterianos oriundos de nódulos de guandu cultivado em diferentes solos e, isolados utilizando-se genótipos como planta-isca podem ser capazes de produzir elevadas quantidades de EPS e de PHB, podendo apresentar importantes aplicações biotecnológicas.

## 2.2-REVISÃO DE LITERATURA

### 2.2.1-Exopolissacarídeos

Os exopolissacarídeos (EPS) são metabólitos secundários produzidos principalmente durante a fase estacionária do crescimento microbiano, podendo ser homopolímeros ou heteropolímeros que geralmente são característicos de grupos de microrganismos (SUTHERLAND, 1998). A indústria dos ramos de alimentos e farmacêutico vem há vários anos, utilizando alguns EPS produzidos por bactérias no desenvolvimento de produtos com características de origem biológica de obtenção rápida e barata (SUTHERLAND, 1998).

Diversas aplicações são descritas na literatura para os exopolissacarídeos. A capacidade de aumentar a viscosidade de soluções aquosas mesmo em baixas concentrações, possibilita a sua utilização como agentes espessantes sendo aplicado principalmente na indústria alimentícia (RINAUDI, 2008). Uma aplicação dos EPS no ramo da indústria farmacêutica diz respeito à sua utilização (por exemplo, a goma xantana e gelana) como veículos para diversas drogas, pois este permite a liberação mais lenta e controlada do princípio ativo nestes medicamentos (BILLA et al., 2000; RINAUDI, 2008).

A produção de EPS está relacionada à resistência microbiana em condições de estresses ambientais, como estresses hídricos, térmicos, ausência de substrato e salinidade. Além da relação com a tolerância a estresses ambientais, os EPS estão relacionados a papéis ecológicos dos microrganismos, como a infecção de hospedeiros, a expressão de virulência e os mecanismos de quorum sensing (DENNY, 1995; SANCHEZ-CONTRERAS et al., 2007).

No caso de rizóbios os exopolissacarídeos são importantes na infecção da determinando importantes mecanismos de reconhecimento e aderência da célula à superfície radicular (SANCHEZ-CONTRERAS et al., 2007; WANG et al., 2008). Dessa forma, o estudo dessas substâncias é importante para o melhor entendimento da relação rizóbio-leguminosa.

### 2.2.2-Principais Exopolissacarídeos Bacterianos e suas Aplicações

Os EPS bacterianos podem ser classificados em grupos de moléculas de acordo com as suas características químicas e reológicas. A maioria dos hidrocolóides bacterianos utilizados na indústria recebem a denominação “goma” que tecnicamente é sinônimo de hidrocolóide, porém este termo tem sido mais aplicado aos biopolímeros que tem a capacidade de aumentar a viscosidade de soluções aquosas, mesmo em pequenas concentrações (CUNHA et al., 2004). Dentre os EPS bacterianos mais utilizados na indústria alimentícia e farmacêutica, destacam-se as gomas xantana, curdlana, e as gelanas, cujas propriedades serão discutidas a seguir.

As xantanas são biopolímeros produzidos a partir da fermentação aeróbia de diversas fontes de carbono (amido, celulose, lactose, etc.) principalmente por bactérias do gênero *Xanthomonas* (ANTUNES et al., 2003; DIAZ et al., 2004). *Xanthomonas* é um gênero que apresenta diversas espécies bacterianas patogênicas às plantas cultivadas, causando, dentre outras doenças a murcha, necrose e crestamento (BERGAMIN FILHO, et al., 1995).

A goma xantana é um polímero ramificado, com uma cadeia linear de D-glicoses ligadas na posição 1? 4 e cadeias laterais formadas por trissacarídeos (uma unidade de ácido glucurônico (2? 1) e duas unidades de manose (1? 4)) (CASAS e GARCIA-UCHOA, 1999, MANO e MENDES, 2004; DIAZ et al., 2004).

A estrutura química das gomas xantanas pode chegar a ter pesos moleculares que variam de 3 a 15 milhões (KANG e PETTIT, 1991, apud CASAS e GARCIA-UCHOA, 2000). A solubilidade dessa molécula em água é elevada, dessa forma, quando adicionada em

pequenas quantidades ocorre significativo aumento na viscosidade. (DIAZ et al., 2004). A goma xantana foi o primeiro biopolímero bacteriano a ser comercializado e hoje é muito utilizado na indústria alimentícia e farmacêutica e, mais recentemente tem sido empregada na indústria têxtil (GARCIA-OCHOA et al., 2000).

Estudos de difração de raios X têm demonstrado que as xantanas apresentam conformação em pareamento de cadeias, com pouca interação entre as cadeias laterais, resultando em produtos que não formam o estado gel ou cristalino (SUTHERLAND, 1996). Porém o aumento da temperatura ou a presença de cátions pode resultar em uma goma com maior da interação entre as cadeias laterais dos polímeros, resultando na fusão parcial das duplas hélices e aumento a plasticidade da goma (SUTHERLAND, 2001).

Estudos relacionados à genética e fisiologia de *Xanthomonas* resultaram em linhagens capazes de produzir elevadas quantidades de xantana, sendo capaz de converter até 70% das fontes de carbono que absorve em xantanas de diferentes características e reologias, o que possibilita a produção de gomas com o objetivo de diferentes aplicações (SOUZA e SUTHERLAND, 1994; SUTHERLAND, 2001).

Outro grupo de EPS bastante estudado é o grupo das  $\beta$ -glucanas que são polímeros lineares resultantes de ligações do tipo  $\beta$  entre moléculas de glicose, podendo apresentar diversas conformações de acordo com a posição destas ligações nos carbonos dos resíduos glicosídeos (CHAPLIN, 2008). Dentre as  $\beta$ -glucanas, destacam-se dois biopolímeros as curdlanas e as gelanas devido a sua aplicabilidade industrial. As curdlanas são polímeros lineares com o arranjo molecular formado por ligações  $\beta$  (1-3) em resíduos de glicosídeos. Esses hidrocolóides foram descobertos em 1966 no Japão e receberam o seu nome de acordo com a sua capacidade de coagular (“to curdle”) em soluções aquosas aquecidas (PSZCZOLA, 1997).

Este polímero é produzido principalmente por bactérias do gênero *Agrobacterium* e tem a capacidade de formar géis termoestáveis. Devido à ausência de enzimas capazes de clivar a ligação do tipo  $\beta$  entre glicosídeos, a goma curdlana é amplamente utilizada como fibras em alimentos, representando uma fonte de carboidratos inerte ao metabolismo humano (CUNHA et al., 2004). Outra  $\beta$ -glucana bastante aplicada no ramo das indústrias alimentícias e farmacêuticas é a gelana, que é produzida principalmente por bactérias do gênero *Sphingomonas* e é um heteropolímeros, polieletrólito apresentando um tetrassacarídeo (glicose, ácido glucurônico e ramanose – 2:1:1) como unidade estrutural (BANIK et al, 2000).

Diferentemente das curdlanas, as gelanas apresentam ramificações e as características reológicas das gomas dependerão do grau de ramificação e dos radicais presentes nas cadeias laterais deste polímero (BANIK, et al., 2000). A gelana começou a ser produzida em escala comercial a partir de 1988 no Japão, após a conclusão da avaliação toxicológica deste polímero naquele país. Após a difusão deste produto no mercado japonês, a FDA (Food and Drug Administration) aprovou a sua comercialização nos Estados Unidos a partir de 1992 (SUTHERLAND, 1997; BANIK, et al., 2000). A empresa líder do mercado mundial de EPS como a xantana, a curdlana e a gelana é a Keko Company, com sede nos Estados Unidos (RINAUDI, 2008).

### **2.2.3–Exopolissacarídeos Produzidos por Rizóbios e Outras Bactérias**

As espécies de bactérias formadoras de nódulos em leguminosas diferem bastante com relação à capacidade e a quantidade de EPS produzidos (SUTHERLAND, 1996; CASTELANE e LEMOS, 2007). Os primeiros estudos a respeito da composição química dos EPS rizobianos foram realizados na década de 1970, identificando a capacidade de *Rhizobium meliloti* (atualmente *Sinorhizobium meliloti*) em produzir elevadas quantidades de succinoglucanas, cujos monômeros foram identificados como glicose, galactose, ácido pirúvico e radicais O-acil na proporção (7:1:1:1) (BJORNDAL et al., 1971).

O controle da produção destas moléculas por estirpes de rizóbio envolve a expressão de uma série de genes específicos e a integração com vias bioquímicas importantes como, o ciclo do ácido tricarboxílico. Dessa forma a produção de EPS por rizóbios representa um gasto metabólico muito grande. Essas bactérias utilizam estes polímeros como sinalizadores moleculares na associação com leguminosas e também como moléculas que atuam na proteção dessas células em condições desfavoráveis.

#### **2.2.4–Papel Ecológico dos Exopolissacarídeos em Rizóbios**

Os EPS exsudados pelas células rizobianas apresentam estrutura complexa e também estão envolvidos nos processos de infecção e FBN. A formação do biofilme é fundamental para o sucesso do processo de infecção e depende dos exopolissacarídeos rizobianos. González et al., (1996) demonstraram que mutantes de *Sinorhizobium meliloti* que eram incapazes de produzir um EPS (conhecido com EPS II), não eram capazes de infectar a *Medicago sativa*. Wang et al. (2008) avaliando diversas linhagens de mutantes obtidos através da inserção do transposon Tn5, em *Mesorhizobium tianshanense*, demonstraram que as linhagens incapazes de produzir EPS abundantemente também não formavam biofilme e não eram capazes de nodular a sua hospedeira de origem.

A formação do biofilme para as bactérias formadoras de nódulos é um importante passo para a infecção das hospedeiras, uma vez que é a primeira manifestação das respostas de “quorum sensing” após a produção das AHL (N-acyl-homoserinas), e é importante para o desempenho de seu papel ecológico (RUMJANEK et al., 2004). Esta importância do biofilme para a infecção e formação de nódulos já era conhecida e teve a sua integração com o processo de FBN mais bem entendido após a recente demonstração de que estirpes de rizóbio mutantes nos genes *nod* são incapazes de formar biofilme “*in vitro*” e “*in vivo*” (FUJISHIGE et al., 2008).

As leguminosas apresentam mecanismos de defesa à infecção de células rizobianas similares àqueles apresentados pelas plantas quando são infectadas por bactérias fitopatogênicas. Os EPS de membrana (que não são exsudados no meio e são aderidos à face externa da membrana plasmática) desempenham a função de proteger as células bacterianas dos danos causados pelos mecanismos de defesa além de ser capaz de proporcionar o papel de reconhecimento da célula bacteriana pelo vegetal (MORGANTE et al., 2005; MORGANTE et al., 2007). Rizóbios deficientes na capacidade de produzir EPS de membrana apresentam deficiência na capacidade de infectar o hospedeiro, além de serem mais susceptíveis aos danos celulares causados pelos mecanismos de defesas vegetais (MORGANTE et al., 2007).

Estudos relacionados aos aspectos nutricionais das bactérias após cultivos em meio de cultura e a formação de biofilme revelaram que estresses durante a fase de cultivo com em elevadas temperaturas e alta acidez inibiram a formação do biofilme em *S. meliloti*. Ainda que a adição de concentrações elevadas de cálcio e de fósforo ao meio de cultura resultou em maior formação de biofilme (RINAUDI et al., 2006). A composição dos EPS produzidos por *R. tropici* estirpe CIAT 899 também é alterada após cultivo em meio com elevada acidez (MORÓN et al., 2005).

Além de estar relacionado com o processo de “quorum sensing” e formação de biofilme a produção de muco pode estar relacionada com a proteção das células em condições saprofíticas no solo, uma vez que os EPS rizobianos podem proteger as células de oscilações de temperaturas, teores de  $Al^{3+}$  e elevadas quantidades de sais (HOLLINGSWORTH et al., 1985). O isolamento de bactérias de nódulos de leguminosas de solos álicos revelou uma quantidade muito maior de bactérias com produção de muco muito abundante, se comparada com o total de bactérias com pouca produção de EPS (HARA e OLIVEIRA, 2004).

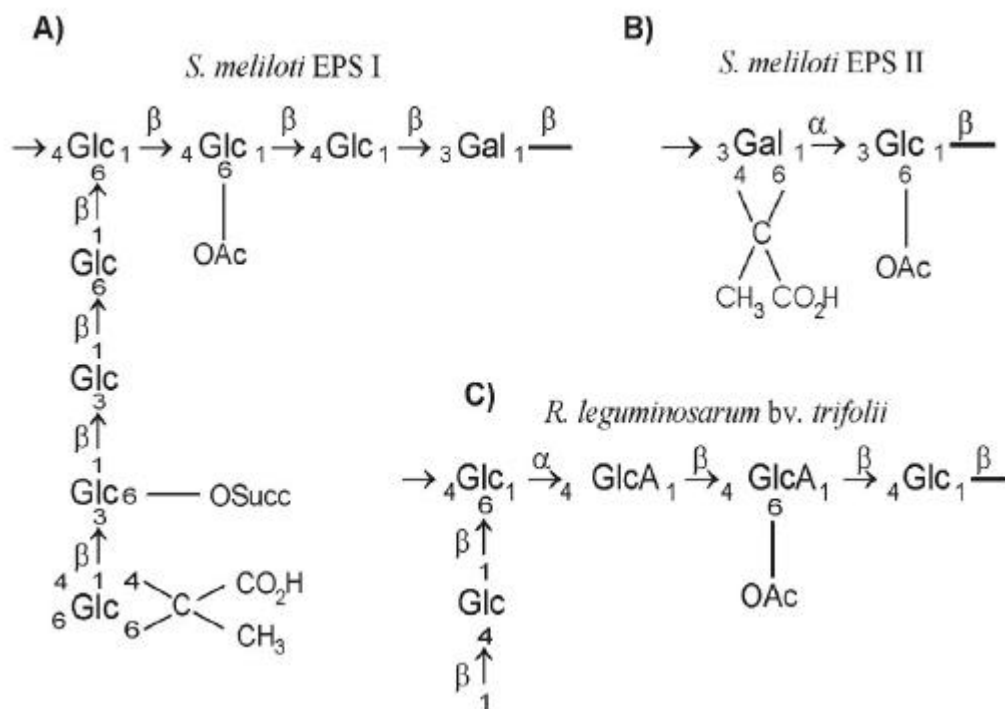
A estrutura dos exopolissacarídeos de regiões tropicais ainda é pouco conhecida e os estudos de descrição de moléculas são restritos a espécies associadas a plantas de interesse

agrícola oriundas de regiões de clima subtropical ou temperado. Dentre estas se destacam *Sinorhizobium meliloti* e (GONZALÉZ et al., 1996; SKORUPSKA et al., 2006) *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (SKORUPSKA et al., 2006; JANCZAREK et al., 2009).

### 2.2.5–Estrutura dos Exopolissacarídeos Rizobianos

A espécie *S. meliloti* apresenta dois principais EPS exsudados: as galactoglucanas (EPS II) e as succinoglicanas (EPS I). EPS II é um polímero composto por monômeros dissacarídeos formados por galactose-glicose ligados através de ligações do tipo  $\beta$  (Figura 4) (SKORUPSKA et al., 2006), esses EPS apresentam menor peso molecular que EPS I e os genes envolvidos em sua síntese são menos conhecidos do que aqueles envolvidos na síntese dos EPS I. Os EPS I são polímeros compostos por octassacarídeos, compostos por glicose-galactose (7:1) ligados também através de ligações do tipo  $\beta$  (BECKER et al., 2002; SKORUPSKA et al., 2006) (Figura 23). Diversos genes localizados em um dos megaplasmídeos e no cromossomo de *S. meliloti* são envolvidos na síntese do EPS I.

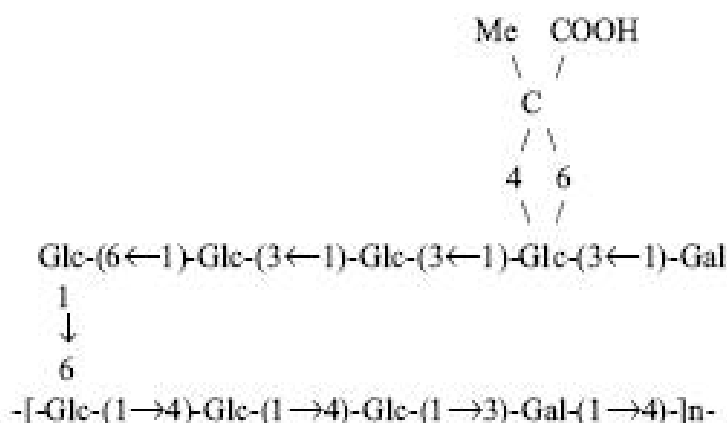
Além de estarem relacionados com a produção de EPS I, esses genes apresentam atividades relacionadas à síntese de outros compostos celulares, uma vez que o silenciamento de alguns desses genes resulta em redução da síntese de compostos como EPS II,  $\beta$ -glucanas e EPS de membrana celular (SKORUPSKA et al., 2006). Mutantes de *S. meliloti* não produtores destes EPS são incapazes de induzir a formação de nódulos em alfafa (GONZALÉZ et al., 1996). *R. leguminosarum* bv. *trifolii* apresenta o principal EPS com um monômero formado por cinco moléculas de monossacarídeos, principalmente glicose ligadas através de ligações do tipo  $\beta$  (Figura 22) (SKORUPSKA et al., 2006). Recentemente a inibição de genes responsáveis para a síntese dos monômeros dos EPS de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, e para a polimerização destes monômeros resultou na incapacidade de isolados desta espécie em formar nódulos em *Trifolium* sp. o hospedeiro original (JANCZAREK et al., 2009), demonstrando a importância desses EPS na infecção da planta hospedeira pelo rizóbio.



**Figura 23.** Monômeros dos exopolissacarídeos de *Sinorhizobium meliloti*. A: EPS I; B: EPS II e de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (C). (glc-glicose; gal-galactose, Succ-succinato; Ac- acetil)Figura retirada de SKORUPSKA et al. (2006).

Bactérias formadoras de nódulos oriundos de clima temperado e de climas tropicais apresentam características diferentes de acordo com as pressões de seleção as quais estas bactérias estão expostas em seus ambientes naturais. *Sinorhizobium meliloti* é uma espécie de clima temperado, nodulante de alfafa e outras espécies do gênero *Medicago* originárias da região de latitudes medianas e altitude elevada do hemisfério norte (ROUMIANTSEVA et al., 2002). Dessa forma as características dos EPS de rizóbios tropicais provavelmente apresentam diferenças em relação àquelas espécies modelo estudadas em clima temperado. Estudos relacionados à análise da estrutura de EPS de rizóbios oriundos de regiões de clima tropical são escassos na literatura.

Poucos isolados bacterianos de origem tropical têm a estrutura de seus exopolissacarídeos elucidada e as espécies que tem estes EPS estudados revelam estruturas completamente distintas daquelas estruturas encontradas em EPS produzidos por espécies de origem temperada. Wei et al. (1996) estudou as características químicas de EPS de *Sinorhizobium fredii*, um rizóbio isolado de regiões de clima tropical, e demonstrou que as características químicas destes diferem das de *S. meliloti* e que as unidades repetitivas destes polímeros ramificados são nonasacarídeos formados por glicose-galactose (7:2) (Figura 23).



**Figura 24.** Monômero dos EPS de *Sinorhizobium fredii* (glc- glicose; gal- galactose). Figura retirada de WEI et al. (1996).

A avaliação da composição de EPS de rizóbio isolado de mungo verde (*Vigna mungo*), sugere a presença do pentassacarídeos Manose<sub>4</sub>-Ribose<sub>1</sub>, como monômeros de um EPS de peso molecular aproximado de 750 kDa (MANDAL et al., 2007). Outra bactéria diazotrófica *Burkholderia brasiliense*, não nodulante, porém filogeneticamente próxima às *Burkholderia* spp. capazes de nodular leguminosas também apresenta características muito peculiares com relação à estrutura dos EPS (MATTOS et al., 2001).

Assim, a estrutura de EPS de rizóbios de diferentes origens pode auxiliar a explicar as peculiaridades de adaptação que as espécies rizobianas apresentam aos seus ambientes. SKORUPSKA et al. (2006) sugerem ainda que a diversidade de EPS produzido por estirpes de rizóbio seja utilizada como critério de classificação taxonômica dos isolados.

## 2.2.6–Avaliação da Produção de EPS Bacterianos

Diversos estudos têm sido conduzidos no intuito de avaliar a quantidade de EPS produzido por diversos grupos de bactérias, bem como as condições de cultivo que influenciam neste processo. Inicialmente, ao cultivar estirpes de rizóbio em meios de cultura era desejado que a quantidade de muco produzido por estas bactérias fosse reduzida



principalmente em meio líquido para facilitar o manuseio destas culturas bacterianas com relação à produção de inoculantes uma vez que a viscosidade do meio atrapalhava a centrifugação e a filtragem das culturas celulares, chegando a ser desenvolvidos meios de culturas específicos para suprimir a produção de EPS (TULLY, 1985).

Desde então é compreendida a influência da formulação do meio de cultura na produção de EPS pelas estirpes rizobianas. Diversas estirpes de rizóbio são capazes de produzir grandes quantidades de EPS em meios de cultura, variando de acordo com a formulação do meio, principalmente com a fonte de carbono, (TAVERNIER et al., 1997; CASTELLANE e LEMOS, 2007) e de sais (DUTA et al., 2005). Ao cultivar uma estirpe de *Rhizobium* sp. em diferentes meios de cultura, Duta et al. (2005) constataram que a concentração de carbonato de cálcio foi determinante para a produção de EPS, quando as bactérias foram cultivadas em determinadas condições de agitação e areação. Tavernier et al. (1997) verificaram a influência da fonte de carbono na produção de EPS por duas estirpes de rizóbio, observando que a frutose era a fonte de carbono que possibilitou a produção de EPS mais abundantemente por uma estirpe e glicose para a outra.

Uma estratégia para aumentar a reprodução de células e a produção de EPS por rizóbios em meios de cultura pode ser a inclusão de uma pequena concentração de flavonóides no meio. A incubação de células rizobianas em meios de cultura líquidos, suplementados com flavonóides sintéticos ou suspensões de sementes de leguminosas tem resultado em maior crescimento bacteriano em meio de cultura e maior eficiência na formação de nódulos em plantas hospedeiras.

Mercante e Franco (2000) demonstraram que a produção de meios de cultura utilizando água com exsudados de sementes de feijão comum e de mimosa resultaram em maior crescimento dos rizóbios inoculados e em expressão dos genes nod de rizóbios *in vitro*. A suplementação de meios de cultura com pó de sementes de *Amaranthus* sp. resultou em maior concentração de células rizobianas durante todas as fases de crescimento do meio de cultura. Além disso, os autores verificaram que a nodulação de soja também foi maior quando as sementes foram inoculadas com rizóbios em crescidos em meios de cultivo com a suplementação citada (LORDA et al., 2007).

Além de resultar em maior proliferação bacteriana em meio de cultura, a suplementação desses meios com flavonóides pode resultar em maior produção de EPS em *S. fredii* (LIN et al., 1999) e em *Bradyrhizobium japonicum* (DUNN et al., 1992; LANG et al., 2008). Em alguns rizóbios, os flavonóides suplementados nos meios de cultura podem inclusive resultar em alteração da estrutura e do peso molecular dos EPS exsudados (DUNN et al., 1992).

### **2.2.7–Polihidroxicanoatos**

O polihidroxicanoatos (PHAs) são um conjunto de poliésteres de composição similar a termoplásticos derivados de petróleo (BYROM, 1987; SILVA et al., 2001). Este polímero é produzido por uma série de microrganismos em determinadas condições como a abundância (ANDERSON e DAWES, 1990) ou ausência (POVOLO e CASSELA, 2004; RATCLIFF et al., 2008) de fontes de carbono ausência de nutrientes (TAVARES et al., 2004) ou ainda, elevada pressão osmótica devido ao aumento da concentração de sais (ARORA et al., 2006).

#### **2.2.7.1–Composição química e estrutura dos polihidroxicanoatos**

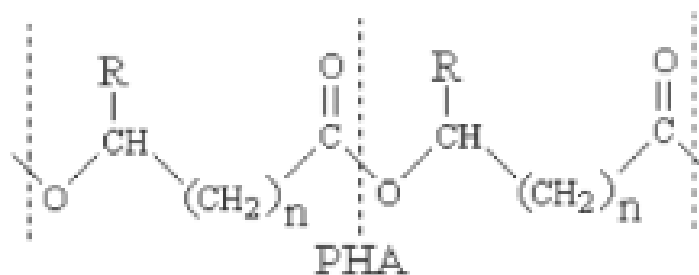
Os PHAs podem ter pesos moleculares que variam de 50 a 1000 kDa, porém a maioria destes compostos alifáticos não tem despertado interesse comercial devido à presença de muitas impurezas e substância de peso molecular abaixo de 20 kDa (MARCHESSAULT, 1996). O PHA produzido em maior quantidade pelas células bacterianas é o polihidroxibutirato (PHB), polímero que tem despertado muito interesse da indústria

petroquímica devido às suas características comuns a polímeros derivados de petróleo comumente utilizados para a produção de plásticos, como o polipropileno, por exemplo (Tabela 25) (ANDERSON e DAWES, 1990, SILVA et al., 2004).

**Tabela 25.** Comparação entre algumas propriedades do polihidroxibutirato e do polipropileno (Adaptado de MADISON e HUISMAN, 1999).

Parâmetro	Polihidroxibutirato	Polipropileno
Temperatura de Fusão	177°C	176°C
Temperatura de congelamento	2°C	-10°C
Cristalinidade	70%	60%

A estrutura dos PHAs é constituída por uma cadeia linear de 3-hidroxi, com radicais de ácidos graxos. A carboxila de um monômero forma uma ligação com a hidroxila de outro grupo, caracterizando a formação de um grupo ester (Figura 25). A presença de diferentes compostos de carbono no lugar do radical *R* resulta em diferentes monômeros constituintes dos PHAs. Ao menos 100 diferentes monômeros podem estar presentes na formação dos PHAs, o que resulta na síntese de diversos polímeros com características químicas e reológicas distintas (GOMES e BUENO NETTO, 2001).



**Figura 25.** Fórmula química geral dos polihidroxialcanoatos (Silva et al., 2007b).

Quando presentes dentro das células o PHB (PHA mais estudado) forma grânulos fluidos e amorfos, porém após a extração forma um material cristalino e muito quebradiço, tornando-o mecanicamente pouco resistente. Além disso, o ponto de fusão do PHB é muito próximo à temperatura na qual este polímero sofre a degradação térmica (MADISON e HUISMAN et al., 1999). Por estas características, o processamento do homopolímero é muito complexo, o que resultou na necessidade do desenvolvimento de heteropolímeros com outros radicais alifáticos como, por exemplo, o polihidroxibutirato-co-hidroxivalerato, que resulta em um polímero mecanicamente mais resistente e com ponto de fusão menor (MADISON e HUISMAN et al., 1999; REDDY et al., 2003).

#### 2.2.7.2–Produção de PHAs na indústria

O polihidroxibutirato (PHB), é o PHA melhor caracterizado, possui peso molecular relativamente alto e propriedades reológicas mecânicas semelhantes aos plásticos convencionais, como o polipropileno. Esse polímero foi descoberto em 1925 por Lemoigne que, observando grãos insolúveis inclusos no fluido citoplasmático de *Bacillus megaterium* (GOMES e BUENO NETTO, 2002).

Até a década de 1970, o PHB não havia sido utilizado em grande escala na indústria,

foi nesta década que a indústria química Imperial Chemical Industries Ltda. (ICI), começou um processo de seleção visando bactérias que apresentassem a capacidade de produzir grandes quantidades de PHB. Nesse processo visando aumentar a produção com baixo custo, o substrato escolhido, foi o metanol, um subproduto abundante na indústria química. Dessa forma as bactérias metilotróficas foram as primeiras opções para a seleção. Essas bactérias não apresentaram a capacidade de produzir elevadas quantidades de PHB e o polímero produzido não apresentava peso molecular elevado o suficiente para a aplicação industrial (BYROM, 1987).

A segunda opção foi trabalhar com a bactéria *Azotobacter* spp., uma vez que a fisiologia e a bioquímica destas bactérias eram bem estudadas na época. Esses microrganismos apresentaram instabilidade genética e grande produção de exopolissacarídeos, o que inviabilizou a utilização desses microrganismos para a produção destes polímeros (BYROM, 1987; MADISON e HUISMAN, 1999). O terceiro microrganismo testado foi *Alcaligenes eutropha*, hoje classificado como *Ralstonia eutropha* (YABUUCHI et al., 1995), que apresentou a capacidade de produzir PHB de elevado peso molecular a partir de frutose como fonte de carbono. Esta bactéria apresentava a capacidade de produzir elevada concentração de PHB em condições de fósforo e ou nitrogênio limitantes com fermentação contínua em fermentadores de 200.000 litros (BYROM, 1987).

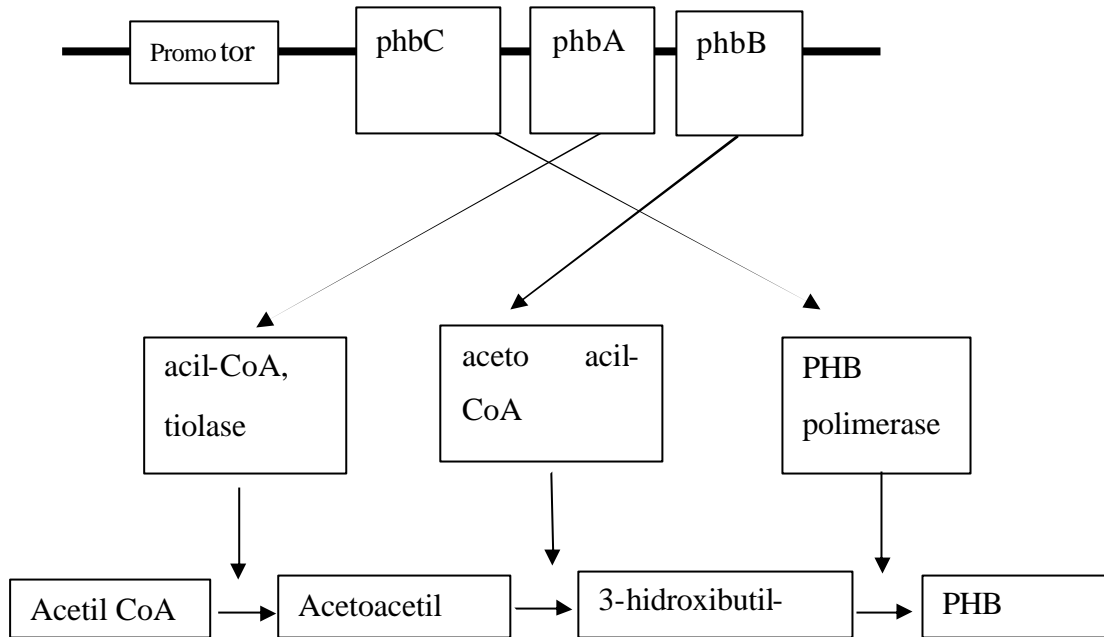
Hoje, no Brasil, existe uma integração entre o setor sucro-alcooleiro e a produção de PHB. Um projeto de pesquisa iniciado no final da década de 1980 com a cooperação entre a Coopersucar, o Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT) e a Universidade de São Paulo (USP) para a produção de PHB, utilizando os resíduos da produção de açúcar e etanol. Este processo utilizou estirpes de *R. eutropha* e de *Burkholderia* spp. sob fermentação contínua e utilizando como fonte de carbono a sacarose. Atualmente a Coopersucar produz cerca de 10.000 toneladas de PHB por ano a um custo muito baixo, cerca de US\$ 5,85 por kg, muito abaixo do custo de produção na Europa (cerca de US\$ 12,00 por kg) (NONATO et al., 2001; SILVA et al., 2007b).

Esta parceria resultou em diversas publicações científicas e em no mínimo três processos de patentes registrados junto ao INPI, mostrando a importância da integração entre as instituições de pesquisa e o setor produtivo, principalmente em áreas estratégicas.

### **2.2.7.3–Produção de PHB por diferentes microrganismos**

Estudos utilizando  $^{13}\text{C}$  ajudaram a elucidar as vias metabólicas na produção de PHB, utilizando como modelo a bactéria *R. eutropha*. Os resultados indicaram a presença de três principais enzimas envolvidas na síntese do PHB: Acetil-CoA Redutase, cetoacil-CoA, Thiolase e PHB polimerase (MADISON e HUISMAN, 1999). A via de síntese do PHB consiste basicamente em três reações: a condensação de duas moléculas de acetil-CoA formando uma molécula de acetoacetil-CoA pela ceto-acil-CoA thiolase (codificada pelo gene *phbA*). A segunda reação que é catalisada pela enzima aceto acil-CoA desidrogenase (codificada pelo gene *phbB*) é a redução do acetoacetil-CoA a 3-hidroxi-butil-CoA. A terceira reação é a polimerização de o PHB a partir dos monômeros 3-hidroxi-butil-CoA catalisada pela enzima PHB polimerase (Codificada pelo gene *phbC*) (MADISON e HUISMAN, 1999; REDDY et al., 2003).

Estas três enzimas são codificadas por genes que formam um óperon *phbCBA* (Figura 26) e em alguns microrganismos, podem ainda formar um tandem (REDDY et al., 2003). Este óperon pode ter as posições dos genes alteradas, porém é encontrado em diversos outros grupos de bactérias, como *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *E. coli*, *Cupriavidus*, dentre outros (LEE, 1996).



**Figura 26.** Óperon *phbCAB* e via de síntese e de PHB em *Ralstonia eutropha*

A produção de PHB geralmente é aumentada quando há alguma condição limitante; por isso diversos estudos têm objetivado determinar qual é a melhor condição para a produção de PHB por bactérias em condições laboratoriais. Os resultados dessas pesquisas têm apontado para a diminuição da quantidade de nitrogênio fósforo e aumento da concentração das fontes de carbono (MERCAN et al., 2002; LUGG et al., 2008). Outras condições como o aumento da pressão osmótica (ARORA, et al., 2006) e a redução da concentração de todos os nutrientes do meio de cultura (POVOLO e CASELA, 2004) permite a produção de maiores quantidades de PHB, indicando haver um papel do PHB na proteção das células em condições adversas.

### 2.2.8–Produção de PHB por Rizóbios e Outras Bactérias Formadoras de Nódulos

A produção de PHB pode conferir uma vantagem competitiva para as estirpes de rizóbio que vivem saprofiticamente no solo. Principalmente para aquelas bactérias que estão em solos salinos ou que passam por um período de seca muito longo (TRAINER e CHARLES, 2006). A produção de PHB pelas bactérias está diretamente relacionada com o potencial redox da célula. Nos nódulos, a concentração de  $O_2$  é muito reduzida, o que diminui o potencial redox, favorecendo a produção de PHB. Isso ocorre, porque em condições microaerófilas, há a aumento da concentração celular de NAD(P)H o que resulta na inibição por feedback das enzimas Citrato Sintase e Isocitrato Desidrogenase do ciclo do ácido tricarboxílico, resultando no carreamento da Acetil-CoA para síntese de PHB (STAM et al., 1986).

Apesar das condições dentro do nódulo favorecerem a produção de PHB, as bactérias presentes em nódulos de crescimento indeterminado não produzem PHB em concentrações suficientes para ocorrer a formação de grânulos, como ocorre em bacteróides em nódulos de crescimento determinado (HIRSCH et al., 1982 e 1983). Durante as fases iniciais da infecção do hospedeiro (principalmente durante a formação e o alongamento do cordão de infecção) há a abundância de grânulos de PHB nas células bacterianas, porém quando ocorre a compartimentalização das células em simbiossomos e a diferenciação celular em bacteróides, os grânulos de PHB rapidamente são degradados e não são observados grânulos visíveis (TRAINER e CHARLES, 2006). Porém outros estudos demonstraram que bactérias de nódulos da espécie arbórea *Chamaecrista* os isolados de rizóbio podem acumular grandes

quantidades de PHB (GOI, comunicação pessoal).

De acordo com essas observações, especulava-se que o PHB fosse requerido apenas nas fases iniciais da infecção e que outras fontes de carbono poderiam suprir a demanda do bacteróide no decorrer da fixação ativa do nitrogênio (CHARLES et al, 1997). Entretanto, experimentos realizados com *S. meliloti* mutantes incapazes de produzir PHB demonstraram a capacidade de nodular eficientemente as hospedeiras e estabelecer a simbiose efetiva (WILLIS e WALKER, 1998).

Em 2003 foi descrito um mecanismo de regulação da FBN através do fluxo de aminoácidos entre os bacteróides e a planta hospedeira (LODWIG et al., 2003). Neste estudo, foi detectado que bacteróides de *R. leguminosarum* bv. *viceae* mutantes deficientes em carrear os aminoácidos para o espaço peribacteróide, acumulavam grande quantidade de grânulos de PHB. Essas plantas apresentavam um fenótipo Fix<sup>-</sup>, o que resultava em nódulos com menor teor de leghemoglobina e maior concentração de O<sub>2</sub>, o que aumenta a concentração de dicarboxilatos do ciclo do ácido tricarboxílico, aumentando relativamente a concentração dos substratos utilizados na síntese dos monômeros 3-hidroxiabutirato e conseqüentemente do PHB (LODWIG et al., 2003).

No entanto, bacteróides de plantas com nódulos de crescimento determinado, como os de *B. japonicum* em soja ou de *R. tropici* em feijão, podem acumular elevada quantidade de PHB atingindo níveis superiores a 50% da matéria seca celular em grânulos de PHB (WONG e EVANS, 1971; MERCAN et al., 2002; TRAINER e CHARLES, 2006). Essa grande quantidade de PHB pode servir como uma reserva energética em períodos de escassez de esqueletos de carbono para os nódulos, como durante o período de enchimento de grãos (BERGERSEN e TURNER, 1991). Wong e Evans (1971) destacaram ainda que a quantidade de PHB não varia de acordo com a atividade da nitrogenase, porém decaem em períodos como os citados acima.

A produção de PHB em bacteróides compete com a nitrogenase pelo poder redutor e fontes de fotoassimilados (CEVALLOS, et al., 1996). Experimentos realizados com *R. etli* mutantes, incapazes de produzir a enzima ceto-acil-CoA thiolase, devido a uma mutação no gene *phbA*, apresentam um período maior de atividade da nitrogenase, comparado com a estirpe não mutante (CEVALLOS, et al., 1996). Hahn et al. (1984), já havia reportado que bacteróides de *B. japonicum* mutantes em três genes *nif* (*nifD*, *nifK* e *nifH*) apresentaram maior produção de PHB do que a estirpe não mutante. Porém esses resultados não são corroborados por estudos mais recentes onde um mutante de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, incapaz de sintetizar a enzima PHB polimerase, não apresentou alterações da capacidade FBN, quando comparada com a estirpe não mutante (LODWIG et al., 2005).

Outro estudo recente avaliou a capacidade de *S. meliloti* mutante no gene *phbC* em nodular e fixar nitrogênio em *Medicago sativa* e em *M. truncatula*. Os autores observaram que o silenciamento do gene *phbC* resultou em redução da nodulação em ambas as espécies, comparando com a estirpe selvagem, porém maior redução da nodulação foi observada em *M. truncatula* se comparada com *M. sativa*. A FBN influenciada negativamente em nódulos mais jovens de *M. truncatula* e em nódulos mais velhos de *M. sativa* (WANG et al., 2007), indicando haver uma interação entre a produção de PHB pelo bacteróide e o genótipo da planta hospedeira.

As reservas de PHB em bacteróides em nódulos de crescimento determinado podem representar uma reserva de carbono importante para a volta ao ambiente “solo”, após um período de intensa atividade bioquímica nos nódulos, o que não ocorre com os bacteróides em nódulos de crescimento indeterminado (DENISON, 2000). Diversas estirpes de rizóbio são capazes de produzir grandes quantidades de PHB “*in vitro*”. MERCAN et al., (2004) avaliou a capacidade de estirpes de diversas espécies de *Rhizobium* produzir PHB, utilizando diferentes fontes de carbono. Os resultados indicaram que a utilização de glicina foi

responsável pela maior produção de PHB, se comparado com outras 8 fontes de carbono.

### **2.2.9–Produção de Amilases por Rizóbios e Outras Bacterias Formadoras de Nódulos**

A produção de enzimas de interesse biotecnológico representa uma importante ferramenta com diversas aplicações biotecnológicas nas indústrias têxtil, alimentícia, farmacêutica e de papel (KIRK et al., 2002). As amilases apresentam aplicações diversas e uma gama muito grande e microrganismos podem produzi-las (OLIVEIRA et al., 2006).

Diversos fatores podem influenciar na produção destas enzimas por estirpes de rizóbio, dentre esses fatores, as condições de cultivo, as fontes de carbono e a composição o meio de cultura merecem destaque (OLIVEIRA et al., 2006). As fontes de carbono dispendiosas como glicose, manitol e amido solúvel podem encarecer a produção destas enzimas e a utilização de fontes de carbono mais grosseiras como farinhas de pupunha, milho, mandioca e jacatupé podem resultar em produção de grandes quantidades de enzimas com baixo custo.

Além disso, a produção de enzimas nas mesmas condições de cultivo utilizadas para a produção de inoculantes rizobianos pode representar uma alternativa para a indústria de inoculantes do Brasil, uma vez que este setor é muito dependente do plantio da soja para a comercialização dos inoculantes.

## 2.3–MATERIAL E MÉTODOS

### 2.3.1–Avaliação do Crescimento de Estirpes de Rizóbio em Dois Meios de Cultura

Para avaliar o crescimento e a produção de exopolissacarídeos e poli-hidroxibutirato por estirpes de rizóbio em dois meios de cultura diferentes, foram utilizadas estirpes de rizóbio provenientes da coleção de culturas da Embrapa Agrobiologia. As estirpes bacterianas utilizadas foram: BR 96; BR 2003 e BR3267 de *Bradyrhizobium japonicum*; BR 29 de *B. elkanii* e BR 520 e BR 322 de *Rhizobium tropici*. As estirpes de *Rhizobium tropici* e *Bradyrhizobium* foram pré-cultivadas por 2 ou 4 dias respectivamente em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio YME líquido sob agitação constante de 150 rpm. Após o crescimento do pré-inóculo, uma alíquota de 50µL foi inoculada em Erlenmeyers com capacidade de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultura líquido. Os meios de cultura utilizados foram os meios YM líquido (VINCENT, 1970) sem indicador e RDM com elementos traço e vitaminas (BISHOP et al., 1976), cuja composição está descrita na Tabela 26 O meio RDM utilizado foi escolhido para este teste por ter sido utilizado por Castellane e Lemos (2007) para avaliar a composição monomérica de EPS de rizóbio.

**Tabela 26.** Composição do meio de cultura RDM (BISHOP et al., 1976).

Reagentes presentes no meio de cultura RDM	Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	Reagentes presentes no meio de cultura RDM	Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,125	Ácido Trinitriloacético	7
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,0043	Riboflavina	0,02
CoCl <sub>2</sub>	0,07	Ácido p-aminobenzoico	0,02
Na <sub>2</sub> MoM <sub>4</sub>	0,125	Ácido nicotínico	0,02
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,108	Mio-Inositol	0,12
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,005	Tiamina	0,02
CaCl <sub>2</sub>	5	Pantotenato de cálcio	0,02
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,145	Biotina	0,02
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	230	Piridoxina	0,02
MgSO <sub>4</sub>	100	glutamato de sódio	1100

As bactérias foram crescidas sob agitação constante de 150rpm. Foram retiradas duas alíquotas para avaliar a concentração bacteriana no meio de cultura. As estirpes de *Rhizobium* foram quantificadas aos 2 e aos 3 dias após a inoculação, enquanto a avaliação para as estirpes de *Bradyrhizobium* foi feita aos 4 e aos 6 dias após a incubação. Para a quantificação da concentração de células viáveis nos meios de cultura foram usadas alíquotas de 1 mL de cada erlenmeyer. Esta alíquota foi submetida a uma diluição seriada e plaqueada em placas de Petri contendo meio YMA (VINCENT, 1970), através do método da gota (MILES e MISRA, 1938). As placas foram incubadas em estufa a 28°C pelo tempo de crescimento de cada bactéria e o número de colônias observadas foi convertido em unidades formadoras de colônia por mL de meio. Foi adotado o delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições. Os dados foram analisados através do programa SAEG (Universidade Federal de Viçosa), sendo realizada a análise de variância e o teste F avaliando quais significâncias estariam abaixo de 5% comparando uma mesma estirpe nos dois meios de cultura.

### 2.3.2–Isolamento e Quantificação dos Exopolissacarídeos Produzidos por Estirpes de Rizóbio

O caldo de cultivo contendo as estirpes bacterianas (crescidas por 7 dias para *Bradyrhizobium* e por 3 dias para *Rhizobium*) foi centrifugado a 10000 g a temperatura de 4°C por 30 minutos (centrífuga Beckman J2-21). O sobrenadante foi cuidadosamente separado do precipitado. Uma alíquota de 10 mL do sobrenadante foi filtrada em membrana de celulose com poros de 0,22 µm para separar a solução de EPS das células e frações de células remanescentes. O filtrado foi misturado a etanol 95° GL gelado e centrifugado novamente nas mesmas condições descritas anteriormente. O precipitado foi lavado de 4 a 6 vezes em 10 mL de etanol gelado, sendo da última lavagem ressuspensão e centrifugado novamente (DUTA et al., 2006; CASTELLANE e LEMOS, 2007). O precipitado final foi ressuspensão novamente em etanol, seco a vácuo a 60°C e pesado em tubos previamente pesados (adaptado de DUTA et al., 2006).

### 2.3.3–Avaliação da Produção de EPS por Rizóbios de Crescimento Rápido e Intermediário

Foi avaliada a capacidade de produção de EPS por estirpes de crescimento rápido e intermediário. As estirpes rizobianas utilizadas estão listadas na Tabela 27.

**Tabela 27.** Estirpes rizobianas utilizadas para a avaliação da capacidade produzir exopolissacarídeos

Espécie	Estirpe	Referência
<i>R. etli</i>	BR10026	VAN BERKUM et al., 1996
<i>R. gallicum</i>	BR528	AMARGER et al., 1997
<i>R. giardini</i>	BR529	AMARGER et al., 1997
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	BR 7606	NEVES et al., 1985
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	BR10052	WILLEMS e COLLINS, 1993
<i>R. tropici</i>	BR322	MARTINEZ-ROMERO et al., 1991
<i>R. tropici</i>	BR520	HUNGRIA et al., 2000
<i>R. tropici</i> II A	BR10016	VAN BERKUM et al., 1996
<i>S. fredii</i>	BR112	WILLEMS e COLLINS, 1993
<i>S. meliloti</i>	BR7411	LAJUDIE et al. 1994
<i>S. teranga</i>	BR527	LAJUDIE et al. 1994
<i>M. ciceri</i>	BR521	VELAZQUEZ et al., 1998
<i>M. loti</i>	BR7801	LAJUDIE et al. 1994
<i>M. tianshanense</i>	BR523	KWON et al., 2005

As bactérias foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura YEM líquido. A determinação da massa seca das células foi feita através da filtração de 5 mL um volume conhecido de caldo de cultura através de uma membrana com poros de 0,22 µm pré-pesada, secagem em estufa a 60°C e pesagem posterior (MERCAN e BEYATLI, 2005). O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado com 3 repetições. Os dados foram analisados pelo programa SAEG (Universidade Federal de Viçosa). Foi realizada a análise de variância e o teste de comparação de médias utilizado foi o teste de Skott-Knott ao nível de 5% de significância.

### 2.3.4–Quantificação do PHB Produzido por Isolados Bacterianos Oriundos de Nódulos de Guandu Através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

#### 2.3.4.1–Otimização do método

Para a extração das amostras foram testados dois métodos, um com a extração direta



das células em ácido sulfúrico e outro utilizando primeiramente um choque térmico da suspensão bacteriana em clorofórmio, devido à solubilidade do PHB neste solvente orgânico.

Uma vez escolhido o método de digestão da massa celular em  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , foi realizado um ensaio para determinar o tempo ideal de digestão do PHB. A digestão do PHB puro foi em ácido sulfúrico concentrado foi realizada em banho-maria a 95-100° C por 10, 20, 30, 45, 60, 120 e 180 minutos, para determinar o tempo adequado para a digestão das amostras.

Antes da avaliação da produção de PHB por isolados bacterianos, a otimização do método, assim como uma curva de calibração utilizando o PHB (Sigma-Aldrich) foram realizados. Na otimização foi utilizada a coluna Aminex HPX87H (Biorad) e foram testados dois detectores, o de índice de refração e o leitor de absorvância em UV a 210 nm. O fluxo utilizado foi o de 0,5 mL por minuto e o tempo de corrida inicial foi o de 50 minutos, a fase móvel utilizada foi  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,004 M.

#### **2.3.4.2-Isolados bacterianos e condições de crescimento**

Trinta e sete bactérias isoladas de nódulos de guandu foram crescidas em meio YM líquido, sob agitação constante de 200 RPM por 3 dias para as bactérias de crescimento rápido, 5 para as de crescimento intermediário e 7 dias para as bactérias de crescimento lento. Três isolados capazes de ter alta produtividade de PHB foram selecionados para a avaliação da produção de PHB utilizando meio de cultura com diferentes fontes de carbono. Os isolados foram crescidos por 3 dias em meio YM contendo glicose, sacarose, xilose, amido e frutose como única fonte de carbono, substituindo o manitol da formulação original do meio YM. As bactérias foram crescidas também em meio YM original.

#### **2.3.4.3-Preparo das amostras**

Um mL do caldo de cultivo foi centrifugado a 10000 g e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspense em água destilada e centrifugado novamente, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspense em 1 mL de água e transferido para tubos de ensaio. Esses tubos foram secos por 12 horas a 60-65° C.

A massa celular seca foi digerida com 1 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado por 45 minutos em banho-maria a com água fervente (SLEPECKY e LAW, 1960). À massa celular digerida foram adicionados 4 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,004M e resfriado rapidamente em gelo (KARR et al., 1983). Para determinar a concentração de PHB na massa celular, também foram digeridas diferentes concentrações de PHB nas mesmas condições descritas para as amostras. Esse controle interno foi repetido a cada corrida. Além do controle positivo, em cada corrida foram preparadas amostras que continham apenas ácido sulfúrico na digestão.

Para a extração das amostras foram testados dois métodos, um com a extração direta das células em ácido sulfúrico e outro aplicando primeiramente um choque térmico da suspensão bacteriana em clorofórmio.

#### **2.3.4.4-Injeção e condições utilizadas na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

A produção de PHB por isolados de rizóbio foi avaliada pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) usando a metodologia desenvolvida por Karr et al. (1983). Primeiramente as bactérias foram crescidas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio YM, sob agitação constante de 150 rpm a 28° C. Após o crescimento, 1 mL do caldo de cultivo foi centrifugado a 13200 g, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspense em 2 mL de água destilada estéril, homogeneizado e transferido para um tubo de ensaio. Esta suspensão foi seca até peso constante a 65° C. Após a secagem, as amostras foram digeridas com 1 mL de ácido sulfúrico concentrado (98%) a 95-100°C em banho-maria por 45 minutos.

A amostra digerida foi diluída em 4 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,004 M, rapidamente

homogeneizada e resfriada em gelo. Esta amostra foi posteriormente diluída em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,004 M na proporção 1:10 de amostra:diluído, já nos *vials* para a injeção no equipamento.

O volume de injeção utilizado foi o de 50  $\mu\text{L}$ . A fase móvel utilizada foi  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,004 M a 0,5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  em um fluxo isocrático. A coluna Aminex HPX87H demonstrou bom desempenho nos testes de otimização e foi utilizada. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 3 repetições. Em cada corrida foram utilizadas cinco concentrações do PHB (reagente analítico) digerido como controle positivo e 2 a 3, amostras de ácido sulfúrico aquecido e 95° C e diluído como controle negativo.

#### **2.3.4.5–Análises estatísticas e interpretação dos dados.**

Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata. A produção de PHB foi considerada de acordo com a área do pico que eluiu em 36 minutos devida à alta correlação da área com a concentração de PHB digerido na análise de regressão linear. A produção e a produtividade de PHB variáveis não paramétricas, portanto não podem ser avaliadas através de uma análise de variância. Dessa forma optou-se pela utilização da análise de correlação de ranqueamento de Spearman (CONOVER, 1971).

#### **2.3.5–Ensaio Reométrico dos Exopolissacarídeos Produzidos por Isolados Bacterianos Oriundos de Nódulos de Guandu**

O EPS precipitado foi ressuspensão em água, à temperatura de 50°C sob agitação constante de 1400 rpm utilizando um termomixer (Thermomixer Compact-Eppendorf). As amostras foram preparadas em duas concentrações (5 e 10  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Os ensaios de reologia foram realizados em um reômetro, HAAKE, Rheostress 1600. As análises de tensão em rampa foram realizadas utilizando acessório de placa paralela, modelo PP35Ti, sendo determinada a viscosidade aparente e a taxa de cisalhamento. As análises foram realizadas a temperatura ambiente de 25°C controladas por banho termostatizado, modelo HAAKE

#### **2.3.6–Avaliação da Produção de Enzimas Amilolíticas por Bactérias Isoladas de Raízes de Guandu**

Foram selecionados 37 isolados para a avaliação da capacidade de produzir enzimas amilolíticas, utilizando amido de milho (Vetec Química Fina LTDA) como fonte de amido. Os isolados foram crescidos em meio YEM líquido por 3 dias para os isolados de crescimento rápido, 5 dias para os isolados de crescimento intermediário e 7 dias para os isolados de crescimento lento. Paralelamente foi preparado meio YMA com 1% de amido substituindo o manitol como fonte de carbono e sem a adição de azul de bromotimol como indicador de pH.

As bactérias foram inoculadas em placas de Petri com o meio de cultura suplementado com amido. Foram inoculados 10  $\mu\text{L}$  de suspensão bacteriana em três pontos equidistantes da placa de Petri. As bactérias foram incubadas em BOD a 28° pelo tempo de crescimento adicionado de três dias para a estabilização da difusão das amilases no meio de cultura ao redor das colônias. A atividade amilolítica foi detectada através da adição de 10 mL de tintura de iodo (2%) a cada placa. A atividade hidrolítica foi detectada pelo halo de solubilização ao redor das colônias, uma vez que o iodo cora apenas o amido e não os oligômeros resultantes da sua digestão.

Foi calculado o índice enzimático (IE) através da razão do diâmetro do halo de solubilização pelo halo da colônia. Os experimentos foram conduzidos em um delineamento experimental inteiramente casualizado, com três repetições. Os resultados foram avaliados através do software Sisvar (Universidade Federal de Lavras). Foi realizada a análise de variância e o teste de comparação de médias utilizado foi o Skot-Knot ao nível de significância de 5%.

## 2.4-RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.4.1-Avaliação do Crescimento e da Produção de PHB por Estirpes de Rizóbio em Meio YM e Meio RDM.

A avaliação do crescimento bacteriano nos meios de cultura YM e RDM não apresentou diferença significativa entre os meios de cultura para uma mesma estirpe na pelo teste F (Tabela 28).

A composição do meio de cultura pode representar um importante fator na determinação da produção de EPS por estirpes de rizóbio (CASTELLANE e LEMOS, 2007). A produção de PHB pode ser influenciada por diferentes componentes do meio de cultura, como por exemplo, a fonte de carbono e de nitrogênio (MERCAN, et al., 2002,. Porém, assim como observado para a produção de EPS o meio de cultura RDM não apresentou diferenças significativas para a produção de PHB (Tabela 28).

**Tabela 28.** Concentração de células em meio de cultura líquido na primeira contagem\* e na segunda contagem\*\* para estirpes de rizóbio cultivadas em meio de cultura YM e RDM.

Espécie	Estirpe	YM	RDM	YM	RDM
		1° Contagem (ufc.mL <sup>-1</sup> )		2° Contagem (ufc.mL <sup>-1</sup> )	
<i>B. japonicum</i>	BR 2003	3,02x10 <sup>5</sup>	3,96x10 <sup>5</sup>	2,2x10 <sup>8</sup>	3,9x10 <sup>8</sup>
	BR 96	4,2x10 <sup>4</sup>	5,6x10 <sup>4</sup>	2,1x10 <sup>9</sup>	3,3x10 <sup>8</sup>
	BR 3267	1,2x10 <sup>6</sup>	3,2x10 <sup>5</sup>	2,7x10 <sup>7</sup>	5,0x10 <sup>7</sup>
<i>R. tropici</i>	BR 520	1x10 <sup>4</sup>	4,3x10 <sup>3</sup>	5,2x10 <sup>9</sup>	1x10 <sup>9</sup>
	BR 322	2,3x10 <sup>3</sup>	3,6x10 <sup>2</sup>	2,0x10 <sup>9</sup>	2,1x10 <sup>9</sup>
<i>B. elkanii</i>	BR 29	1,8x10 <sup>3</sup>	1,7x10 <sup>3</sup>	1,0x10 <sup>9</sup>	5,6x10 <sup>8</sup>

\*Dois dias para *Rhizobium* e quarto dias para *Bradyrhizobium*.

\*\* Três dias para *Rhizobium* e seis dias para *Bradyrhizobium*.

### 2.4.2-Avaliação da Produção de EPS por Rizóbios de Crescimento Rápido e Intermediário em, Meio YM.

Os rizóbios de crescimento rápido e intermediário apresentaram algumas diferenças com relação à capacidade de produzir exopolissacarídeos. A tabela 29 apresenta os dados referentes à produção de EPS e de biomassa bacteriana. As estirpes padrão de *R. gallicum* e de *R. tropici* produziram maior quantidade de EPS do que as demais estirpes testadas. *R. gallicum* e *R. tropici* estirpes produziram um mais 17 e 22 vezes o amassa de células em exopolissacarídeos (Tabela 29). A produção de EPS por isolados de rizóbio utilizados para a produção de inoculantes pode variar de acordo com as características fenotípicas e genéticas de cada isolado. A produção de EPS pode ser elevada para isolados de rizóbio utilizados em inoculantes para indigófera na África (KUMARI et al., 2009), porém pode ser reduzida para os rizóbios recomendados para outras espécies. A produção de EPS por estirpes de *Rhizobium* spp. variou muito no presente estudo, atingindo a produtividade entre 144 e 2297% (Tabela 29). Esta variação mostra a variabilidade genética de estirpes de rizóbio pertencentes ao mesmo gênero e também já foi encontrada em estirpes do gênero *Xanthomonas* (ANTUNES et al., 2003) e *Sphingomonas* (BERWANGER et al., 2007).

Além da variabilidade na produção de EPS por estirpes do mesmo gênero, os EPS

dessas bactérias podem apresentar características muito distintas, o que pode resultar em aplicações industriais completamente diferentes para esses EPS, como já foi demonstrado para a goma xantana (GARCIA-OCHOA et al., 2000). Para a produção de xantana, inclusive há a recomendação de estirpes de *Xanthomonas* de acordo com a aplicação do EPS, ou seja, conforme as características dos EPS produzidos por diferentes estirpes de *Xanthomonas* variam, estes isolados bacterianos são recomendados para a produção de EPS para determinada aplicação industrial (GARCIA-OCHOA et al., 2000), refletindo a importância da variabilidade genética dos isolados e da plasticidade fenotípica de isolados geneticamente muito semelhantes na determinação da aplicabilidade industrial dos EPS.

É possível ainda observar que as estirpes de *R. tropici*, BR 322 e BR 520, ambas recomendadas para a produção de inoculantes para o feijoeiro comum no Brasil, e geneticamente muito próximas, apresentaram produtividade e capacidade de crescimento diferenciados no presente estudo. Estas estirpes apresentam ainda a resistência a antibióticos diferenciada, podendo ser diferenciadas a partir da resistência a 60 mg.L<sup>-1</sup> de canamicina (BR 322) ou a 100mg.L<sup>-1</sup> de cloranfenicol (BR 520) (SOUZA et al., 2003). A produção diferenciada de exopolissacarídeos é pode representar demonstração das respostas fenotípicas diferenciadas dessas bactérias quando crescidas em meio de cultura. A descrição de um marcador molecular baseado em genes que codificam enzimas para o processo de biossíntese de EPS para isolados próximos de *Rhizobium leguminosarum* (JANCZAREK et al., 2009), também corrobora a capacidade de isolados próximos em produzir diferentes quantidades (ou composições) de EPS.

**Tabela 29.** Produção biomassa bacteriana, e de EPS por 14 estirpes de rizóbio crescidas em meio YEM líquido

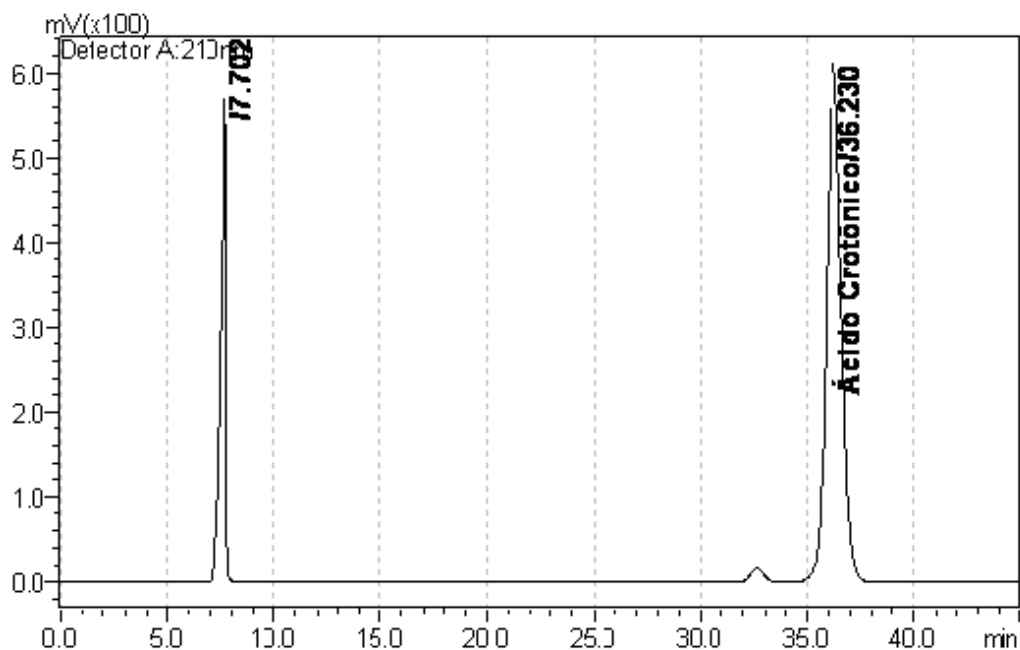
Espécie	Estirpe	Produção	Biomassa bacteriana	Produtividade*
			g/L	%
<i>R. etli</i>	BR10026	1,86 b**	0,47	399
<i>R. gallicum</i>	BR528	5,36 a	0,23	2297
<i>R. giardini</i>	BR529	1,53 b	0,75	204
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	BR 7606	0,51 b	1,17	44
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	BR10052	1,60 b	0,30	533
<i>R. tropici</i>	BR322	1,13 a	0,30	1709
<i>R. tropici</i>	BR520	1,89 b	0,43	436
<i>R. tropici</i> II A	BR10016	1,63b	0,53	306
<i>S. fredii</i>	BR112	2,02 b	1,23	164
<i>S. meliloti</i>	BR7411	1,41 b	0,97	146
<i>S. teranga</i>	BR527	0,78 b	0,80	98
<i>M. ciceri</i>	BR521	2,39 b	0,20	1195
<i>M. loti</i>	BR7801	2,25 b	0,33	673
<i>M. tianshanense</i>	BR523	3,13 b	0,20	1565

\* Produtividade=Produção.Biomassa bacteriana<sup>-1</sup>

\*\* Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Skot-Knot ao nível de 5%

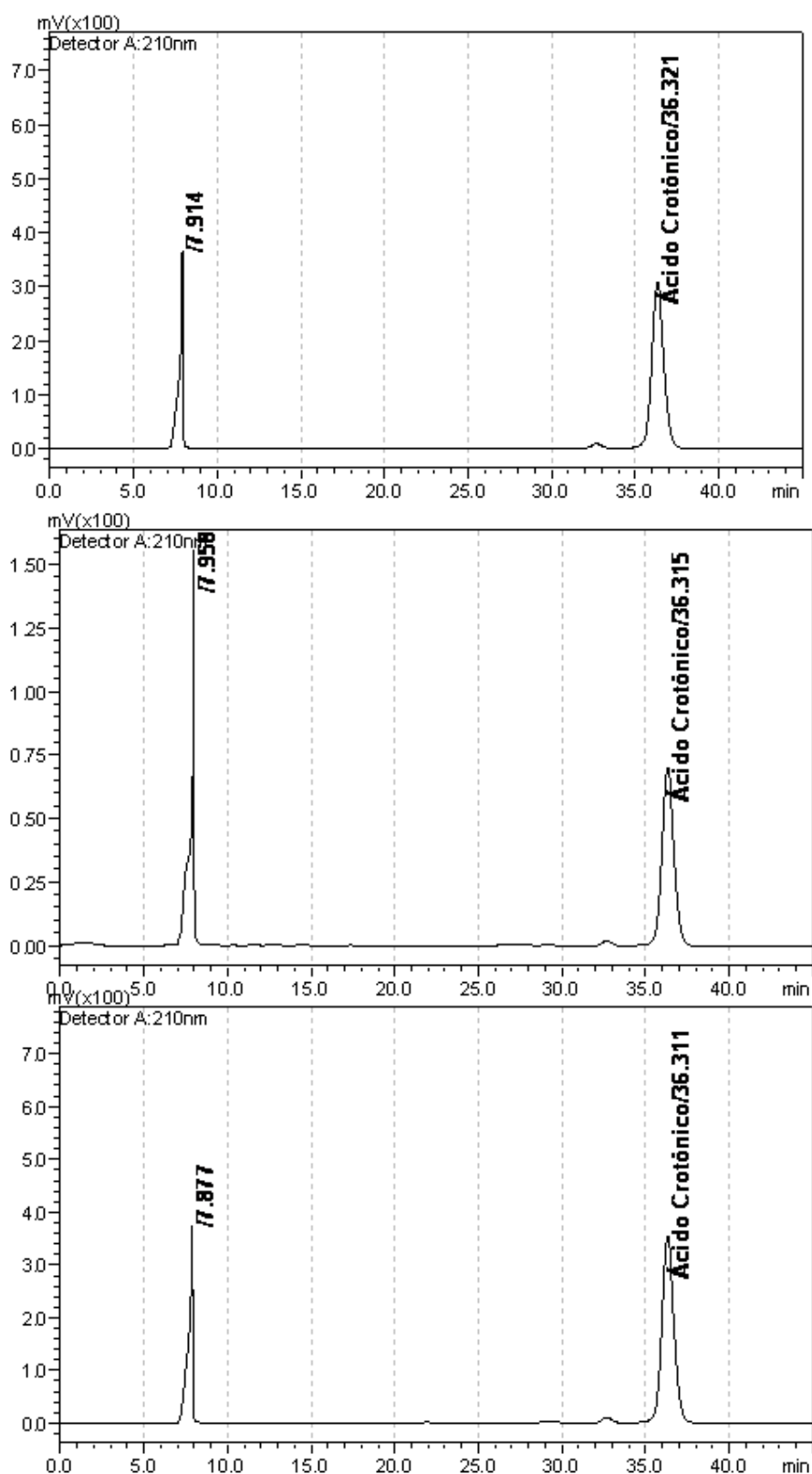
### 2.4.3–Avaliação da Produção de PHB por Isolados de Rizóbio de Guandu Através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Na otimização do método, foi padronizado a utilização do leitor de absorvância em UV, uma vez que o leitor das amostras em índice de refração não apresentava picos para as amostras do PHB digerido, nem mesmo para as concentrações mais elevadas apresentando apenas a linha de base no cromatograma. O leitor UV proporcionou muito boa resolução dos cromatogramas e um pico muito característico do ácido crotonico no tempo de retenção de aproximadamente 36,2 minutos (Figuras 27 e 28). Um pico de menor intensidade pôde ser observado eluindo aos 33 minutos. Este pequeno pico também fora observado pelos descritores da técnica, logo antes do pico do resultado de digestão do PHB, não influenciando na qualidade do resultado ou na determinação da concentração do PHB (KARR et al., 1983).

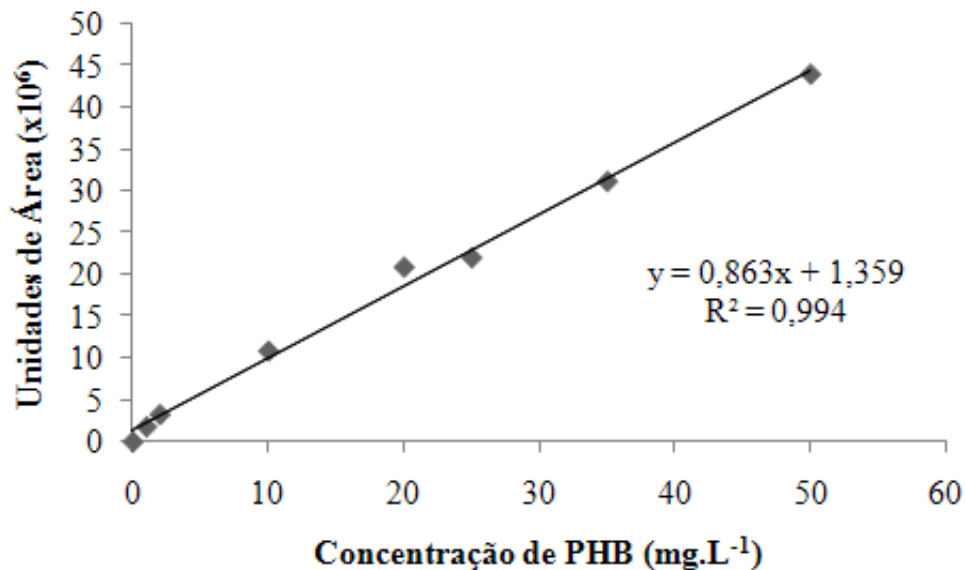


**Figura 27.** Cromatograma de uma amostra de 5 mg de PHB digerido em 1 mL de ácido sulfúrico concentrado a 95°C por 60 minutos. Coluna Aminex HPX87H (Biorad); Fase móvel, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,004 M, fluxo 0,5 mL por minuto (isocrático), volume de injeção, 50 µL.

De posse dos valores das áreas dos picos dos cromatogramas gerados a partir das corridas das amostras contendo os padrões digeridos, foi construída uma curva de calibração, em função da área e da concentração de PHB digerido. Esta curva foi repetida a cada corrida e a concentração de PHB foi medida através da substituição da área do pico da amostra na curva linear dada através da regressão entre os fatores concentração de PHB e área do pico (Figura 29).



**Figura 28.** Cromatograma da produção de PHB pelos isolados 71.3b, 8.1c e 24.6b Digestão do precipitado em 1 mL de ácido sulfúrico concentrado a 95°C por 60 minutos. Coluna Aminex HPX87H (Biorad); Fase móvel, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,004 M, fluxo 0,5 mL.min<sup>-1</sup> (isocrático), volume de injeção de 50 µL.



**Figura 29.** Exemplo de uma curva padrão comparando através da análise de regressão a concentração de PHB digerido e a área do pico que eluiu em 36 minutos nos cromatogramas.

Os cromatogramas gerados após a corrida das amostras bacterianas digeridas diretamente no ácido sulfúrico, sem o tratamento com clorofórmio, também apresentaram uma resolução muito boa, o que permitiu a análise fidedigna da concentração de PHB no interior das células. Diversos outros picos puderam ser observados em outros tempos de retenção, além do pico do ácido crotônico com 36 minutos de retenção, como na digestão não há fracionamento ou purificação do PHB celular, outros compostos celulares que interagem com a coluna e eluem em tempos de retenção diferentes podem estar presentes. Diversos compostos aromáticos ou polissacarídeos celulares absorvem a luz UV entre os comprimentos de onda de 200 e 260 nm (SLEPCKLY e LAW, 1960), sendo detectados pela técnica empregada.

A avaliação da produção de PHB intracelular através de técnicas laboratoriais a partir da digestão com ácido sulfúrico foi proposta por SLEPECKY e LAW (1960), modificada por POINDEXTER e ELEY (1983). Essa determinação é realizada através de espectrofotometria com o comprimento de onda de 235 nm. Esse é um procedimento de baixo custo e exequível em diversos laboratórios de microbiologia básica, pois não utiliza equipamentos e insumos de elevado custo. Por este motivo esta técnica tem sido bastante utilizada em estudos recentes (MERCAN et al., 2002 e 2005; ARORA al., 2006; RAMADAS et al.; 2009).

A proposição de métodos cromatográficos para a quantificação do PHB produzido por bactérias foi feita ainda na década de 1970 utilizando cromatografia gasosa (BRAUNEGG et al., 1978) e na década de 1980 utilizando CLAE (KARR et al., 1983). Os métodos cromatográficos permitem uma separação dos compostos celulares digeridos, o que resulta na eluição de cada composto em diferentes tempos resultante da adsorção ou migração em diferentes tempos (dependendo da interação de cada composto com a coluna utilizada) resultando em tempos de retenção distintos. Este fato possibilita determinar a concentração de substâncias através da comparação de cromatogramas gerados a partir de eluição de compostos de interesse com concentrações conhecidas. Dessa forma, outros compostos

celulares que podem ser detectados no mesmo comprimento de onda que o PHB digerido é detectado, não interferem na detecção do PHB reduzindo o erro experimental da técnica. A interação diferenciada dos compostos celulares com a coluna, resultando em tempos de retenção distintos de todos os compostos digeridos, possibilita a determinação da concentração de PHB em culturas celulares sem a necessidade de sucessivas purificações como ocorre no método de determinação espectrofotométrica, baseado na insolubilidade do PHB em água e solubilidade em clorofórmio.

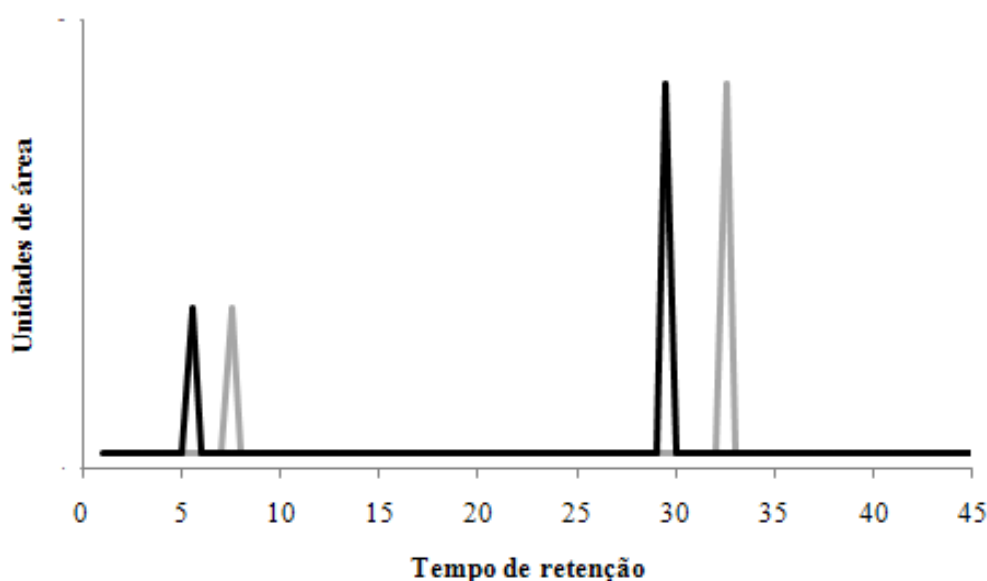
Outra vantagem das técnicas cromatográficas para a determinação da concentração de PHB é o tempo gasto e o trabalho realizado. O método de determinação por espectrofotometria além de ser mais impreciso tem muitas etapas, o que torna o método laborioso além de gastar muito tempo para purificação, solubilização do PHB em clorofórmio e para posterior digestão, aumentando também a possibilidade de erros decorrentes da constante manipulação das amostras, geralmente em grande número.

Um estudo conduzido no início da década de 1990 avaliou a produção de PHB por culturas da cianobactéria *Spirulina* spp. através de CLAE, cromatografia gasosa e determinação espectrofotométrica com leitura na faixa do UV, em dois comprimentos de onda (VINCENZINI et al., 1990). Os resultados permitiram afirmar que os métodos de espectrofotometria apresentavam baixa reprodutibilidade e muita variação entre as amostras após o tratamento de digestão sulfúrica. Por outro lado ambos os métodos cromatográficos apresentaram menor variação entre as amostras do mesmo tratamento e reprodutibilidade entre corridas distintas, após digestão sulfúrica das células das algas crescidas em diferentes condições de cultivo (VINCENZINI et al., 1990). Os resultados apresentados no presente estudo corroboram estes resultados enfatizando ainda a grande influência das impurezas do meio na determinação da concentração do PHB, podendo resultar em conclusões equivocadas a partir do resultado do trabalho.

Dentre os métodos cromatográficos propostos o mais adotado na literatura científica é a cromatografia gasosa, porém os resultados do presente estudos demonstraram que a técnica da CLAE é bastante apropriada a este tipo de análise. Além de ter apresentado, uma elevada correlação entre a concentração de PHB digerido e a área do pico que eluiu em 36 minutos na análise de regressão linear simples ( $R^2=0,994$ ) (Figura 30). A reprodutibilidade do método também é muito alta, uma vez que houve pouca variação entre a determinação de mesmas concentrações de PHB a partir de digestões e corridas distintas.

Comparando os resultados obtidos no presente estudo com os resultados obtidos pelos autores da técnica (KARR et al., 1983), é possível observar algumas diferenças entre os cromatogramas obtidos, principalmente com relação ao tempo de retenção dos picos observados (Figura 30) Essas diferenças podem ser decorrentes de condições experimentais distintas, resultante de adaptações do método. A Tabela 29 sumariza as condições empregadas no presente estudo e no trabalho de KARR et al. (1983). As diferenças da concentração da fase móvel podem ter sido o fator que influenciou mais diretamente para um tempo de retenção maior das amostras do PHB digerido no presente estudo, uma vez que alteração da polaridade da fase móvel pode alterar a interação entre esta e os compostos que estão em eluição, resultando em alterações no tempo de retenção (CIOLA, 1998).





**Figura 30.** Esquema comparativo dos cromatogramas de digestão de PHB ingestão no sistema UV-CLAE com detecção em 210 nm obtidos por Karr et al. (1983) (linha preta) e pelo presente estudo (linha cinza).

**Tabela 30.** Comparação das condições utilizadas nas corridas das amostras injetadas no UV-CLAE no trabalho dos autores da técnica para a detecção do produto de digestão do PHB, (KARR et al., 1983) e no presente estudo.

Estudo	Parâmetro			
	Coluna	Fase móvel	Fluxo	Volume injetado
1*	HPX87H	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,028M	0,7 mL.min <sup>-1</sup>	de 10 a 50µL
2**	HPX87H	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,004M	0,5 mL.min <sup>-1</sup>	50µL

\*KARR et al. (1983)

\*\*Presente estudo

A produção de PHB pelos isolados de nódulos de guandu e por rizóbios recomendados, apresentou elevada variabilidade, uma vez que os isolados produziram quantidades que variaram desde quantidades não detectáveis pelo detector de leitura UV (cromatogramas onde o leitor UV não detectou picos que apresentaram tempo de retenção compatível com o pico resultante da detecção da amostra que eluiu com 36 minutos) até isolados que apresentaram a produção de mais de 36 mg de PHB por litro de meio de cultura (Tabela 31). O isolado que apresentou maior produção de PHB foi o isolado 24.6b com uma quantidade de 36,55 mg por litro de meio de cultura. O isolado 24.6a também apresentou elevada produção de PHB com um total de 18,9 mg por litro de meio de cultura. O isolado 8.1c apresentou a produção de PHB similar à quantidade produzida pelo isolado 24.6a, atingindo a média de 18,25 mg por litro de meio (Tabela 31). Dos 37 isolados avaliados, quinze produziram menos de 1 mg de PHB por litro de meio de cultura (Tabela 31), e a maioria destes isolados apresentam como característica cultural, a elevada produção de muco, o que segundo a literatura pode representar uma disputa de carbono no metabolismo celular, o que resulta em menor direcionamento de esqueletos de carbono para a produção de PHB (MADISON e HUISSMAN, 1999).

A produtividade de PHB avaliada em função da biomassa bacteriana demonstrou que alguns isolados apresentaram grande percentual da biomassa (matéria seca de células) representado por PHB intracelular com destaque para os isolados 24.6b e 8.1c onde 48 e 38%, respectivamente, da biomassa seca celular é representada pelo PHB. O isolado 24.6b não apresenta elevada produção de EPS, o que resulta em direcionamento dos esqueletos de carbono para a síntese do material de reserva bacteriano e não para a exsudação de exopolissacarídeos no meio de cultura. Diferentemente desta característica cultural, o isolado 8.1c é um isolado capaz de produzir grandes quantidades de EPS, conforme pode ser observado na tabela 30. Conforme comentado no capítulo 1, o manitol utilizado no meio de cultura para o isolamento de bactérias de nódulos pode influenciar na diversidade de rizóbios a ser isolados dos nódulos de diversas hospedeiras. Esta fonte de carbono pode influenciar também a capacidade de bactérias isoladas a partir de manitol a produzir o PHB. Uma avaliação dentre os isolados utilizando outras fontes de carbono pode resultar em produção de maior quantidade de PHB por estirpes de rizóbio, conforme demonstrado por Mercan et al. (2002) que alteraram as fontes de carbono e nitrogênio do meio de cultura de uma estirpe rizobiana que apresentou produtividade de 9% crescida em meio contendo manitol, alcançando a produtividade de até 56% quando utilizada glicina, como fonte de carbono e nitrogênio.

As estirpes de rizóbio recomendados para a produção de inoculantes não foram capazes de atingir elevadas produtividades de PHB. A elevada eficiência destes isolados em campo certamente estão relacionadas a outros fatores, porém o desenvolvimento de estratégias para a produção de PHB por estes isolados pode representar um aumento na eficiência destas bactérias a campo, aumentando a sobrevivência das bactérias inoculadas em sementes ou nos solos, ou mesmo a sobrevivência destas estirpes em formulações de inoculantes.

As células incubadas em veículos de inoculantes turfosos e líquidos apresentaram diversas alterações celulares para se adaptar a condições adversas resultante de diferenças na composição meio de cultura onde as células se proliferaram para as condições do veículo com menores disponibilidades de nutrientes e de fontes de carbono (HUNGRIA et al., 2005a). Dentre essas alterações ocorre o aparecimento de grânulos de PHB visíveis (FENG et al, 2000). O aparecimento de PHB nas células incubadas em veículos de inoculantes sugere que a indisponibilidade de nutrientes resulta nessa alteração no metabolismo celular.

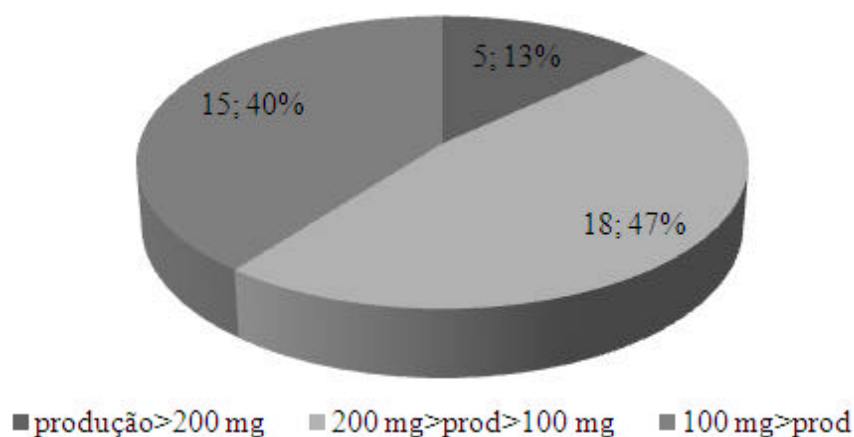
As estirpes de *Bradyrhizobium* avaliadas, bem como os isolados de crescimento lento 30.6a2; 18.5a2 e 9.5a, produziram grande quantidade de PHB após seis dias de agitação constante em meio YM, porém as concentrações celulares dessas bactérias foram muito elevadas, o que resultou em produtividades menores do que aquelas alcançadas pelos isolados de crescimento rápido 24.6a; 24.6b e 8.1c (Tabela 31). As estirpes de *Bradyrhizobium* avaliadas são recomendadas para a produção de inoculante para soja no Brasil há mais de 30 anos, dessa forma, apresentam elevada competitividade e estabilidade genética (HUNGRIA et al. 2005b). A persistência das células rizobianas nos solos e sua elevada competitividade podem apresentar diferenças na estratégia, resultantes nas diferenças na capacidade dessas células em produzir PHB, conforme demonstrado para as estirpes de *Bradyrhizobium* mesmo em condições de cultivo em meio YEM. Outras estratégias podem ser adotadas por isolados de crescimento rápido como estirpes do gênero *Rhizobium*.

**Tabela 31.** Produção e produtividade de PHB por isolados de rizóbio crescidos em meio de cultura YM utilizando manitol como fonte de carbono. Valores são médias de três repetições.

Isolado Bacteriano	PHB	Biomassa	EPS	% PHB	EPS
	Produção (mg,L <sup>-1</sup> )			Produtividade (%)	
24.6b	36,6	76	33	48	43
30.6a2	28,4	188	83	15	44
9.5a	28,0	209	101	13	48
29.5b	26,0	229	90	11	39
24.6a	18,9	65	34	29	52
8.1c	18,3	48	125	38	260
24.4b	14,7	70	85	21	121
34.6	10,1	102	156	10	153
54.6b	9,8	120	130	8	108
56.4b	9,1	105	73	9	70
71.3b	7,2	92	223	8	242
54.3	6,8	80	120	9	150
11.3a	6,2	92	244	7	265
3.6	6,1	97	198	6	204
65.4b	4,6	99	133	5	134
18.5a2	4,5	201	121	2	60
32.2a	3,6	110	135	3	123
24.6a	3,5	77	122	5	158
32.4a	3,0	65	168	5	259
46.4	2,2	193	99	1	51
54.1a	1,9	130	56	1	43
24.4a	1,7	70	75	2	107
22.1b	1,6	51	81	3	159
16.2	1,3	89	156	2	175
21.1b	1,2	27	78	5	289
34.2a	0,9	101	78	1	77
14.3	0,7	98	89	1	91
3.1b	0,4	17	25	3	147
15.1	0,3	100	225	0	225
1.6	0,2	100	203	0	203
57.4	0,1	62	100	0	161
14.4	0,1	60	100	0	167
21.5	nd*	43	113	nd	263
11.1b	nd	105	120	nd	114
47.6	nd	32	56	nd	175
59.6	nd	85	101	nd	119
7.1	nd	103	222	nd	216
BR29	40,9	199	100	21	50
BR96	38,5	210	105	18	50
BR7606	0,2	89	138	0	155
BR3267	0,1	56	156	0	279
BR520	0,1	102	229	0	225
BR527	0,6	98	155	1	158
<b>Coefficiente de Correlação de Spearman</b>				-0,89	-0,83

\*nd=não determinado

Com relação à produção de EPS, cinco isolados bacterianos de nódulos de guandu foram capazes de produzir quantidades superiores a 200 mg de EPS por litro de meio de cultura, representando um percentual de 13% das bactérias estudadas (Figura 31). Neste grupo, podem ser destacados os isolados 15.1; 71.3c e 7.1 que apresentaram produção de 225; 223 e 222 mg de EPS por litro de meio de cultura. Um grupo maior apresentou produção intermediária e EPS, entre 100 e 200 mg de EPS por litro, este grupo contém 18 isolados (47%) (Figura 31), neste grupo encontra-se o isolado 8.1c, que apresenta elevadas a produção e produtividade de PHB. Um conjunto de 15 isolados (40%) não foi capaz de produzir mais do que 100 mg de EPS por litro de meio de cultura (Figura 31), neste conjunto estão incluídos os isolados 24.6a e 24.6b, que também se destacaram com relação à produtividade de PHB.



**Figura 31.** Agrupamento dos isolados em função da produção de EPS em meio de cultura YEM.

Avaliando a produtividade de EPS, o isolado 21.1b destacou se, atingindo a produtividade de 289% (Tabela 31). A produtividade atingida pelo isolado 8.1c, que também apresentou grande produtividade de PHB também foi bastante elevado, atingido 260%.

A produção de EPS por bactérias isoladas de solos pode apresentar alta variabilidade uma vez que estes isolados apresentam diferenças nas características metabólicas. Resultados similares foram encontrados ao avaliar a produção de exopolissacarídeos por rizóbios isolados de indigófera na África, Kumari et al. (2009) verificaram que a produção de EPS variou muito entre cinco isolados testados utilizando-se o manitol como fonte de carbono. Avaliando bactérias que apresentam características culturais distintas, é possível verificar grande variabilidade na produção de EPS por diversas bactérias rizosféricas de diversos gêneros como *Peanibacillus*, *Pseudomonas*, *Azotobacter* dentre outras (HEBBAR et al., 1992). Ao avaliar a capacidade de bactérias isoladas da rizosfera do mandacaru (*Cereus jamacaru*) em solos da caatinga, em produzir EPS, Kavamura et al. (2009) também encontraram grande variabilidade na capacidade de produção destes polímeros entre os diversos grupos culturais encontrados.

Dentre os cinco isolados que apresentaram maior produção de EPS, apenas os isolados 11.3a e 7.1 se enquadraram no mesmo grupo cultura (grupo 34; tabela 10) os isolados 71.3b; 15.1 e 1.6 pertencem aos grupos 38, 31 e 2 respectivamente. O grupo 34 é o grupo onde se enquadrou a estirpe BR 520 no dendrograma de similaridade de bactérias de metabolismo

ácido. Este grupo apresentou grande produção de muco em cultivo em placas de Petri com meio YMA, o que sugere a capacidade de outros isolados em produzir estes EPS em meio líquido. Porém outros isolados do grupo 34 avaliados com relação à produção de EPS em meio líquido não apresentaram a capacidade de produzir estes EPS, sugerindo elevada variabilidade genética e cultural destes isolados. Isolados com características fenotípicas semelhantes que apresentam características culturais similares também podem variar de acordo com a quantidade de EPS produzido, além de apresentar perfis protéicos muito distintos nas mesmas condições de cultivo, avaliados através de estudos de proteômica (OLIVEIRA et al., 2009a). Os coeficientes de correlação de Spearman entre a biomassa celular e a produção de PHB ou EPS negativos indicam que a produção dos polímeros é inversamente proporcional à taxa de crescimento bacteriano, o que sugere uma regulação entre o metabolismo bacteriano em detrimento ao catabolismo, onde as células em determinado ponto de sua curva de crescimento não investem esqueletos de carbono para o crescimento, em detrimento da atividade metabólica das células.

A produção de ambos os polímeros pelas mesmas células, necessita de uma regulação bioquímica das bactérias, uma vez que ambas as vias metabólicas são grande drenos dos esqueletos de carbono. A via metabólica de síntese de PHB contém uma importante intersecção o ciclo do ácido cítrico (TCA) uma vez que a enzima acetil-CoA tiolase utiliza como substrato a acetil-CoA (KARR et al., 1984; TRAINER e CHARLES, 2006). Karr et al. (1984) demonstraram que a atividade da cetotiolase e da PHB sintase são negativamente correlacionados com a atividade de enzimas do ciclo do TCA, como a aceto-succinil-CoA transferase e piruvato desidrogenase em bacteróides *Bradyrhizobium japonicum* isolados de nódulos de soja. Mutantes de *R. eutropha*, que exibem a atividade de isocitrato desidrogenase reduzida, o acúmulo de PHB ocorre mais eficientemente do que na isolínea selvagem (LEE e PARK, 1996).

Outro fator envolvido na síntese de PHB é a concentração da acetil-CoA, através do mecanismo de regulação da concentração do substrato da enzima  $\beta$ -cetotiolase (HAYWOOD, et al., 1988), uma vez que a afinidade da  $\beta$ -cetotiolase para este substrato é muito baixa ( $K_m=0,5$  mM), se comparado com a afinidade da enzima citrato sintase para este substrato ( $K_m =0,07$ mM) em *Methylobacterium rhodesianum* (MOTHES et al., 1997). Além de haver a competição entre as enzimas  $\beta$ -cetotiolase e citrato sintase pelo substrato, a inibição pelo produto CoA ocorre em menores concentrações para a citrato sintase e em maiores para a  $\beta$ -cetotiolase (MOTHES et al., 1997). Além da concentração do produto, a reação catalizada pela enzima  $\beta$ -cetotiolase é NAD(P)H dependente, dessa forma as concentrações celulares de NAD(P) e NAD(P)H influenciam na velocidade desta reação. Concentrações mais elevadas de NAD(P)H inibem em maiores concentrações para a  $\beta$ -cetotiolase do que para a citrato sintase (MOTHES et al., 1997) e para a isocitrato desidrogenase (KESSLER e WITHOLT, 2001) e a citrato sintase, favorecendo a via metabólica de síntese o PHB em detrimento ao metabolismo do ciclo do TCA.

Avaliando a capacidade de produzir EPS, uma intersecção teórica foi proposta por Pirog et al. (2003) para bactérias do gênero *Acinetobacter* onde o piruvato oriundo da glicólise e a acetil-CoA são drenados pela síntese do monômero de um único EPS sintetizado por bactérias deste gênero. Além da possível interação entre essas vias metabólicas, a demanda de carbono pela síntese de EPS provavelmente resulta em uma regulação metabólica entre as vias biossintéticas dos EPS e as demais vias metabólicas primárias e secundárias das células (SKORUPSKA et al., 2006). Dessa forma como a produção de EPS e PHB demandam grande quantidade de carbono bacteriano, e no caso do PHB há uma intersecção com o ciclo do TCA, o metabolismo bacteriano para a produção destes dois polímeros, são raras as estirpes que apresentam em um mesmo estado fisiológico a produção elevada dos dois polímeros (TAVERNIER et al., 1997; QUAGLIANO e MIYAZAKI, 1999).

Quagliano e Miyazaki (1999) avaliaram a produção de EPS e PHB por estirpes de *Azotobacter* spp. em relação a condições de cultivo como temperatura, e as fontes de carbono utilizadas, direcionaram a produção de um polímero ou outro. Tavernier et al. (1997) avaliaram a produção de EPS e PHB por duas estirpes de *Rhizobium*, verificando que uma delas apresentava a produção de elevadas quantidades de ambos os polímeros independente da concentração dos componentes do meio de cultura, o que não ocorrera com a outra estirpe avaliada. Dentre os isolados capazes de sintetizar as maiores quantidades de EPS, o isolado 71.3b; foi o que apresentou maiores quantidades de PHB atingindo concentração de apenas 7,2 mg.L<sup>-1</sup>, com a produtividade de PHB de 8% (Tabela 31) O isolado 11.3a apresentou a capacidade de produzir 6,2 PHB por litro e produtividade de 7% (Tabela 31). Os outros três isolados que produziram mais de 200 mg de EPS por litro de meio de cultura, produziram menos de 1mg de PHB por litro de meio (Tabela 31), o que corrobora a hipótese de haver uma regulação entre as duas vias metabólicas além das demais vias do metabolismo primário da célula.

De acordo com a produtividade apresentada para o PHB no meio YM utilizando o manitol como fonte de carbono, os isolados 24.6a; 24.6b e 8.1c foram avaliados de acordo com a capacidade de crescer, produzir PHB e EPS em meio de cultura YM, modificado pela substituição da fonte de carbono os resultados estão apresentados na Tabela 32. Os três isolados avaliados apresentaram menor produção de biomassa celular, sugerindo o comprometimento do crescimento utilizando fontes de carbono alternativas ao manitol.

Essa redução na massa celular provavelmente colaborou para a diminuição da concentração de PHB e EPS totais. Porém a produtividade de PHB foi elevada na maioria das fontes de carbono utilizadas, com destaque para o amido e a xilose para o isolado 24.6b, que atingiu produtividades de 69 e 54% respectivamente e para o amido e a frutose para o isolado 8.1c que atingiu produtividades de 49 e 53% respectivamente (Tabela 32). O isolado 8.1c apresentou também uma elevada produtividade de EPS quando cultivado em meio de cultura suplementado com xilose, atingindo mais de 13 vezes a biomassa seca. Avaliando a produção e a produtividade relativas, ou seja, o percentual de incremento ou de redução em relação ao mesmo parâmetro avaliando o crescimento dos isolados em meio de cultura YEM com o manitol como fonte de carbono, foi possível observar que para os três isolados avaliados a produção de PHB foi inferior do que a produção do mesmo polímero com as bactérias crescidas em meios de cultura contendo as diferentes fontes de carbono (Tabela 32).

Um parâmetro interessante para avaliar a produtividade de PHB e EPS das bactérias cultivadas em meio de cultura é a relação entre a produtividade entre os meios de cultura padrão e os meios de cultura modificados, aqui denominado “produtividade relativa”. Ao avaliar a produtividade relativa, o isolado 24.6b apresentou produtividade 38% maior quando o amido foi utilizado como fonte de carbono. O isolado 24.6a também apresentou um incremento de 50% com relação ao mesmo parâmetro quando cultivado em meio que também continha o amido como única fonte de carbono. O isolado 8.1c apresentou aumento na produtividade de PHB quando crescido em meio suplementado com quatro das cinco fontes de carbono testadas. Apenas quando cultivado utilizando a glicose como fonte de carbono este isolado apresentou decréscimo na produtividade relativa (Tabela 32). Para este isolado, as fontes de carbono que proporcionaram maiores produtividades relativas foram a frutose seguida do amido, com incrementos de 231 e 206% respectivamente (Tabela 32).

**Tabela 32.** Produção de PHB e EPS e biomassa seca e produtividade de EPS e PHB pelos isolados 8.1c; 24.6a e 24.6b cultivadas em meio YEM contendo diferentes fontes de carbono.

Isolado	Fonte de carbono	PHB	Biomassa	EPS	PHB	EPS	PHB	Biomassa	EPS	PHB	EPS
		Produção (mg.L <sup>-1</sup> )			Produtividade (%)		Produção relativa (%)*			Produtividade relativa(%)*	
<b>24.6b</b>	<b>Frutose</b>	13,53	32	49	42	153	-63	-56	17	-16	164
	<b>Glicose</b>	2,86	30	19	10	63	-92	-59	-55	-80	9
	<b>Sacarose</b>	8,09	17	15	48	88	-78	-77	-64	-4	52
	<b>Xilose</b>	10,8	20	23	54	115	-71	-73	-45	8	98
	<b>Amido</b>	8,29	12	7	69	58	-77	-84	-83	38	0
	<b>Manitol</b>	36,69	73	42	50	58	-	-	-	-	-
<b>8.1c</b>	<b>Frutose</b>	8,95	17	44	53	259	-39	-82	-83	231	-8
	<b>Glicose</b>	3,22	44	33	7	75	-78	-52	-87	-56	-73
	<b>Sacarose</b>	5,64	19	39	30	205	-61	-79	-85	88	-28
	<b>Xilose</b>	4,08	10	134	41	1340	-72	-89	-48	156	373
	<b>Amido</b>	6,91	14	35	49	250	-53	-85	-87	206	-12
	<b>Manitol</b>	14,61	92	260	16	283	-	-	-	-	-
<b>24.6a</b>	<b>Frutose</b>	0,64	3	2	21	67	-90	-91	-90	17	14
	<b>Glicose</b>	1,05	5	5	21	100	-83	-85	-75	17	69
	<b>Sacarose</b>	1,68	12	23	14	192	-73	-65	15	-22	225
	<b>Xilose</b>	0,52	14	11	4	79	-92	-59	-45	-78	34
	<b>Amido</b>	2,73	10	6	27	60	-56	-71	-70	50	2
	<b>Manitol</b>	6,2	34	20	18	59	-	-	-	-	-

\* Percentual de incremento de produção ou produtividade em relação ao mesmo parâmetro avaliado utilizando o manitol como fonte de carbono

A produtividade de PHB por estirpes de rizóbio ‘*in vitro*’ depende das condições culturais. A alteração das fontes de carbono e/ou nitrogênio pode incrementar a produtividade de PHB em isolados de rizóbio de aproximadamente 10% para produtividades acima de 70% da matéria seca bacteriana (MERCAN et al., 2002). Outros isolados bacterianos, como por exemplo, bactérias da espécie *R. eutropha* são capazes de ter produtividades de PHB superiores a 90% da biomassa seca celular (KOLLER et al., 2007).

Diversos estudos têm demonstrado o papel do PHB na proteção de células em deficiência de nutrientes, como sais e carbono (POVOLO e CASELLA, 2004; HELM, et al., 2008; RATCLIFF et al., 2008). A mudança da fonte de carbono do meio de cultura pode ter representado uma condição limitante ao desenvolvimento e reprodução bacterianos, o que pode ter resultado no acúmulo de PHB em grandes concentrações celulares, mesmo em bactérias que apresentaram baixa biomassa celular no meio de cultura. Porém não é apenas a falta de nutrientes que resulta no acúmulo de PHB, uma vez que nem em todas as fontes de carbono onde as bactérias apresentaram baixo crescimento e desenvolvimento as concentrações celulares de PHB foram elevadas, indicando haver afinidade entre as estirpes e determinadas fontes de carbono. Estas informações são importantes para a elaboração de meios de cultura e condições de cultivo para a produção de PHB em larga escala.

A elevada produtividade de PHB em condições de cultivo das células em algumas fontes de carbono são ainda mais interessantes do ponto de vista industrial. Os isolados 24.6b e 8.1c apresentaram elevada capacidade de acumular PHB quando cultivadas utilizando o amido como fonte de carbono (Tabela 32). O amido pode ser produzido a partir de culturas com pouco valor comercial, como mandioca, jacatupé, araruta e pupunha. Estas culturas podem ser fontes de amido de baixo custo e interessantes para a adoção na fabricação do PHB em larga escala. Outras bactérias já foram testadas com relação à capacidade de produzir PHB quando crescidas em meios de cultura contendo o amido como única fonte de carbono e a produtividade de PHB foi bastante elevada para bactérias como *Bacillus* sp. (HALAMI, 2008), *Ralstonia eutropha* (HAAS et al., 2008) e *Azotobacter* spp. (MARTINEZ-TOLEDO et al., 1995; KIM, 2000).

Além do amido, a xilose é uma fonte de carbono de baixo custo para a produção de biopolímeros, uma vez que este açúcar é o principal resultante da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar, rejeito produzido pela indústria sucro-alcooleira. Em um estudo avaliando a capacidade de mais de 3000 isolados bacterianos em produzir PHAs utilizando a xilose como única fonte de nitrogênio, Lopes et al. (2009) identificaram um isolado de *Bacillus* spp. capaz de atingir a produtividade superior a 60% de polihidrialcenoatos. Silva et al. (2004) avaliando a capacidade de um isolado de *Burkholderia sacchari* e outro de *B. cepacia*, verificaram elevada produtividade (em torno de 60%) de PHB isolados, utilizando como fontes de carbono, a xilose (reagente analítico) ou o bagaço de cana hidrolisado. A capacidade do isolado 24.6b em produzir altas concentrações de PHB, em dois substratos de baixo custo, coloca este isolado como bactéria potencial para a utilização em programas de seleção de estirpes bacterianas para a produção de PHB em escala industrial.

Ainda em relação a utilização de xilose como fonte de carbono, vale ressaltar que o isolado 8.1c também foi capaz de produzir uma quantidade muito elevada de EPS, e a produtividade de PHB atingiu 41% (Tabela 32), indicando o potencial deste isolado para programas de seleção de isolados para a co-produção de EPS e PHB. Outros isolados de bactérias do solo como *Pseudomonas putida* e *P. aeruginosa* também são capazes de produzir EPS utilizando diversas fontes de carbono, porém estes isolados apresentam maior produção e produtividade dos EPS quando crescidas em meio contendo xilose como única fonte de carbono, em detrimento de fontes como a frutose e a glicose dentre outras (CELIK et al., 2007).

Diversas bactérias testadas para a produção de PHB também apresentam resistência a



elevadas concentrações de NaCl. O aumento da concentração deste sal em meios de cultura pode representar uma estratégia para a produção de PHB por estes isolados, uma vez que diversas estirpes de rizóbio podem produzir maiores concentrações de PHB quando cultivadas em meio de cultura com maior concentração de sais (ARORA, et al., 2006). Além disso, a produção de o elevado acúmulo de PHB por isolados de rizóbio faz destas bactérias candidatas à aplicação industrial necessitando apenas de desenvolvimento de métodos e meios de cultivo adequados para a produção de PHB em condições de crescimento em meio de cultura líquido.

Dessa forma além de haver a necessidade de seleção constante de germoplasma bacteriano com a capacidade de produzir grandes quantidades de PHB e exopolissacarídeos, a determinação de meios de cultura e condições de cultivo de baixo custo são necessários para o incremento da produção desses polímeros e sua aplicação industrial. As bactérias testadas no presente estudo, com destaque para os isolados 8.1c e 24.6b, apresentam a capacidade de produzir os biopolímeros estudados em condições de cultivo de rotina em laboratórios de microbiologia básica, além de utilizar substratos de baixo custo para a produção. Essas características demonstram o potencial biotecnológico dessas bactérias.

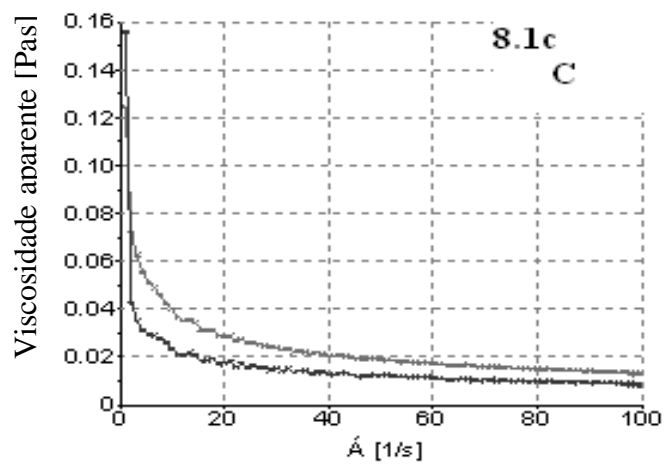
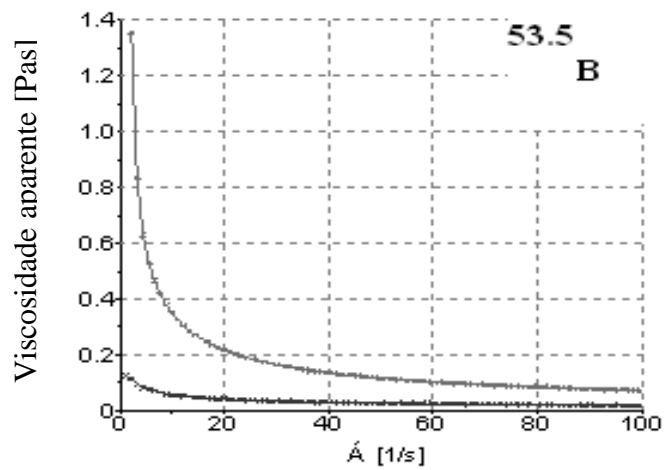
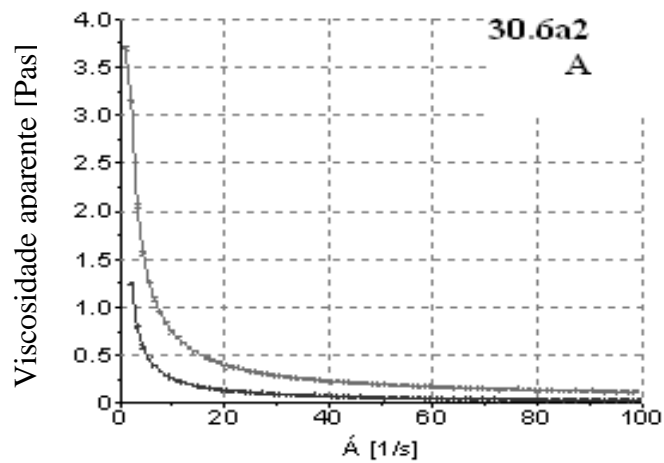
#### **2.4.3–Avaliação da Reologia de Soluções de Exopolissacarídeos Produzidos por Isolados Bacterianos Oriundos de Nódulos de Guandu**

Todas as soluções estudadas apresentam comportamento não newtoniano e pseudoplástico. Os fluidos não newtonianos apresentam a característica de variar a viscosidade em função da taxa de cisalhamento. Os fluidos pseudoplásticos são fluidos não-newtonianos onde o aumento da taxa de cisalhamento resulta no decréscimo da viscosidade (BRETAS e SCURACCHIO, 2003). O comportamento pseudoplástico diminui acentuadamente quando a concentração da mistura diminui o que era esperado uma vez que a viscosidade diminui com a concentração. Este comportamento é característico para solução de polissacarídeos (MANO e MENDES, 2006).

Comparando os resultados obtidos na Figura 32 é possível observar valores diferentes de viscosidade inicial e que esses valores diminuem com a taxa de cisalhamento mínima. Estudos preliminares realizados com o muco produzido por essas bactérias mostraram que os materiais apresentavam, visualmente, diferentes elasticidades ao contato com o bastão de vidro. Essa observação sugere que esses polímeros devem possuir massas moleculares diferentes e/ou estruturas moleculares distinta.

Apesar de ter sido observada o comportamento pseudoplástico para todas as amostras, é possível verificar que a queda da viscosidade em função da taxa de cisalhamento é mais abrupta para as soluções de polissacarídeos produzidos pelos isolados 53.5 e 30.6a2, comparando com as soluções de EPS do isolado 8.1c. A viscosidade decai significativamente entre zero e  $10 \text{ s}^{-1}$ , para todas as soluções de exopolissacarídeos avaliadas (Figura 34). Estes isolados apresentam características culturais distintas, agrupando-se em diferentes grupos e subgrupos no agrupamento de acordo com as características fenotípicas conforme demonstrado no capítulo 1.

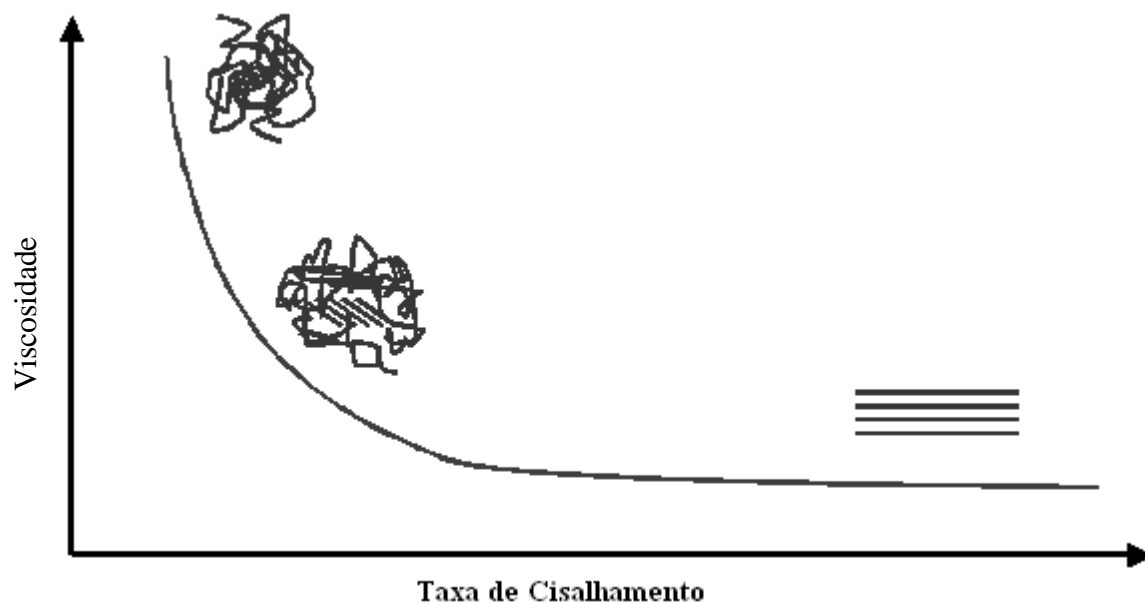
As características químicas dos EPS de isolados bacterianos relacionados podem variar de acordo com as características bioquímicas específicas de cada bactéria (SKORUPSKA et al., 2006). EPS com diferentes características químicas podem ter características reológicas distintas, conforme proposto anteriormente (SUTHERLAND, 2001). Os isolados avaliados com relação à reologia dos EPS pertencem, a grupos morfológicos distintos, sendo assim microrganismos com características bioquímicas distintas, o que pode colaborar para a biossíntese de EPS distintos.



**Figura 32.** Variação da viscosidade em função da taxa de cisalhamento de soluções de EPS produzido pelos isolados 30.6a2 (A), 53.5 (B) e 8.1c (C) nas concentrações 5 (inferior) e 10 (superior) mg.L<sup>-1</sup>

Todas as soluções de EPS avaliadas nos ensaios de reologia apresentaram alterações na viscosidade muito sutis após a taxa de cisalhamento de  $40 \text{ s}^{-1}$ . Pouca alteração na viscosidade após uma determinada taxa de cisalhamento foi observada, pois com o aumento da tensão de cisalhamento aplicada ocorre um rearranjo das cadeias poliméricas, reduzindo a interação entre as macromoléculas, facilitando o fluxo, ou seja, acentuando o comportamento viscoso em detrimento do comportamento elástico (Figura 33) (CHARM, 1962; IBANOGLU, 2002). Por outro lado, a elevada taxa de cisalhamento pode ocorrer destruição das cadeias poliméricas, o que resultaria também numa diminuição acentuada da viscosidade, o que não foi verificado em nossos experimentos.

Resultados similares já foram encontrados para soluções de outros polímeros naturais, como amido de milho e de banana (IZIDORO et al., 2007); goma arábica (IBANOGLU, 2002), goma xantana (ANTUNES et al., 2003; ROTTAVA et al., 2007) e blendas carboximetilcelulose/amido (ROHR et al., 2006; OLIVEIRA et al. 2007c).



**Figura 33.** Modelo da reorganização das moléculas poliméricas com o aumento da taxa de cisalhamento em função da tensão de cisalhamento imprimida sobre o fluido polimérico, conforme proposto por Charm (1962).

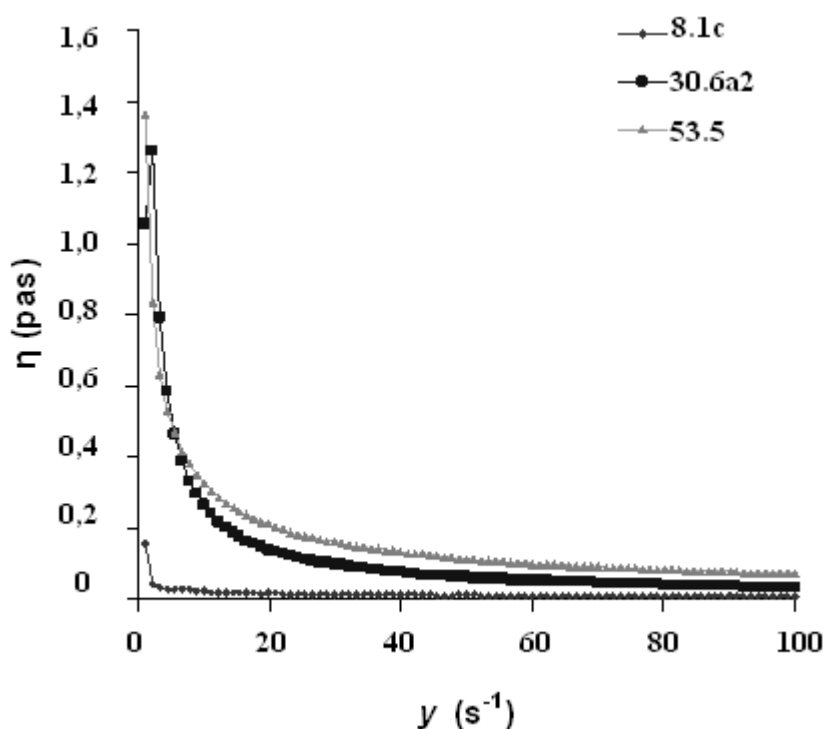
Estudos avaliando a reologia de EPS de *Xanthomonas* demonstraram que isolados que se agruparam em diferentes grupos de acordo com a análise da diversidade, utilizando marcadores moleculares RAPD, também apresentaram EPS com reologias distintas (ROTTAVA et al., 2007). Estirpes de *X. campestris* pv. *pruni* apresentaram produção de EPS distintas, porém com as mesmas características reológicas (ANTUNES et al., 2003). Em outro estudo avaliando variação da taxa viscosidade em função da taxa de cisalhamento de goma xantana produzida por diferentes isolados de *Xanthomonas anonopodis* pv. *phaseoli*, Mayer et al. (2008) demonstraram variação muito similar da viscosidade em EPS de isolados de diferentes regiões do Brasil, indicando que mesmo entre bactérias de características fenotípicas distintas, as características dos EPS podem ser similares.

Analisando reograma da viscosidade em função da taxa de cisalhamento dos três isolados (Figura 34) é possível perceber que o comportamento dos EPS dos isolados 30.6a2 e do isolado 53.5 são muito similares. Já o EPS do isolado 8.1c apresenta comportamento

diferenciado, tendo uma viscosidade muito baixa mesmo com tensões de deformação ainda muito baixa, ocorrendo redução conforme ocorre o aumento da taxa de cisalhamento, decorrente do comportamento pseudoplástico desses fluidos (Figuras 32 e 34).

As características reológicas de soluções de EPS de rizóbio variam de acordo com a origem do isolado e com a forma de ressuspensão (KACI et al., 2005). Dessa forma a ressuspensão dos precipitados em água, conforme descrito em diversos trabalhos da literatura padroniza uma das variáveis que influenciam na variabilidade de resultados de reologia de EPS de rizóbio, dessa forma a variabilidade encontrada pode ser atribuída apenas à variabilidade entre os isolados e não um artefato de técnica.

Estes resultados indicam que as estruturas dos EPS produzidos pelos isolados 30.6a2 e 53.5 são mais similares entre si se comparadas com a estrutura dos EPS produzidos pelo isolado 8.1c. Mandal et al. (2007) avaliando a composição de EPS de estirpes de rizóbio de mungo verde mostraram que isolados de rizóbio muito próximos, com características fenotípicas muito semelhantes podem produzir EPS com diferenças em sua estrutura química. A variabilidade entre o comportamento reológico de EPS de três rizóbios de crescimento ácido e rápido mostrou que dois dos isolados eram capazes de produzir EPS com comportamentos reológicos muito semelhantes, destoando de um terceiro rizóbio que apresentava menor redução da viscosidade em função da taxa de cisalhamento (OLIVEIRA et al., 2009b).



**Figura 34.** Comparação da variação da viscosidade em função da taxa de cisalhamento de solução de EPS produzido pelos isolados 8.1c, 30.6a2 e 53.5 na concentração 10 mg.L<sup>-1</sup>

O comportamento pseudoplástico foi também observado ao avaliar a reologia de soluções de diferentes microrganismos, como a bactéria patogênica *Klebsiella oxytoca* (FENG et al., 2009); as cianobactérias *Oscillatoria* sp., *Nostoc* sp. (PARIKH e MADAMWAR, 2006), de rizóbios *Rhizobium* spp. (KACI et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2009b), da bactéria Gram-positiva *Pediococcus parvulus* (VELASCO et al., 2009) fungo

basidiomiceto *Phellinus* spp. (HWANG et al., 2004).

A determinação do comportamento reológico de soluções de EPS são importantes para a avaliação da aplicabilidade destes materiais, auxiliando no dimensionamento de bombas e equipamentos para a sua manipulação em média ou larga escala.

#### **2.4.6–Avaliação da Atividade Amilolítica por Estirpes de Rizóbio.**

Dentre as diversas técnicas semi-quantitativas para a determinação da atividade amilolítica, a avaliação através do cultivo em meio de cultura sólido suplementado com amido e a quantificação através da técnica de tintura de iodo, apresenta-se como o metodologia rápida e de fácil execução. Este método permite ainda a avaliação de uma quantidade grande de bactérias em ensaios iniciais, para posteriores avaliações de quantitativas com métodos mais laboriosos e de custos mais elevados (OLIVEIRA et al., 2006).

Dentre os isolados avaliados quatro bactérias apresentaram atividade amilolítica muito grande, com destaque para o isolado 47.3b cujo halo resultante da atividade hidrolítica foi 3,7 vezes maior que o diâmetro da colônia (Tabela 33 e Figura 35). Outros quatro isolados apresentaram atividade amilolítica mediana, cujos índices enzimáticos foram de aproximadamente 1,5 (Tabela 33). Outros 26 isolados apresentaram atividade amilolítica baixa, não sendo capazes de produzir enzimas extracelulares, hidrolisando apenas o amido presente sob a colônia (Tabela 3).

Estirpes de bactérias isoladas de nódulos são fontes de enzimas de interesse biotecnológico. Oliveira et al. (2006), avaliando a atividade amilolítica e rizóbios da Amazônia, encontraram rizóbios com atividade amilolítica atingindo índices enzimáticos de até 3,1. Os mesmos isolados também apresentaram a capacidade de produzir outras enzimas de interesse industrial como, proteases e carboximetilcelulases. As condições de cultivo, tais como temperatura de incubação e pH do meio de cultura, influenciam na atividade amilolítica das bactérias, provavelmente pela extrusão de enzimas no meio de cultura (FLOR et al., 2009). Dentre os isolados estudados por Flor et al. (2009) pode ser destacado um isolado oriundo da Terra Preta atingiu IE de 4,1 quando cultivado em pH 5,0 e a 25°C.

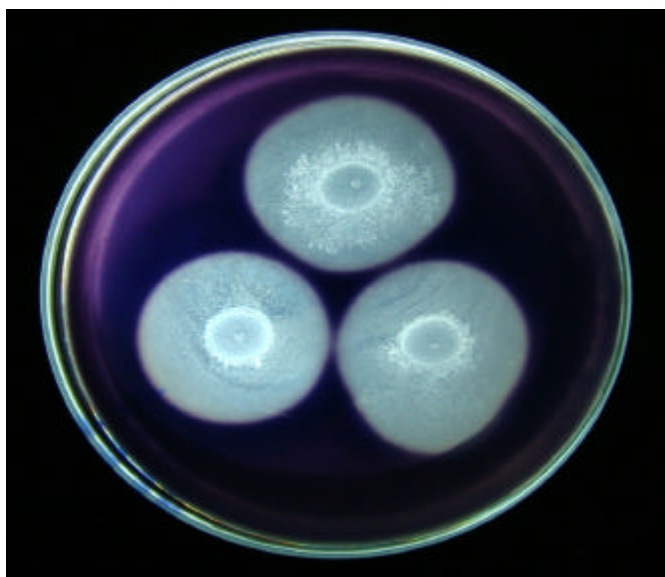
As enzimas amilolíticas têm aplicações na indústria alimentícia como na produção de bebidas com menores teores de calorias, e redução do tamanho da cadeia do amido, aumentando a digestibilidade de produtos alimentares para seres humanos e animais (KIRK et al., 2002). As condições de cultivo dos isolados para a avaliação da capacidade de degradar o amido foi realizado em condições de incubação simples, não necessitando de incubadores com atmosferas controladas e injeção de gases, o que colaboraria para o aumento do custo de produção das amilases em condições de larga escala. Dessa forma, a produção de amilases pode representar uma atividade alternativa para as indústrias do setor de inoculantes conforme discutido para a produção de EPS e de PHB.

O amido utilizado para avaliar a capacidade amilolítica pode ter influencia na determinação da atividade hidrolítica. O amido utilizado no presente estudo é um reagente analítico, com elevado grau de pureza, o que resulta em maior estabilidade das moléculas de amilose, dificultando a hidrólise por parte dos microrganismos. Outras fontes de amido mais lábeis podem resultar em maior atividade hidrolítica dos isolados. Ao comparar a capacidade de bactérias isoladas de nódulos de leguminosas da Amazônia em hidrolisar amidos de diferentes fontes, Oliveira et al. (2007a) observaram maiores atividades amilolíticas e produção de biomassa celular utilizando farinha de aveia e de batata como fonte de amido, comparando com outras fontes como o amido de milho e de pupunha dentre outros. A atividade amilolítica desses rizóbios ainda fora bastante elevada quando cultivados utilizando a farinha de pupunha como fonte de amido (OLIVEIRA et al., 2007b).

**Tabela 33.** Atividade amilolítica por bactérias isoladas de nódulos de guandu avaliada através da técnica de coloração com tintura de iodo.

Isolado	Diâmetro da colônia	Diâmetro do halo	Índice Enzimático
	cm		
47.3b	1	3,7	3,7a
3.6	1	2,1	2,1a
28.3	1	1,8	1,8a
34.2a	1	1,7	1,7a
71.3b	1	1,5	1,5b
22.1b	0,6	0,9	1,5b
54.3	0,7	1	1,4b
65.4b	0,7	1	1,4b
11.3a	1,5	1,8	1,2c
54.6b	1,1	1,3	1,2c
57.4	1,1	1,3	1,2c
24.6b	1,2	1,4	1,2c
3.1b	0,6	0,7	1,2c
3.6	1,3	1,5	1,2c
21.5	1,3	1,5	1,2c
8.1c	0,9	1	1,1c
14.3	0,9	1	1,1c
24.6b	1	1,1	1,1c
24.4b	1	1,1	1,1c
32.4a	1	1,1	1,1c
34.6	1,3	1,3	1,0c
56.4b	1,1	1,1	1,0c
32.2a	0,9	0,9	1,0c
24.6a	1,7	1,7	1,0c
54.1a	1	1	1,0c
24.4a	0,9	0,9	1,0c
16.2	0,9	0,9	1,0c
21.1b	1,1	1,1	1,0c
1.6	1,3	1,3	1,0c
15.1	1	1	1,0c
1.6	1,2	1,2	1,0c
14.4	1	1	1,0c
7.1	1	1	1,0c
11.1b	1,1	1,1	1,0c

\* Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Skot-Knot ao nível de significância de 5%.



**Figura 35.** Atividade amilolítica do isolado 47.3b avaliada através do método de coloração com tintura de iodo em placa de Petri (diâmetro da placa: 9 cm).

As condições de cultivo também podem influenciar na capacidade de produzir enzimas por diversas bactérias. Ao avaliar a capacidade de produzis amilase por estirpes de *Bacillus* sp., Teodoro e Martins (2000) verificaram que a produção e a estabilidade de a-amilases dependiam do pH e da temperatura, encontrando o ponto de produção máxima com o pH 6 e a temperatura entre 55 e 60°C. Flor et al. (2009) avaliaram a influência das condições de cultivo na produção das enzimas hidrolíticas por rizóbios isolados da Amazônia, encontrando para cada isolado uma combinação de características peculiares, que culminavam na atividade hidrolítica máxima. A influência das condições de cultivo já foi observada para a produção de amilases e outras enzimas por fungos como o gênero *Mucor*, por exemplo (ALVES et al., 2002). Os ensaios realizados no presente estudo, representam um ensaio inicial de pré-seleção de isolados para a produção de amilases, a partir destes resultados as condições de cultivo podem ser adaptadas, avaliando a condição na qual os isolados sejam capazes de hidrolisar maiores quantidades de amido.

Os isolados 8.1c e 24.6b, que apresentaram elevada produtividade de PHB quando cultivados em meios de cultura utilizando o amido como única fonte de carbono, não apresentaram elevada atividade amilolítica quando cultivados em meios de cultura sólido, indicando que para a produção do PHB a atividade das amilases não apresentam influência.

A compreensão da capacidade de microrganismos em produzir amilases e outras enzimas degradadoras de polímeros é importante não só do ponto de vista industrial, mas também podem revelar importantes informação da ecologia desses microrganismos. A avaliação da capacidade de produzir a-amilases e pectinases por isolados de *Alternaria solani* oriundos de diferentes regiões do Brasil, foi positivamente correlacionada com a patogenicidade em plantas de tomateiro (MARCHI et al., 2006). Outro exemplo de produção de enzimas e interação de microrganismos foi a recente descoberta de uma celulase sem a qual não é possível haver a infecção de *Trifolium* sp. por *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (ROBLEDO et al., 2008).

Dos 4 isolados que apresentaram maior atividade amilolítica, dois foram isolados do Planossolo Háplico do SIPA (Isolados 47.3b e 28.3), um isolado do Planossolo Háplico do terraço (34.2a) e um do Latossolo Amarelo de Pinheiral (3.6). Estes três solos são solos que apresentam fertilidade natural muito boa, com elevadas concentrações de potássio, fósforo. A elevada fertilidade desses solos pode Ter selecionado microrganismos capazes de apresentar

uma capacidade diferente daquela que as demais bactérias apresentaram. As características além de influenciar na diversidade microbiana, podem ter influência na atividade enzimática dos microrganismos neste habitat (PASSOS et al., 2008b). Atividade de enzimas como a  $\beta$ -galactosidase na rizosfera de ervilha é alterada de acordo com as características de fertilidade dos solos onde as plantas foram cultivadas (WEN et al., 2008). Alterações na atividade enzimática de microrganismos em solos com diferentes características de fertilidade plantados com eucalipto, também foram reportadas (CHAER e TÓTOLA, 2007). Dessa forma, é desejável que para a seleção de microrganismos do solo com o objetivo de produção de enzimas de interesse biotecnológico, os parâmetros da fertilidade do solo sejam observados com atenção.

Vale ressaltar que dois dos quatro microrganismos que apresentaram maiores atividades amilolíticas são oriundos de solos do SIPA. Este ambiente é uma fonte de microrganismos com características muito peculiares, como fungos micorrízicos, *Pseudomonas*, bactérias formadoras de nódulos em leguminosas, dentre outros. Até então os microrganismos oriundos dos solos do SIPA haviam sido avaliados principalmente em relação à capacidade de fixar nitrogênio atmosférico (no caso dos rizóbios e das bactérias associativas) e de solubilizar fosfatos (no caso dos fungos micorrízicos), bem como o seu desempenho em condições de campo em diversas culturas. Os resultados do presente estudo indicam que além de apresentarem importância agrônômica, os microrganismos do SIPA também servem a outros interesses biotecnológicos, como a produção de enzimas e biopolímeros.



## 2.5-CONCLUSÕES

Os isolados testados apresentam grande variabilidade na quantidade de quantidade de EPS e de PHB produzidos, podendo alcançar produtividades de até 69% de matéria seca celular na forma de PHB, indicando o potencial destes isolados para programas de seleção de bactérias produtoras de plásticos biodegradáveis.

A produção de PHB e de EPS é influenciada pela fonte de carbono fornecida ao microrganismo, e o desenho de meios de cultura para incrementar a produção destes materiais, pode ser uma estratégia para a maximização desta produção em escala industrial.

A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência se mostrou apropriada para avaliar a produção de PHB por estirpes de rizóbio nas condições avaliadas neste estudo.

Os três isolados cujos EPS foram avaliados nos ensaios de reometria, apresentaram comportamento pseudoplástico. A viscosidade inicial foi muito baixa para as soluções de EPS produzidos pelo isolado 8.1c, o que sugere diferenças nas estruturas moleculares deste em comparação aos demais isolados.

A maioria dos isolados avaliados para a produção de amilases falharam na capacidade de produzir enzimas amilolíticas, porém o isolado 47.3b foi capaz de atingir o IE de 3,7, um índice enzimático muito elevado, que demonstra o potencial deste isolado em produzir amilases.

### 3-CONCLUSÕES GERAIS

A avaliação da diversidade de rizóbios isolados de nódulos de guandu revelou uma diversidade fenotípica muito ampla para essas bactérias, resultando em uma coleção com 306 isolados que apresentam as mais diversas características culturais. Dentre essas características foram observadas tanto as características culturais mais características de grupos de rizóbios, como o crescimento rápido e capacidade de acidificar o meio de cultura ou o crescimento lento e a capacidade de alcalinizar o meio, como características culturais não muito comuns para os isolados rizobianos. Esses resultados indicam haver nesta coleção bactérias que pertencem a grupos ainda não descritos, corroborando os resultados da literatura internacional no que diz respeito ao isolamento e caracterização de bactérias de solos tropicais.

A avaliação da capacidade de estabelecer a simbiose com a planta hospedeira demonstrou a capacidade de isolados como o isolado 18.5a2 em nodular e induzir a produção de matéria seca em quantidades equivalentes àquelas alcançadas nos tratamentos inoculados com as bactérias recomendadas para a produção de inoculantes para o guandu. O potencial destes isolados para a avaliação em condições de campo são muito grandes e a possibilidade de algumas dessas bactérias em ser futuramente recomendadas para esta cultura são grandes, de acordo com os resultados preliminares encontrados no presente estudo.

Avaliando a produção de biopolímeros, algumas bactérias foram capazes de produzir grandes quantidades de PHB, EPS ou ambos, o que demonstra importantes aplicações biotecnológicas dessas bactérias, além da produção de inoculantes. Um destaque pode ser dado aos isolados 8.1c e 24.6b uma vez que esses isolados são capazes de produzir grandes quantidades de biopolímeros utilizando substratos de baixo custo como o amido e a xilose. Outro isolado que merece destaque é o isolado 47.3b que apresentou atividade amilolítica muito elevada e também tem um potencial para a na produção em escala comercial deste complexo enzimático.

#### 4-CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avaliação da diversidade rizobiana em solos com diferentes manejos traz importantes informações a respeito dos impactos desses manejos nos solos nos agroecossistemas. Os resultados encontrados no presente trabalho vão ao encontro com as informações encontradas na literatura a cerca da caracterização de isolados rizobianos. A caracterização fenotípica dos isolados é importante em um contexto mais amplo de caracterização polifásica, onde são integradas informações a respeito dos estudos de diversidade fenotípica, biologia molecular e ecologia. A abordagem polifásica na caracterização de bactérias de nódulos de leguminosas tem resultado na descrição de diversas espécies novas e dentre os isolados presentes na coleção de rizóbios de guandu, com certeza há espécies ainda não descritas e que podem ser catalogadas a partir de estudos de diversidade em uma abordagem polifásica. Para tal, são necessários estudos de biologia molecular de isolados selecionados, empregando as técnicas como BOX-PCR, AFLP e seqüenciamento do 16S rDNA. Estes estudos não foram realizados nesta tese devido ao curto tempo no qual o trabalho foi desenvolvido.

Da mesma forma avaliações de isolados selecionados em condições de campo são imprescindíveis para a possível recomendação destes isolados para a produção de inoculantes. O experimento de casa de vegetação apontou para uma elevada eficiência desses isolados em condições não estéreis e a avaliação da reprodutibilidade desses resultados em condições de campo e em diferentes regiões do Brasil são necessários.

A determinação da concentração de PHB nas células através da utilização da cromatografia líquida de alta eficiência mostrou-se bastante adequada reprodutível. Porém avaliações mais qualitativas a respeito dos monômeros que formam a cadeia polimérica desses PHAs são necessárias. Ensaio de cromatografia gasosa e de espectroscopia no infravermelho transformada por Fourier podem auxiliar nessas determinações e podem ser realizadas através de parcerias com grupos de pesquisa experientes nessa linha de pesquisa como o grupo da USP, por exemplo. Vale ressaltar que é de fundamental importância a prospecção de novas aplicações biotecnológicas da biodiversidade do solo, que pode resultar em maior valor agregado dos produtos oriundos dos processos industriais e na valorização da biodiversidade, um patrimônio não mensurável e que no Brasil costuma não ter o devido valor.

É interessante ressaltar que a linha de pesquisa de produção de biopolímeros bacterianos é uma linha nova para os membros do grupo de pesquisa, tanto para os pesquisadores da Embrapa Agrobiologia no CPGA-CS como para os alunos e professores da UFRRJ, e o aprendizado foi muito grande durante o curso do doutorado. Foi um desafio que foi enfrentado e gerou bons frutos, graças à parceria entre o Laboratório de Ecologia Microbiana da Embrapa Agrobiologia e do Laboratório de Ciência e Tecnologia de Polímeros do Instituto de Tecnologia da UFRRJ, resultando um grupo de pesquisa multidisciplinar com pesquisadores e estudantes com a capacidade para trabalhar em áreas que, em princípio, parecem desconexas.

## 5-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARONS, S. R.; GRAHAM, P. H. Response of *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* to acidity. **Plant and Soil**, v. 134: 145-151. 1991.
- ADU-GYAMFI, J.J.; MYAKA, F.A.; SAKALA, W.D.; ODGAARD, R.; VESTERAGER J.M.; HOGH-JENSEN H. Biological nitrogen fixation and nitrogen and phosphorus budgets in farmer-managed intercrops of maize-pigeonpea in semi-arid southern and eastern Africa. **Plant and Soil**, v.295: 127-136. 2007.
- AGUILAR, O. M.; RIVA, O.; PELTZER, E. Analysis of *Rhizobium etli* and of its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.101:13548-13553. 2004.
- ALEMZADEH, I. The study on microbial polymers: Pullulan and PHB. **Iraian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, v 28: 13-21. 2009.
- ALEXANDRE, A.; LARANJO, M.; OLIVEIRA, S. Natural populations of chickpea rhizobia evaluated by antibiotic resistance profiles and molecular methods. **Microbial Ecology**, v. 51: 128-136. 2006.
- ALONSO, A.; SANCHEZ, P.; MARTINEZ, J. L. Environmental selection of antibiotic resistance genes. **Environmental Microbiology**, v. 3: 1-9. 2001.
- ALVES, M. H.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; PORTO, A. L. F.; MILANEZ, A. I. Screening of *Mucor* spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33: 325-330. 2002.
- ALVES, S.M.C.; ABOUD, A.C.S.; RIBEIRO, R.L.D. ALMEIDA, D.L. Balanço do nitrogênio e fósforo em solo com cultivo orgânico de hortaliças após a incorporação de biomassa de guandu. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39: 1111-1117. 2004.
- AMARGER, N.; MACHERET, V.; LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *R. giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47: 996-1006. 1997.
- ANDERSON, A. J.; DAWES, E.A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiology Reviews**, 54:450-472. 1990.
- ANDRADE, D. S.; MURPHY, P. J.; GILLER, K. E.. Effects of liming and legume/cereal cropping on populations of indigenous rhizobia in an acid Brazilian Oxisol. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 34: 477-485. 2002.
- ANTUNES, A. E.; MOREIRA. A.; VENDRUSCOLO. J. L.; VENDRUSCOLO. C. T. Screening of *Xanthomonas campestris* pv *pruni* strains according to their production of xanthan and its viscosity and chemical composition, **Brazilian Journal of Food Technology**. v. 6: 317-322. 2003.
- ARORA, N.K.; SINGHAL, V.; MAHESHWARI, D.K. Salinity-induced accumulation of poli-β-hydroxybutyrate in rhizobia indicating its role in cell protection. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 22: 603-606. 2006.
- ASKEGAARD, M.; ERIKSEN, J. Residual effect and leaching of N and K in cropping systems with clover and ryegrass catch crops on a coarse sand. **Agriculture Ecosystems and**

**Environment**, v. 123: 99-108. 2008.

AYARZA, M.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. **Introdução de *Stylozantes guianensis* cv. Mineirão em pastagens de *Brachiaria riziensis*: Influência na produção da pastagem e na reciclagem da liteira**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. (Boletim Técnico nº1). Seropédica. 1997. p. 17.

BALANCHADAR, D.; RAJA, P.; KUMAR, K.; SUNDARAN, S.P. Non-rhizobial nodulation in legumes. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v.2: 49-57. 2007.

BANIK, R. M.; KANARI, B.; UPADHYAY, S. N. Exopolysaccharide of the gellan family: prospects and potential. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.16: 407–414. 2000.

BARBOSA, E.A.; PERIN, L.; REIS, V.M. Uso de diferentes fontes de carbono por estirpes de *Gluconacetobacter diazotrophicus* isoladas de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41: 827-833. 2006.

BELTRAME, T.V.; RODRIGUES, E. Feijão guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) na restauração de florestas tropicais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28: 19-28. 2007.

BEN REBAH, F., PREVOST, D., TYAGI, R.D., BELBAHRI, L. Poly-beta-hydroxybutyrate Production by fast-growing rhizobia cultivated in sludge and in industrial wastewater. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 158:155-163. 2009.

BENHIZIA, Y.; BENHIZIA, H.; BENGUEDOUAR, A.; MURESU, R.; GIACOMINI, A.; SQUARTINI, A. Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27: 462–468. 2004.

BERGE, O.; LODHI, A.; BRANDELET, G.; SANTAELLA, C.; RONCATO, M. A.; CHRISTEN, R.; HEULIN, T.; ACHOUAK, W. *Rhizobium alamii* sp. nov., an exopolysaccharide-producing species isolated from legume and non-legume rhizospheres. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59: 367-372. 2009.

BERGERSEN, F.J.; TURNER, G.L. A role for poly-3-hydroxybutyrate in bacteroids of soybean root nodules. **Proceedings of the Royal Royal Society B**, v. 245:59–64. 1991

BERWANGER, A.L.S.; SCAMPARINI, A.R.P.; DOMINGUES, N.M.; VANZO, L.T.; TREICHEL, H.; PADILHA, F.F. Produção de biopolímero sintetizado por *Sphingomonas capsulata* a partir de meios industriais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31: 177-183. 2007.

BILLA, N.; YUEN, K. H.; KHADER, M. A. A.; OMAR, A. Gamma-scintigraphic study of the gastrointestinal transit and in vivo dissolution of a controlled release diclofenac sodium formulation in xanthan gum matrices. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 201: 109-120, 2000.

BISHOP, P,E.; GUEVARA, J,G.; ENGELKE, J,A.; EVANS, J,H, Relation between glutamine syntetase and nitrogenase activities in the symbiotic association between *Rhizobium japonicum* and *Glycine max*, **Plant Physiology**, v, 57: 542–546, 1976.

BJORNDAL, H.; ERBING, C.; LINDBERG, B.; FAHRAEUS, G.; LJUGGREN, H. Studies on an extracellular polysaccharide from *Rhizobium meliloti*. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 25: 1281–1286. 1971.

BOGINO, P.; BANCHIO, E.; BONFIGLIO, C.; GIORDANO, W. Competitiveness of a *Bradyrhizobium* sp strain in soils containing indigenous rhizobia. **Current Microbiology**, v. 56: 66-72. 2008.

- BORDIN, I.; NEVES, C. S. V. J.; FRANCO JÚNIOR, P.; PRETI, E. A.; CARDOSO, C. . Crescimento de milho e guandu, desempenho de plantas cítricas e propriedades físicas do solo escarificado em um pomar. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32: 1409-1418. 2008.
- BORGES, W. L.; SANTOS, C. E. R. S.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. Nodulação e fixação biológica de nitrogênio em acessos de amendoim com estirpes nativas de rizóbios **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. v. 2: 32–37. 2007.
- BRAEKEN, K.; DANIELS, R.; VOS, K.; FAUVART, M.; BACHASPATIMAYUM, D.; VANDERLEYDEN, J.; MICHIELS, J. Genetic determinants of swarming in *Rhizobium etli*. **Microbial Ecology**, v. 55: 54-64. 2008.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 5, de 06 de agosto de 2004. **Aprova as definições e normas sobre especificações, garantias, registro, embalagem e rotulagem dos inoculantes destinados à agricultura, bem como a relação dos microrganismos autorizados para produção de inoculantes no Brasil**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 10 ago. 2004. Seção 1, p.17.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 10, de 23 de março de 2006. **Altera a relação dos microrganismos autorizados para produção de inoculantes no Brasil, constante do Anexo II, da Instrução Normativa nº 05, de 6 de agosto de 2004, que passa a ser aquela descrita no Anexo da presente Instrução Normativa**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 24 mar. 2006. Seção 1, p.16.
- BRATTI, A. E.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; MARTINS, C. M.; ZILLI, J. E.; GUERRA, J.G.M.; ALMEIDA, D. L. DE; NEVES, M. C. P. **Levantamento de rizóbios em adubos verdes cultivados em Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA)**, Seropédica, Embrapa Agrobiologia, Documentos, n. 204, 15p., 2005.
- BRAUNEGG, G.; SONNLEITNER, B.; LAFFERTY, R.M. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly-β-hydroxybutyric acid in microbial biomass. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 6: 29-37. 1978.
- BRETAS, R.E.S.; SCURACCHIO, C.H. Reometria de Placas Paralelas e Cone Placa. In: CANEVAROLLO JÚNIOR, S.V. **Técnicas de Caracterização de Polímeros**. Artliber. São Paulo. 2003 p. 448.
- BRHADA, F, POGGI M.C., SYPE, G.V., LE RUDULIER, D. Osmoprotection mechanisms in rhizobia isolated from *Vicia faba* var. major and *Cicer arietinum*. **Agronomie**, v. 21: 583–590. 2001
- BROCKHURST, M. A.; RAINEY, P. B.; BUCKLING, A. The effect of spatial heterogeneity and parasites on the evolution of host diversity. **Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, v. 271: 107-111. 2004.
- BROECKER, W.S. Future global warming scenarios. **Science**, v. 304: 388. 2004
- BROMFIELD, E.S.P.; STEIN, M.; WHITE, R.P. Identification of *Rhizobium* on antibiotic concentration gradient. **Annals of Applied Biology**, v. 101: 269–277. 1982.
- BULLARD, G.K.; ROUGHLEY, R.J.; PULSFORD, D.J. The legume inoculant industry and inoculant quality control in Australia: 1953-2003. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 45: 127-140. 2005.
- BURNS, R. C.; HARDY, R. W. I. **Nitrogen fixation in bacteria and higher plants**. New York: Springer-Verlag, 1975. 190 p. (Molecular Biology Biochemistry and Biophysics, 21).
- BUSHBY, H.V.A.; MARSHALL, K.C. Some factors affecting the survival of root nodule

- bacteria on desiccation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 9: 143–147. 1977.
- BYROM, D. Polymer synthesis by micro-organisms: technology and economics. **Trends in Biotechnology**, 5:246-250. 1987.
- CANELLAS, L.P.; ESPÍNDOLA, J.A.; GUERRA, J.G.M.; TEIXEIRA, M.G.; VELLOSO, A. C.X.; RUMJANEK, V.M. Phosphorus analysis in soil under herbaceous perennial leguminous cover by nuclear magnetic spectroscopy. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39: 589-596. 2004.
- CAPONE, D. G.; BURNS, J. A.; MICHAELS, A. F.; MONTOYA, J. P.; SUBRAMANIAM, A.; CARPENTER, E. J. Nitrogen fixation by *Trichodesmium* spp.: An important source of new nitrogen to the tropical and sub-tropical North Atlantic Ocean. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 19: 1-17. 2005.
- CASAS, J.A.; GARCIA-UCHOA, F. Viscosity of solutions of xanthan/locust bean gum mixtures. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 79: 25–31. 1999.
- CASTELLANE, T.C.L.; LEMOS, E.G.M. Composição de exopolissacarídeos produzido por estirpes de rizóbio cultivados em diferentes fontes de carbono. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42: 1503–1506, 2007.
- CELIK, G.Y.; ASLIM, B.; BEYATLI, Y. Characterization and production of the exopolysaccharide (EPS) from *Pseudomonas aeruginosa* G1 and *Pseudomonas putida* G12 strains. **Carbohydrate Polymers**, v. 73: 178-182, 2008.
- CEVALLOS, M.; ENCARNACION, S.; LEIJA, A.; MORA, Y.; MORA, J. Genetic and physiological characterization of a *Rhizobium etli* mutant strain unable to synthesize poly-beta-hydroxybutyrate. **Journal of Bacteriology**. v.178:1646–1654. 1996.
- CHAER, G.M.; TÓTOLA, M.R. Impacto do manejo de resíduos orgânicos durante a reforma de plantios de eucalipto sobre indicadores de qualidade do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.31:1381-1396. 2007.
- CHAGAS JÚNIOR; A.F.; OLIVEIRA, L.A.; OLIVEIRA, A.N. Tolerância à acidez e alumínio tóxico por isolados de rizóbios de solos no Amazonas, Brasil. **Acta Amazônica**, v. 39: 467–470. 2009.
- CHARLES, T.C., CAI, G., ANEJA, P. Megaplasmid and chromosomal loci for the PHB degradation pathway on *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*. **Genetics**, v. 146:1211–1220. 1997.
- CHARM, S. E. The nature of role of fluid consistency in food engineering applications advance. **Food Research**, v. 11: 356-361, 1962.
- CHAVERRA M.H.; GRAHAM, P.H. Cultivar variation in traits affecting early nodulation of common bean **Crop Science**, v. 32: 1432-1436. 1992.
- CHEN, W. M.; FARIA, S. M.; CHOU, J. H.; JAMES, E. K.; ELLIOTT, G. N.; SPRENT, J. I.; BONTEMPS, C.; YOUNG, J. P. W.; VANDAMME, P.. *Burkholderia sabiae* sp nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpiniiifolia*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58: 2174-2179. 2008.
- CHEN, W. M.; FARIA, S. M.; STRALIOTTO, R.; PITARD, R. M.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; CHOU, J. H.; CHOU, Y. J.; BARRIOS, E.; PRESCOTT, A. R.; ELLIOTT, G. N.; SPRENT, J. I.; YOUNG, P. W.; JAMES, E. K. Proof that *Burkholderia* strains form effective symbioses with legumes: a study of novel mimosa-nodulating strains from South America. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71: 7461-7471. 2005.

- CHEN, W.-M.; LAEVENS, S.; LEE, T.-M.; COENYE, T.; VOS, P.; MERGEAY, M.; VANDAMME, P. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of cystic fibrosis patient. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51: 1729–1735. 2001.
- CHEN, W.M.; LEE, T.M. Genetic and phenotypic diversity of rhizobial isolates from sugarcane-Sesbania cannabina-rotation fields. **Biology and Fertility of Soils**, v. 34:14-20. 2001.
- CHEN, W.X.; YAN, G.H.; LI, J.L. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 38: 392-397. 1988.
- CHOI, J.; LEE, S.Y.. Efficient and economical recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 62 (5): 546 -553. 2000.
- CHOU, Y. J.; ELLIOTT, G. N.; JAMES, E. K.; LIN, K. Y.; CHOU, J. H.; SHEU, S. Y.; SHEU, D. S.; SPRENT, J. I.; CHEN, W. M.. *Labrys neptuniae* sp nov., isolated from root nodules of the aquatic legume *Neptunia oleracea*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57: 577-581. 2007.
- CIOLA, R. **Fundamentos de Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho: HPLC**. São Paulo. Edgard Blücher. p. 179. 1998.
- CONOVER, W.J. **Practical nonparametric statistics**. New York. John Wiley and sons Inc. 1971. p.729.
- COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R.; LAPPIN-SCOTT, H.M. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**. v. 49: 711–745. 1995
- COUTINHO, H.L.C.; OLIVEIRA, V.M.; LOVATO, A.; MAIA, A.H.N.; MANFIO, G.P. Evaluation of the diversity of rhizobia in Brazilian agricultural soils cultivated with soybeans. **Applied Soil Ecology**, v.13, p.159-167, 1999.
- CUNHA, M.A.A.; SANTOS, J.C.; GÓMEZ, R.H.C.; SILVA, S.S. Goma Curdlana: Propriedades e aplicações. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 33:55–61. 2004.
- DEAN. W. **A Ferro e Fogo: A História e a Devastação da Mata Atlântica**. São Paulo: Companhia das Letras, 484 p. 1996.
- DENISON R.F. Legume sanctions and the evolution of symbiotic cooperation by rhizobia. **American Naturalist**, v. 156: 567–576. 2000.
- DIAZ, P.S.; VENDRUSCOLO, C.T.; VENDRUSCOLO, J.L.S. Reologia de xantana: Uma revisão sobre a influência de eletrólitos na viscosidade de soluções aquosas de gomas xantana. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**. v. 25: 15-28. 2004.
- DICK, R.P.; RASMUSSEN, P.E.; KERLE, E.A. Influence of long-term residue management on soil enzyme activities in relation to soil chemical properties of a wheat-fallow system. **Biology and Fertility of Soils**, v. 6: 159–164. 1988.
- DREYFUS, B.; GARCIA, J. L.; GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen-nov, sp-nov, a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 38: 89-98. 1988.
- DREYFUS, B.; GARCIA, J.L.; GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania*



- rostrata*. **International Journal of Systematic Bacteriology**. 38, 89-98. 1998.
- DUNN, M.F.; PUEPPKE, S.G.; KRISHNAN, H.B. The *nod* gene inducer genistein alters the composition and molecular mass distribution of extracellular polysaccharides produced by *Rhizobium fredii* USDA 193. **FEMS Microbiology Letters**, v. 97: 107–102. 1992.
- DUTA, F.P.; FRANCA, F.P.; LOPES, L.M.D. Optimization of culture conditions for exopolysaccharides production in *Rhizobium* sp using the response surface method. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 9:391-399. 2006.
- EL HASSAN, G. A.; HERNANDEZ, B.S.;FOCHT. D.D.Comparison of Hup trait and intrinsic antibiotic resistance for assessing rhizobial competitiveness axenically and in soil. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 51:546-551. 1986.
- EL IDRISSE, M. M.; ABDELMOUMEN, H. Carbohydrates as carbon sources in rhizobia under salt stress. **Symbiosis**, v. 46: 33-44. 2008.
- ELLIOTT, G. N.; CHOU, J. H.; CHEN, W. M.; BLOEMBERG, G. V.; BONTEMPS, C.; MARTINEZ-ROMERO, E.; VELAZQUEZ, E.; YOUNG, J. P. W.; SPRENT, J. I.; JAMES, E. K. *Burkholderia* spp. are the most competitive symbionts of *Mimosa*, particularly under N-limited conditions. **Environmental Microbiology**, v. 11: 762-778. 2009.
- EMBRAPA. **Manual de Métodos para Análise de Solos Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Centro Nacional de Pesquisa do Solo, 1999.
- ESPINDOLA, J.A.A. ; GUERRA, J.G.M. ; ALMEIDA, D.L. . Uso de Leguminosas Herbáceas para Adubação Verde. In: AQUINO, A.M.; ASSIS, R.L. (Orgs.). **Agroecologia: princípios e técnicas para uma agricultura orgânica sustentável**. Brasília. Embrapa Informação Tecnológica. 2005. p. 435-451.
- ESPÍNDOLA, J.A.A.; ALMEIDA, D.L.; GUERRA, J.G.M.; SILVA, E.M.R.; SOUZA, F.A. Influência da adubação verde na colonização micorrízica e na produção da batata doce. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33: 339-347. 1998.
- FAGERIA, N. K. Green manuring in crop production. **Journal of Plant Nutrition**, v. 30: 691–719. 2007.
- FARELEIRA P.; MATOS, N.; FERREIRA, E, MARQUES, J.F. Tolerância ao sal e às altas temperaturas de estirpes de *Sinorhizobium* provenientes de zonas secas do Alentejo. **Revista de Ciências Agrárias**, v.30. n.p. 2007.
- FARIA, S.M.; HAY, G.T.; SPRENT, J.L. Entry of rhizobia into roots of *Mimosa scabrella* Benth occur between epidermal cells. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 134: 2291-2296. 1988.
- FENG, L.; LI, X. F.; DU, G. C.; CHEN, J. Characterization and fouling properties of exopolysaccharide produced by *Klebsiella oxytoca*. **Bioresource Technology**, v. 100: 3387-3394. 2009.
- FENG, L.; ROUGHLEY, R. J.; COPELAND, L. Morphological changes of rhizobia in peat cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68: 1064-1070. 2002.
- FERNANDES JÚNIOR, P.I. **Composições poliméricas a base de carboximetilcelulose (CMC) e amido como veículos de inoculação de rizóbio em leguminosas**. Seropédica, RJ. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 43 f. 2006. (Dissertação de Mestrado).
- FERNANDES JÚNIOR, P.I.; REIS, V.M. **Algumas limitações a fixação biológica de nitrogênio em leguminosas**. Seropédica, Embrapa Agrobiologia (Documentos, 252) 2008. p. 33.

- FERNANDES JÚNIOR, P.I.; ROHR, T.G.; OLIVEIRA, P.J.; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N.G. Polymers as carriers for rhizobial inoculant formulations. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44: 1184-1190. 2009.
- FERNANDES, M.F.; FERNANDES, R.P.M.; HUNGRIA, M. Caracterização genética de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros eficientes em culturas do guandu e caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38: 911-920. 2003b.
- FERNANDES, M.F.; FERNANDES, R.P.M.; HUNGRIA, M. Seleção de rizóbios nativos para guandu, caupi e feijão-de-porco nos tabuleiros costeiros de Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38: 835-842. 2003a.
- FERREIRA, M.D.; BRASIL, M.S. Caracterização morfofisiológica de rizóbio nativo de leguminosas forrageiras do Pantanal sul mato-grossense. In: 32º Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, 2009, Fortaleza, CE. **Anais...**, 2009. CD ROM
- FIERER, N.; JACKSON, R. B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103: 626-631. 2006.
- FLOR, N.S.; OLIVEIRA, A.N.; OLIVEIRA, L.A. Atividades Amilolíticas e Proteolíticas de Rizóbios Nativos da Amazônia Central. 32º Congresso Brasileiro de Ciência do Solo. **Anais...** Fortaleza-CE. 2009. CD Rom.
- FONTOURA, R.A. **Seleção de rizóbios nativos, de solos do Rio Grande do Sul, para *Lottus glaber* e *Lottus subiflorus***. Porto Alegre. Universidade Federal do Rio de Grande do Sul. 82f. 2007. (Dissertação de Mestrado).
- FRANCO, M.C.; CASSINI, S.T.A.; OLIVEIRA, V.R.; VIEIRA, C.; TSAI, S.M. Nodulação em cultivares de feijão dos conjuntos gênicos andino e meso-americano. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37: 1145-1150. 2002.
- FUJISHIGE, N.A.; LUM M.R.; DE HOFF P.L.; WHITELEGGE J.P.; FAULL K.F.; HIRSCH A.M.. Rhizobium common nod genes are required for biofilm formation. **Molecular Microbiology**, v. 67: 504–515. 2008
- GARAU, G.; YATES, R. J.; DEIANA, P.; HOWIESON, J. G. Novel strains of nodulating *Burkholderia* have a role in nitrogen fixation with papilionoid herbaceous legumes adapted to acid, infertile soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41: 125-134. 2009.
- GARCÍA DE LOS SANTOS, A.; BROM, S.; ROMERO, D. *Rhizobium* plasmids in bacteria-legume interactions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12: 119–125. 1996.
- GARCIA-FRAILE, P.; RIVAS, R.; WILLEMS, A.; PEIX, A.; MARTENS, M.; MARTINEZ-MOLINA, E.; MATEOS, P. F.; VELAQUEZ, E. *Rhizobium cellulosityticum* sp nov, isolated from sawdust of *Populus alba*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57: 844-848. 2007.
- GARCIA-FRAILE, P.; VELAQUEZ, E.; MATEOS, P. F.; MARTINEZ-MOLINA, E.; RIVAS, R. *Cohnella phaseoli* sp nov., isolated from root nodules of *Phaseolus coccineus* in Spain, and emended description of the genus *Cohnella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 58: 1855-1859. 2008.
- GARCIA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; CASA, A.; GÓMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery and properties. **Biotechnology Advances**, v.18: 549-579. 2000.
- GOMEZ, J.G.C.; BUENO NETTO, C.L.. Produção de plasticos biodegradáveis por bactérias. **Revista Brasileira de Engenharia Química**, v. 17: 24-29. 1997.

- GONZALÉZ, J.E.; REUHS, B.; WALKER, G.C. Low molecular weight EPS II of *Rhizobium meliloti* allows nodule invasion in *Medicago sativa*, **Proceedings of National Academy of Science of United States of America**, v. 93: 8636–8641. 1996.
- GRANGE, L.; HUNGRIA, M.; GRAHAM, P.H; MARTÍNEZ-ROMERO, E. New insights into the origins and evolution of rhizobia that nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39: 867–876. 2007.
- GRANGE, L.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. **Soil Biology and Biochemistry**, v.36: 1389–1398. 2004.
- GU, C.T.; WANG, E.T.; TIAN, C.F.; HAN, T.X.; CHEN, W.F.; SUI, X.H.; CHEN, W.X. *Rhizobium miluonense* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from *Lespedeza* root nodules. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 58: 1364-1368. 2008.
- GUEDES, H. V.; SANTOS, S. T.; PERIN, L.; TEIXEIRA, K.R.S.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. Polyphasic characterization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* isolates obtained from different sugarcane varieties. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39: 718-723. 2008.
- HAAS, R., JIN, B., ZEPF, F.T. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from waste potato starch. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 72:253-256. 2008.
- HAHN, M.; MEYER, L.; STUDER, D.; REGENSBURGER, B.; HENNECKE, H. Insertion and deletion mutations within the *nif* region of *Rhizobium japonicum*. **Plant Molecular Biology**, v. 3: 159-168, 1984.
- HALAMI, P.M. Production of polyhydroxyalkanoate from starch by the native isolate *Bacillus cereus* CFR06. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24: 805-812. 2008.
- HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T., RYAN, P.D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**, v.4: n.p. 2001.
- HAN, T.X.; WANG, E.T.; WU, L.J.; CHEN, W.F.; GU, J.G.; GU, C.T.; TIAN, C.F.; CHEN, W.X. *Rhizobium multihospitium* sp. nov., isolated from multiple legume species native of Xinjiang, China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 58, 1693-1699. 2008.
- HANCOCK, J.F. **Plant Evolution and the Origin of Crop Species**. Massachusetts, CABI Publishing. 2004. 313p.
- HARA, F.A.S; OLIVEIRA, L.A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e alílicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazonica**, 34: 343–357. 2004
- HAYWOOD, G.W.; ANDERSON, A.J.; CHU, L.; DAWES, E.A. The role of NADH- and NADHP-linked acetoacetyl-CoA reductases in the poly-3-hydroxybutyrate synthesizing organism *Alcaligenes eutropha*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 52: 259–264. 1988.
- HEBBAR, K. P.; GUENIOT, B.; HEYRAUD, A.; COLINMOREL, P.; HEULIN, T.; BALANDREAU, J.; RINAUDO, M. Characterization of exopolysaccharides produced by rhizobacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 38: 248-253. 1992.
- HELM, J.; WENDLANDT, K.D.; JECHOREK, M.; STOTTMEISTER, U. Potassium deficiency results in accumulation of ultra-high molecular weight poly-beta-hydroxybutyrate in a methane-utilizing mixed culture. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105: 1054-1061. 2008

- HERRIDGE, D.F.; HOLLAND, J.F.; Low nodulation and N<sub>2</sub> fixation limits yield of pigeonpea on alkaline vertisols on northern N.S.W.: effect of iron, rhizobia and plant genotype. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 44: 137–149. 1993.
- HIRSCH, A.M., BANG, M., AUSUBEL, F.M. Ultrastructural analysis of ineffective alfalfa nodules formed by nif::Tn5 mutants of *Rhizobium meliloti*. **Journal of Bacteriology**, v.155:367–380. 1983.
- HIRSCH, A.M.; LONG, S.R.; BANG, M.; HASKINS, N.; AUSUBEL, F.M. Structural studies of alfalfa roots infected with nodulation mutants of *Rhizobium meliloti*. **Journal of Bacteriology**, v. 151:411–419. 1982.
- HIRSCH, A.M.; LUM, M.R.; DOWNIE, J.A. What makes the rhizobia–legume symbiosis so special? **Plant Physiology**, v. 127: 1484–1492. 2001.
- HOLLINGSWORTH, R.; SMITH, E.; AHMAD, M.H. Chemical composition of extracellular polysaccharides of cowpea rhizobia. **Archives of Microbiology**, 142: 18–20. 1985.
- HOU, B.C.; WANG, E.T.; CHEN, W.X. *Rhizobium tibeticum* sp. nov., a symbiont of *Trigonella archiducis* Vassilcz isolated from the Tibet plateau of China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59: 3051-3057. 2009.
- HUGHES, J. B.; HELLMANN, J. J.; RICKETTS, T. H.; BOHANNAN, B. J. M. Counting the uncountable: Statistical approaches to estimating microbial diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67: 4399-4406. 2001.
- HUNGRIA, M. A importância da fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja: uma história de sucesso na América do Sul. 3º Congresso de Soja del Mercosur. **Anais...** Rosário. 2006. p.336–338.
- HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; CHUERIE, L.M.O.; PROBANZA, A.; GUTTIERREZ-MAÑERO, F.J.; MEGÍAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, 32: 1515–1528. 2000.
- HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R.S. Relato da VI Reunião de Laboratórios para Recomendação de Estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. In: HUNGRIA, M.; BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D.S. (Eds.). **Microbiologia do solo: desafios para o século XXI**. Londrina. IAPAR/ Embrapa Soja. 1995. p. 476–489.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. **A importância do processo de fixação de nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro**. Londrina. Embrapa Soja. (Documentos n°283). 2007. p. 80. (ISSN: 1516–781X).
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. **A importância do processo de fixação de nitrogênio ara a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro**. Londrina. Embrapa Soja. Documento n° 283. 2007. p. 80.
- HUNTER, W.J.; KUYKENDALL, L.D.; MANTER, D.K. *Rhizobium selenireducens* sp. nov.: a selenite-reducing  $\alpha$ -Proteobacteria isolated from a bioreactor. **Current Microbiology**, 55: 455-460. 2008.
- HWANG, H. J.; KIM, S. W.; XU, C. P.; CHOI, J. W.; YUN, J. W. Morphological and rheological properties of the three different species of basidiomycetes *Phellinus* in submerged cultures. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96: 1296-1305. 2004.
- IBANOGLU, E. Rheological behavior of whey protein stabilized emulsions in the presence of gum arabic. **Journal of Food Engineering**, v. 52: 273-277. 2002.

- JAMES, E.K.; LOUREIRO, M.D.; POTT, A.; POTT, V.J.; MARTINS, C.M.; FRANCO, A.A.; SPRENT, J.I. Flooding-tolerant legume symbioses from the Brazilian Pantanal. **New Phytologist**, v. 150: 723-738. 2001.
- JANCZAREK, M.; JAROSZUK-SCISEL, J.; SKOROPSKA, A.; Multiple copies of *rosR* and *pssA* genes enhance exopolysaccharide production, symbiotic competitiveness and clover nodulation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. **Antonie van Leeuwenhoek**, 96:471–486. 2009.
- JARDIM FREIRE, J.R.; VERNETTI, F.J.A. pesquisa com soja, a seleção de rizóbio e produção de inoculantes no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 5: 117-126, 1999.
- JARVIS, B.D.W.; VAN BERKUM, P.; CHEN, W.X.; NOUR, S.M.; FERNANDEZ M.P.; CLEYET-MAREL, J.C.; GILLIS, M. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 47: 895-898. 1997.
- JESUS, E.C.; MARSH, T.; TIEDJE, J.M.; MOREIRA, F.M.S. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. **The ISME Journal**, v. 3: 1004-1011. 2009.
- JESUS, E.C.; MOREIRA, F.M.S. Métodos Moleculares para o Estudo de Comunidades de Bactérias do Solo. In; MOREIRA, F.M.M.; SIQUEIRA, J.O.; BRUSAARD, L (eds). **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. UFLA, Lavras. 2008. p. 768.
- JESUS, E.C.; MOREIRA, F.M.S.; FLORENTINO, L.A.; RODRIGUES, M.I.D.; OLIVEIRA, M.S. Diversidade de bactérias que nodulam siratro em três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40: 769–776. 2005.
- JORDAN, D.C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 32: 136-139. 1982.
- JOSEY, D.P.; BEYNON, J.L.; JOHNSTON, A.W.B.; BERINGER, J.E. Strain identification in *Rhizobium* using intrinsic antibiotic resistance. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 26: 343-350. 1979.
- JOURAND, P. et al. *Methylobacterium nodulans* sp nov., for a group of aerobic, facultatively methylotrophic, legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54: 2269-2273. 2004.
- JOURAND, P.; GIRAUD, E.; BENA, G.; SY, A.; WILLEMS, A.; GILLIS, M.; DREYFUS, B.; LAJUDIE, P. *Methylobacterium nodulans* sp nov., for a group of aerobic, facultatively methylotrophic, legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54: 2269-2273. 2004.
- KARANJA, N.K.; WOOD, M. Selecting *Rhizobium phaseoli* strains for use with beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in Kenya: Tolerance of high temperature and antibiotic resistance. **Plant and Soil**, v. 112: 15–22. 1988.
- KARR, D. B.; WATERS, J. K.; EMERICH, D. W. Analysis of poly-β-hydroxybutyrate in *Rhizobium japonicum* bacteroids by ion-exclusion high-pressure liquid-chromatography and uv detection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46: 1339-1344. 1983.
- KARR, D. B.; WATERS, J. K.; SUZUKI, F.; EMERICH, D. W. Enzymes of the poly-beta-hydroxybutyrate and citric-acid cycles of *Rhizobium japonicum* bacteroids. **Plant Physiology**, v. 75: 1158-1162. 1984.
- KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; SANTOS, J. C. P.; BERTON, J. F. Differences in common

bean rhizobial populations associated with soil tillage management in southern Brazil. **Soil and Tillage Research**, v. 87: 205-217. 2006.

KAVAMURA, V.N.; SANTOS, S.N.; ANDREOTE, F.D.; MELO, I.S. Seleção de bactérias rizosféricas produtoras de exopolissacarídeos em mandacaru (*Cereus jamacaru*) da caatinga. 25° Congresso Brasileiro de Microbiologia. **Anais...** Sociedade Brasileira de Microbiologia Porto de Galinhas. 2009. On line. Disponível em : [http://sec.adevento.com.br/sbm/inscricao/mostra\\_resumo.asp?traId=1&insId=587](http://sec.adevento.com.br/sbm/inscricao/mostra_resumo.asp?traId=1&insId=587).

KESSLER, B.; WITHOLT, B. Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. **Journal of Biotechnology**, v. 86: 97–104. 2001.

KEYSER, H.H.; MUNNS, D.N. Effects of calcium, manganese, and aluminum on growth of rhizobia in acid media. **Soil Science Society of America Journal**, v. 43: 500-503. 1979.

KIM, B.S. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27: 774-777. 2000.

KIRK, O.; BORCHERT, T.V.; FULGLSANG, C.G. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13: 345–351. 2002.

KOLLER, M.; HESSE, P.; BONA, R.; KUTSCHERA, C.; ATLIC, A.; BRAUNEGG. Potential of various Archaea and Eubacterial strains as industrial polyhydroxyalkanoate producers from whey. **Macromolecular Bioscience**, v. 7: 218–226. 2007.

KUMAR, A.S.; MODY, K.; JHA, B. Bacterial exopolysaccharides—a perception, **Journal of Basic Microbiology**, v.47: 103–117. 2007.

KUMARI, B.S.; RAM, M.R.; MALLAYAH, K.V. Studies on exopolisaccharide and indole acetic acid production by *Rhizobium* strains from *Indigofera*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 3: 10-14. 2008.

LACERDA, A. M. ; MOREIRA, F. M. S. ; M. J. B. ANDRADE ; SOARES, A. L. L. Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade do feijão caupi. **Revista Ceres**, v. 51: 67-82. 2004.

LAGUERRE, G.; NOUR, S. M.; MACHERET, V.; SANJUAN, J.; DROUIN, P.; AMARGER, N. Classification of rhizobia based on nodC and nifH gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. **Microbiology**, v. 147: 981-993. 2001.

LAJUDIE, P.; LAURENT-FULELE, E.; WILLEMS, A.; TORK, U.; COOPMAN, R.; COLLINS, M.D.; KERSTERS, K.; DREYFUS, B.; GILLIS, M. *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov. nitrogen-fixing bacteria that efficiency nodulate *Neptunia natans* in Senegal. **Internacional Journal of Systematic Bacteriology**, v, 48: 1270–1290. 1998.

LAJUDIE, P.; WILLEMS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D; MASTROJUAN, G.; NEYRA, M., COLLINS, M.D., DREYFUS, B. KERSTERS, K.; GILLIS, M. Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. **Internacional Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44: 715-733. 1994.

LATIF, M.A.; MEHUYS, G.R.; MACKENZIE, A.F.; ALLI, I.; FARRIS, M.A. Effect of legume on soil physical quality in maize crop. **Plant and Soil**, v. 140: 15–23. 1992

LAVIN, M.; HERENDEEN, P.S.; WOJCIECHOWSKI, M.F. Evolutionary Rates Analysis of Leguminosae Implicates a Rapid Diversification of Lineages during the Tertiary. **Systematic Botany**, v. 54: 530-549. 2005

- LEITE, J.; SEIDO, S.L.; PASSOS, S.R.; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N.G.; MARTINS, L.M.V. Biodiversity of rhizobia associated with cowpea cultivars in soil of the lower half of the São Francisco River Valley. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33: 1215-1226. 2009.
- LIE, T. A. Environmental physiology of the legume–*Rhizobium* symbiosis. In: BROUGHTON, W. J. (Ed.). **Nitrogen fixation**. Oxford: Clarendon Press, 1981. p. 104–134.
- LIMA, A., A. **Caracterização e Seleção de Rizóbios de Mucuna**. Seropédica. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 79f. 2009 (Dissertação de Mestrado).
- LIN, C.C.; CHEN, Y.C.; SONG, S.C.; LIN, L.P. Flavonoids as inducers of extracellular proteins and exopolysaccharides of *Sinorhizobium fredii*. **Biology and Fertility of Soils**, v. 30: 83–89. 1999.
- LIN, D.X.; WANG, E.T.; TANG, H.; HAN, TX, H.E., Y.R.; GUAN, S.H.; CHEN, W.X. *Shinella kummerowiae* sp. nov., symbiotic bacterium isolated from root nodules of herbal legume *Kummerowia stipulaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58: 1409-1413. 2008.
- LIPPI, D.; DE PAOLIS, M. R.; DI MATTIA, E.; GREGO, S.; PIETROSANTI, T.; CACCIARI, I. Effect of salinity on growth and starvation-survival of a tropical *Rhizobium* strain. **Biology and Fertility of Soils**, v. 30: 276-283. 2000.
- LODWIG, E. M.; LEONARD, M.; MARROQUI, S.; WHEELER, T. R.; FINDLAY, K.; DOWNIE, J. A.; POOLE, P. S. Role of polyhydroxybutyrate and glycogen as carbon storage compounds in pea and bean bacteroids. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 18: 67-74, 2005.
- LODWIG, E.M.; HOSIE, A.H.F.; BORDES, A.; FINDLAY, K.; ALLAWAY, D.; KARUNAKARAN, R.; DOWNIE, J.A.; POOLE, P.S. Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume-rhizobium symbiosis. **Nature**, v. 422: 722–72. 2003.
- LOPES, M.S.G.; ROCHA, R.C.S.; ZANOTTO, S. P.; GOMEZ, J. G. C.; SILVA, L. F. Screening of bacteria to produce polyhydroxyalkanoates from xylose. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25: 1751-1756. 2009.
- LOPÉZ, M.; HERRERA-CERVERA, J.A.; IRIBARNE, C.; TEJERA, N.A.; LLUCH, C. Growth and nitrogen fixation in *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula* under NaCl stress: nodule carbon metabolism. **Journal of Plant Physiology**, v. 165: 641–650. 2008.
- LORDA, G.; BRACCIA, J.D.; BARBEITO, V.; PAGLIERO, F.; BOERIS, S; CASTAÑO, C.; PORDOMINGO, A.; ALTOLAGUIRRE, F.; PASTOR, M.D. Peat-based inoculum of *Bradyrhizobium japonicum* and *Sinorhizobium fredii* supplemented with xanthan gum. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23: 1-5. 2007.
- LUGG, H.; SAMMONS, R.L.; MARQUIS, P.M.; HEWITT, C.J.; YONG, P.; PATERSON-BEEDLE, M.; REDWOOD, M.D.; STAMBOULIS, A.; KASHANI, M.; JENKINS, M.; MACASKIE, L.E. Polyhydroxybutyrate accumulation by a *Serratia* sp.. **Biotechnology Letters**. v. 30: 481–491. 2008
- MADISON, L.L.; HUISMAN, G.W. Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 63:21-53. 1999.
- MAGRI, J.B.M.L. **Composition for inoculating legumes and method thereof**. Patente Etedunidense (USPO). US 7022649 B2. p. 4. 2006.
- MAGURRAN, A.E. **Ecological diversity and its measurement**. Princeton. Princeton University Press. 1989. p. 179.

- MANDAL, S.M.; RAY, B.; DEY, S.; PATI, B.R. Production and composition of extracellular polysaccharide synthesized by a *Rhizobium* isolate of *Vigna mungo* (L.) Hepper, **Biotechnology Letters**, v. 29: 1271–1275. 2007.
- MANDAL, U.K.; SINGH, G.; VICTOR, U.S.; SHARMA, K.L. Green manuring: its effect on soil properties and crop growth under rice-wheat cropping system. **European Journal of Agronomy**, v. 19: 225-237. 2003.
- MANO, E.B.; MENDES, L.C. **Introdução a polímeros**. 2 ed. Edgard Blücher. São Paulo. 2004. p.191.
- MARCHESSAULT, R.H.. Tender morsels for bacteria: recent developments in microbial polyesters. **Trends in Polymer Science**, v. 4: 163-168. 1996.
- MARTINEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, L.; MERCANTE, F.M.; FRANCO, A.A.; GRAHAM,.; PARDO, M.A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 41: 417-426. 1991.
- MARTINEZ-TOLEDO, M.V.; GONZALEZ-LOPEZ, J.; RODELAS, B.; POZO, C.; SALMERON, V. Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate by *Azotobacter chroococcum* H23 in chemically defined alpechin medium. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 78: 413-418. 1995.
- MARTINS, L.M.V. **Características ecológicas e fisiológicas de rizóbio de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) isolados a partir de solos da região nordeste do Brasil**. Seropédica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 214 f. 1996. (Dissertação de Mestrado).
- MARTINS, L.M.V.; RANGEL, F.W.; XAVIER, G.R.; RIBEIRO, J.R.A.; MORGADO, L.B.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 38: 333-339. 2003.
- MARTINS, L.M.V.; XAVIER, G.R.; NEVES, M.C.P., RUMJANEK, N.G. **Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de “rizóbio”**. Embrapa Agrobiologia, Seropédica. Comunicado Técnico. n.19, p.1-14, 1997.
- MATSUDA, A.; MOREIRA, F.M.M.; SIQUEIRA, J.O. Tolerância de rizóbios de diferentes procedências ao zinco, cobre e cádmio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37: 343-355. 2002.
- MATTOS, K.A.; JONES, C.; HEISE, N.; PREVIATO, J.O.; MENDONÇA-PREVIATO, L. Structure of na acidic exopolisaccharide produced by the diazotrophic endophytic bacterium *Burkholderia brasiliense*. **European Journal of Biochemistry**, v. 268: 3174–3179. 2001.
- MAYER, L.; VENDRUSCOLO, C.T.; SILVA, W.P.; MOURA, A.B. Produção, propriedades reológicas e composição química da xantana produzida por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**. v. 2: 87-95. 2008.
- McINNES, A.; THIES, J.E.; ABBOTT, L.K.; HOWIESON, J.G.; Structure and diversity among rhizobial strains populations and communities—a review. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 36: 1295–1308. 2004.
- MEDEIROS, E.V.; MARTINS, C.M.; LIMA, J.A.M.; FERNANDES, Y.T.D.; OLIVEIRA, V.R.; BORGES, W.L. Diversidade morfológica de rizóbios isolados de caupi cultivado em solos do Estado do Rio Grande do Norte. **Acta Scientiarum-Agronomy**, v. 31: 529-535. 2009.



- MEDEIROS, E.V.; SILVA, K.J.P.; MARTINS, C.M.; BORGES, W.L. Tolerância de bactérias fixadoras de nitrogênio provenientes de municípios do Rio Grande do Norte à temperatura e salinidade. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.7:160–168. 2007.
- MERCAN, N.; BEYATLI, Y. Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) by *Rhizobium meliloti*, *R. viciae* and *Bradyrhizobium japonicum* with different carbon and nitrogen sources, and inexpensive substrates. **Zuckerindustrie**, v. 130: 410-415. 2005.
- MERCANTE, F. M. ; FRANCO, A. A. . Expressão dos genes nod de *Rhizobium tropici*, *R. etli* e *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* e estabelecimento da nodulação do feijoeiro na presença de escudados de sementes de *Mimosa flocculosa* e *Laeucaena leucocephala*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24: 301–310. 2000.
- MIETHLING, R.; WIELAND, G.; BACKHAUS, H. TEBBE, C.C. Variation of microbial rhizosphere communities in response to crop species, soil origin and inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33. **Microbial Ecology**. v. 40:45–56. 2000.
- MILES, A.A.; MISRA, S.S. The estimation of the bacterial power of the blood. **Journal of Hygiene**, v.38: 732–749. 1938.
- MIYASAKA, S.; FREIRE, E.S.; MASCARENHAS, H.A.A.; NERY, C.; CAMPANA, M.P.; SORDI, G. DE Efeito da adubação verde com gramínea e quatro leguminosas sobre a produção do feijoeiro "da seca", em terra-roxa misturada. **Bragantia**, v. 25: 277-289. 1966.
- MOREIRA, F.M.S. Bactérias fixadoras de nitrogênio. In; MOREIRA, F.M.M.; SIQUEIRA, J.O.; BRUSAARD, L (eds). **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. UFLA, Lavras. 2008. p. 768.
- MOREIRA, F.M.S.; CRUZ, L.; FARIA, S.M.; MARSH, T.; MARTÍNEZ-ROMERO E.; PEDROSA, F.O.; PITARD, R.M.; YOUNG, J.P.W. *Azorhizobium doebereinae* sp. nov. Microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29: 197-206. 2006.
- MOREIRA, F.M.S.; SILVA, M.F.; FARIA, S.M. de. Occurrence of nodulation in legume species in the Amazon region of Brazil. **New Phytologist**, v.121, p.563-570, 1992.
- MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. (2.ed). Lavras: UFLA, 2006. 729p.
- MORGANTE, C.; CASTRO, S.; FABRA, A. Role of rhizobial EPS in the evasion of peanut defense response during the crack-entry infection process. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39: 1222–1225. 2007.
- MORGANTE, C.; CASTRO, S.; FABRA, A. Role of rhizobial exopolysaccharides in crack entry/intercellular infection of peanut. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37:1436–1444. 2005.
- MORÓN, B.; SORIA-DÍAZ, M.E.; AUKT, J.; VEROLOS. G.; NOREEN, S.; RODRIGUEZ-NAVARRO, D.N.; GIL-SERRANO, A.; THOMAS-OATES, J.; MEGÍAS, M.; SOUSA, C. Low pH changes the profile of nodulation factors produced by *Rhizobium tropici* CIAT 899. **Chemistry and Biology**. 12: 1029-1040. 2005.
- MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the  $\beta$ -subclass of Proteobacteria. **Nature**, v. 411: 948–950. 2001.
- MURESU, R.; POLONE, E.; SULAS, L.; BALDAN, B.; TONDELLO, A.; DELOGU, G.; CAPPUCINELLI, P.; ALBERGHINI, S.; BENHIZIA, Y.; BENHIZIA, H.; BENGUEDOUAR, A.; MORI, B.; CALAMASSI, R.; DAZZO, F.B.; SQUARTINI, A. Coexistence of predominantly nonculturable rhizobia with diverse, endophytic bacterial taxa

- within nodules of wild legumes. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 63: 383–400. 2008.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**. 403: 853-858. 2000.
- NANGJU, D. Soybean Response to Indigenous *Rhizobia* as Influenced by Cultivar Origin. **Agronomy Journal**. v.72: 403-406. 1980.
- NGOM, A.; NAKAGAWA, Y.; SAWADA, H.; TSUKAHARA, J.; WAKABAYASHI, S.; UCHIUMI, T.; NUNTAGIJ, A.; KOTEPONG, S.; SUZUKI, A.; HIGASHI, S.; ABE, M. A novel symbiotic nitrogen-fixing member of the *Ochrobactrum* clade isolated from root nodules of *Acacia mangium*. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 50: 17-28. 2004.
- NICOLÁS, M. F.; FARIAS, C. A. A. ; HUNGRIA, M. . Genetics of nodulation and nitrogen fixation in Brazilian soybean cultivars. **Biology and Fertility of Soils**, v. 36: 109-117. 2002.
- NOBEL FOUNDATION. Disponível em: [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1918/](http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1918/). Acessado em 06/10/2009
- NÓBREGA, R. S. A.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; LIMA, A. S. Caracterização fenotípica e diversidade de bactérias diazotróficas associativas isoladas de solos em reabilitação após a mineração de bauxita. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28: 269-279. 2004a.
- NÓBREGA, R.S.A.; LACERDA, A.M.; MOTTA, J.S.; MOREIRA, F. M. S. Tolerância de bactérias diazotróficas simbióticas à salinidade *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28: 899–905. 2004b.
- NONATO, R. V.; MANTELATTO, P. E.; ROSSELL, C. E. V. Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57: 1-5, 2001.
- NORRIS, D.O.; T'MANNETJE, L. The symbiotic specialization of African *Trifolium* spp. in relation to their taxonomy and their agronomic use. **East Africa Agriculture and Forest Journal**, v. 29: 214-235. 1964.
- NUNES, G.F.O. ; LEITE, J.;CUNHA, J.B.C.; SEIDO, S.L.; SAMPAIO, A.A.; NASCIMENTO, J.N.; CARVALHO, D.T.Q; YANOMELO, A.M.; MARTINS, L.M.V. Tolerância de rizóbios isolados de duas cultivares de guandu à salinidade e a elevadas temperaturas *in vitro*. 32ºCongresso Brasileiro de Ciência do Solo, 2009, Fortaleza, CE. **Anais...**, 2009. CD ROM.
- ODUM, E.P. **Fundamentos de Ecologia**. 4.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1988. 927p.
- OKEREKE G.U.; ANAEGBU, D. Nodulation and biological nitrogen fixation of 80 soybean cultivars in symbiosis with indigenous rhizobia. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v.8: 171–174. 1992.
- OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS, A. F. Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27: 61-66. 2007b.
- OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS, A. F. Rhizobia amylase production using various starchy substances as carbon substrates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38: 208-216. 2007a.
- OLIVEIRA, A.N.; OLIVEIRA, L.A.; ANDRADE, J.S.; CHAGAS JÚNIOR, A.F. Atividade

enzimática de isolados de rizóbio nativos da Amazônia central crescendo em diferentes níveis de acidez. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26: 204–210. 2007.

OLIVEIRA, J. P.; FIGUEIREDO, M.V.B.; BARRETO, M.C.B.; MORAIS, R.L.; SILVA, M.V.; BURITY, H.A. Avaliação do comportamento reológico de exopolissacarídeos produzidos por rizóbio. 32º Congresso Brasileiro de Ciência do Solo. **Anais...** Fortaleza-CE. 2009b. CD Rom.

OLIVEIRA, J. P.; SILVA, M.V.; FIGUEIREDO, M.V.B.; SILVA, T.D.; BARRETO, M.C.B.; BURITY, H. A. Expressão diferencial de proteínas em isolados e estirpes de rizóbios relacionadas à produção de exopolissacarídeos. 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia. **Anais...** Sociedade Brasileira de Microbiologia Porto de Galinhas. 2009a. On line. Disponível em: [http://sec.adevento.com.br/sbm/inscricao/mostra\\_resumo.asp?traId=1&insId=1224](http://sec.adevento.com.br/sbm/inscricao/mostra_resumo.asp?traId=1&insId=1224). Acessado em/ 14/11/2009

OLIVEIRA, L.A.; MAGALHÃES, H.P. de. Quantitative evaluation of acidity tolerance of root nodule bacteria. **Revista de Microbiologia**. v. 30: 203–208. 1998.

OLIVEIRA, P.J. ; FERNANDES JÚNIOR, P.I.; XAVIER, G.R. ; RUMJANEK, N.G. . Estudo do comportamento reológico da mistura carboximetilcelulose/amido e seu uso como veículo de inoculação rizobiano. 9º Congresso Brasileiro de Polímeros. **Anais...** CD Rom. Campina Grande, 2007c.

ONIM, J.F.M.; MATHUVA, M.; OTIENO, K.; FITZHUGH, H.A. Soil fertility changes and response of maize and beans to Green manures of leucaena, sesbania and pigeonpea. **Agroforestry Systems**. v. 12: 197–215. 1990.

PADMANABHAN, S.; HIRTZ, R.D.; BROUGHTON, W.J. Rhizobia in tropical legumes: cultural characteristics of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* sp. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 22: 23-28. 1990.

PARIKH, A.; MADAMWAR, D. Partial characterization of extracellular polysaccharides from cyanobacteria. **Bioresource Technology**, v. 97: 1822-1827. 2006.

PARK, J.S.; LEE, Y.H. Metabolic characteristics of isocitrate dehydrogenase leaky mutant *Alcaligenes eutrophus* and its utilization for poly-beta-hydroxybutyrate production. **Journal of Fermentation Bioengineering**, v. 81: 197–205. 1996.

PASSOS, S.R.; DOMINGUES, C.S.; LEITE, J.; MARTINS, L.M.V.; RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G. Diversidade genotípica de rizóbios isolados de feijão-caupi no submédio do Vale do São Francisco. MS 56. XI Encontro Brasileiro de Microbiologia Ambiental. **Anais...** Fortaleza, 2008a.

PASSOS, S.R.; REIS JÚNIOR, F.B.; RUMJANEK, N.G.; MENDES, I.C.; BAPTISTA, M.J.; XAVIER, G.R. Atividade enzimática e perfil da comunidade bacteriana em solo submetido à solarização e biofumigação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43: 879-885. 2008b.

PAUDYAL, S.P.; ARYAL, R.R.; CHAUHAN, S.V.S.; MAHESHWARI, D.K. Effect of heavy metals on growth of rhizobium strains and symbiotic efficiency of two species of tropical legumes. **Scientific World**, v.5: 27-32. 2007.

PAUL, E.A.; CLARK. F.E. **Soil Microbiology and Biochemistry**. Academic Press, New York. 1989. p. 276.

PAULL, J. A century of synthetic fertilizers: 1909-2009. **ELEMENTALS**-Journal of Bio-Dynamics, v. 94: 16-21. 2009.

PAULO, F.S.; LIMA, A.A.; FERNANDES JÚNIOR, P.I.; NOSOLINE, S.M.; RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G.R. Nodulação e produção de massa seca de feijão-de-porco (*Canavalia*

- ensiformis*) inoculadas com rizóbio nativo de solo de Sistema de Produção Agroecológica. 32º Congresso Brasileiro de Ciência do Solo. **Anais...** Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Fortaleza. 2009. CD Rom.
- PENG, G.; YUAN, Q.; LI, H.; ZHANG, W.; TAN, Z. *Rhizobium oryzae* sp. nov., isolated from the wild rice *Oryza alba*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 58: 2158-2163. 2008.
- PEOPLES, M.B.; HERRIDGE, D.F.; LADHA, J.K. Biological nitrogen fixation: An efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production? **Plant and Soil**, 174: 3–28. 1995.
- PERRET, X., STAHELIN, C.; BROUGHTON, W.J. Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 64, p. 180–201. 2000.
- PHILLIPS, P.W.B. An economic assessment of the global inoculant industry. **Crop Management**. 2004. Disponível em: <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/cm/review/2004/industry/> Acessado em 20/10/2006.
- PINTO-COELHO, R.M.. **Fundamentos em Ecologia**, PortoAlegre. Artmed. 2000. 252p.
- POSTGATE, J.R. **Nitrogen Fixation** 3 ed. Cambridge, Cambridge University Press, 1998. 122 p
- POTVIN, C.; TOUSIGNANT, D. Evolutionary consequences of simulated global change: Genetic adaptation or adaptive phenotypic plasticity. **Oecologia**, v. 108: 683-693. 1996
- POVOLO, S.; CASELLA, S. Poly-3-hydroxybutyrate has an important role for the survival of *Rhizobium tropici* under starvation. **Annals of Microbiology**, v. 54: 307-316. 2004
- PROVAZI, M.; CAMARGO, L.H.G.; SANTOS, P.M.; GODOY, R. Descrição botânica de linhagens puras selecionadas de guandu. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36: 328–334. 2007.
- PSZCZOLA, D. E. Curdian differs from others gellig agents. **Food Technology**, v.51: 30. 1997.
- PUEPPKE, S. G.; BROUGHTON, W. J. *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 12: 293-318, 1999.
- RAMADAS, N.V.; SINGH S.K.; SOCCOL C.R.; PANDEY. A. Polyhydroxybutyrate Production using Agro-industrial Residue as Substrate by *Bacillus sphaericus* NCIM 5149. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52:17-23. 2009.
- RAMSUBHAG, A.; DONAWA, A. L.; UMAHARAN, et al. Variations in nodulation and nitrogen-fixing characteristics of slow-growing rhizobia isolates on pigeon-pea *Cajanus cajan* (L.) Millsp. **Tropical Agriculture**, v. 79: 12–20. 2002a.
- RAMSUBHAG, A.; UMAHARAN, P.; DONAWA, A. L. Partial 16S rRNA gene sequence diversity and numerical taxonomy of slow growing pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp) nodulating rhizobia. **FEMS Microbiology Letters**, v. 216: 139-144. 2002b.
- RÄSÄNEN, L. A.; SAIJETS, S.; JOKINEN, K.; LINDSTRÖM, K. Evaluation of the roles of two compatible solutes, glycine betaine and trehalose, for the *Acacia senegal*–*Sinorhizobium* symbiosis exposed to drought stress. **Plant and Soil**, v. 260: 237–251. 2004.
- RATCLIFF, W. C.; KADAM, S. V.; DENISON, R. F. Poly-3-hydroxybutyrate (PHB) supports survival and reproduction in starving rhizobia. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 65: 391-399. 2008.

- REDDY, C.S.W.; GHAI, R.; RASHMI, KALIA, V.C. Polyhydroxyalkanoates: an overview. **Bioresource Technology**, v. 87: 137-146. 2003.
- REIJNOERS, L. Origin of endosymbiotic nitrogen-fixation by *Rhizobium*. **Journal of Theoretical Biology**, v. 61: 245-248. 1976.
- RENIER, A.; JOURAND, P.; RAPIOR, S.; POINSOT, V.; SY, A.; DREYFUS, B.; MOULIN, L. Symbiotic properties of *Methylobacterium nodulans* ORS 2060<sup>T</sup>: A classic process for an atypical symbiont. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40: 1404–1412. 2008.
- RESENDE, M.; LANI, J.L.; REZENDE, S.B. Pedossistemas da Mata Atlântica: considerações pertinentes sobre a sustentabilidade. **Revista Árvore**, v. 26: 261-269
- RIBEIRO, J.R.A.; OLIVEIRA, R.R.; RUMJANEK, N. G. Estudo populacional de rizóbio na Mata Atlântica. In: XXIV Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas - FERTBIO, 2000, Santa Maria, RS. **Anais...** 2000 CD ROM.
- RINAUDI, L.; FUJISHIGE, N. A.; HIRSCH, A.N.; BANCHIO, E.; ZERREGUIETA, A.; GIORDANO, W. Effects of nutritional conditions on *S. meliloti* biofilm formation. **Research in Microbiology**, v. 157: 867–875. 2006.
- RINAUDO, M. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. **Polymer International**, v. 57:397-430. 2008
- RIVAS, R.; VELAZQUEZ, E.; WILLEMS, A.; VIZCAINO, N.; SUBBA-RAO, N. S.; MATEOS, P. F.; GILLIS, M.; DAZZO, F. B.; MARTINEZ-MOLINA, E. A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) Druce. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68: 5217-5222. 2002.
- RIVAS, R.; VELAZQUEZ, E.; WILLEMS, A.; VIZCAINO, N.; SUBBA-RAO, N. S.; MATEOS, P. F.; GILLIS, M.; DAZZO, F. B.; MARTINEZ-MOLINA, E. A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) Druce. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68: 5217-5222. 2002.
- RIVAS, R.; WILLEMS, A.; PALOMO, J.L.; GARCIA-BENAVIDES, P.; MATEOS, P.F.; MARTINEZ-MOLINA, E.; GILLIS, M.; VELAZQUEZ, E. *Bradyrhizobium betae* sp nov., isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumour-like deformations. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54: 1271-1275. 2004.
- ROBLEDO, M.; JIMENEZ-ZURDO, J.I.; VELAZQUEZ, E.; TRUJILLO, M.E.; ZURDO-PINEIRO, J.L.; RAMIREZ-BAHENA, M.H.; RAMOS, B.; DIAZ-MINGUEZ, J.M.; DAZZO, F.; MARTINEZ-MOLINA, E.; MATEOS, P.F. *Rhizobium* cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105: 7064-7069. 2008.
- RODRIGUEZ-NAVARRO, D. N.; BUENDIA, A. M.; CAMACHO, M.; LUCAS, M. M.; SANTAMARIA, C. Characterization of *Rhizobium* spp. bean isolates from South-West Spain. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32: 1601-1613. 2000.
- ROHR, T.G.; FERNANDES JÚNIOR, P.I.; LOPES, M.C. ; RIBEIRO, R.L.D. ; RUMJANEK, N. G. ; OLIVEIRA, P.J. . Study Viscoelastic Behaviour of The CMC/Starch Mixture Containg MgO and ZnO amd Their Use as For Inoculation For Agriculture. In: WORD POLYMER CONGRESS / 41st INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MACROMOLECULES, (MACRO 2006). **Proccedings...** Rio de Janeiro. 2006.
- ROSENBLUETH, M.; MARTINEZ-ROMERO, E. *Rhizobium etli* maize populations and

their competitiveness for root colonization. **Archives of Microbiology**, v. 181: 337–344. 2004.

ROSS, D.M. **Inoculant sales rise due to increased acreage in specialty crops like pulses**. Disponível em [http://www.agrimarketing.com/show\\_story.php?id=15008](http://www.agrimarketing.com/show_story.php?id=15008). 2002. Acessado em 29/09/2009.

ROTTAVA, I.; BATESINI, G.; SILVA, M.F.; LERIN, L.; OLIVEIRA, D.; PADILHA, F.F.; TONIAZZO, G.; MOSSI, A.; CANSIAN, R.L.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H. Xanthan gum production and rheological behavior using different strains of *Xanthomonas* sp. **Carbohydrate Polymers**, v. 77: 65-71. 2009.

ROUMIANTSEVA, M.L.; ANDRONOV, E.E.; SHARYPOVA, L.A.; DAMMANN-KALINOWSKI, T.; KELLER, M.; YOUNG, J.P.W.; SIMAROV, B.V. Diversity of *Sinorhizobium meliloti* from the central Asian alfalfa gene center. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68: 4694-4697. 2002.

RUMJANEK., N.G. ; FONSECA., M.C.C.; XAVIER, G.R. Quorum sensing em sistemas agrícolas: comportamento multicelular em procarioto via comunicação intercelular. **Biociência**, v. 34: 34–49. 2005.

SAFRONOVA, V.I.; PILUZZA, G.; BELIMOV, A.A.; BULLITTA, S.. Phenotypic and genotypic analysis of rhizobia isolated from pasture legumes native of Sardinia and Asinara Island. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 85, p.115–127, 2004.

SALATI, E.; SANTOS, A.A.; KLABIN, I. Relevant environmental issues. **Estudos Avançados**. v.20: 107-127. 2006.

SALMI, G.P.; SALMI, A.P.; ABOUD, A.C.S. Dinâmica de decomposição e liberação de nutrientes de genótipos de guandu sob cultivo em aléias. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41: 673–678.

SANTOS, C.E.R.S.. **Diversidade, faixa hospedeira e eficiência de fixação de N<sub>2</sub> de rizóbio nativo da região nordeste do Brasil em amendoim (*Arachis hypogaea*)**. Seropédica. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 178 f. 2001. (Tese de Doutorado).

SHAMSELDIN, A.; WERNER, D. High salt and high ph tolerance of new isolated *Rhizobium etli* strains from egyptian soils. **Current Microbiology**, v. 50: 11-16. 2005.

SILVA, G.; LIMA, A.; NOSOLINE, S.; RUMJANEK, N.; XAVIER, G. Seleção de inoculante rizobiano para feijão-de-porco. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2: 1232-1235. 2007a.

SILVA, L. F.; GOMEZ, J. G. C.; ROCHA, R. C. S. ; TACIRO, M. K. ; PRADELLA, J. G. C. Produção biotecnológica de poli-hidroxialcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. **Química Nova**, v. 30: 1732-1743. 2007b.

SILVA, L.F.; TACIRO, M.K.; MICHELIN RAMOS, M.E; CARTER, J.M.; PRADELLA, J.G.C.; GOMEZ, J.G.C. Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production by bacteria from xylose, glucose and sugarcane bagasse hydrolysate. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31: 245-254. 2004.

SILVA, L.F.; TACIRO, M.K.; PRADELLA, J.G.C.; GOMEZ, J.G.C. Fábrica viva de plástico biodegradável. **Ciência Hoje**, v. 29: 69-71. 2001.

SILVA, V.N.; SILVA, L.E.S.F.; FIGUEIREDO, M.V.B. CARVALHO, F.G.; SILVA, M.L.R.B.; SILVA, A.J.N. Caracterização e seleção de populações nativas de rizóbios de solo da região semi-árida de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 37: 16-21. 2007c.

- SILVEIRA, P.M.; BRAZ, A.J.B.P.; KLIEMANN, H.J.; ZIMMERMANN, F.J.P. Acumulação de nutrientes no limbo foliar de guandu e estilosantes. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 35: 133–138. 2005.
- SINCLAIR, M. J.; EAGLESHAM, A. R. J. Intrinsic antibiotic-resistance in relation to colony morphology in three populations of west-african cowpea rhizobia. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 16: 247-251. 1984.
- SKOROPSKA, A.; JANCZAREK, M.; MARCZAK, M.; MAZUR, A.; KRÓL, J. Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. **Microbial Cell Factories**. v. 5. n.p. 2006.
- SLEPECKY, R.A.; LAW, J.H. A rapid spectrophotometric assay os alpha unsaturated acids and beta-hydroxy acids. **Analytical Chemistry**. v. 32:1697-1698. 1960
- SMITH R. S. Legume inoculant formulation and application. **Canadian Journal of Microbiology**, 38: 485–492, 1992.
- SOUCHIE, E. L.; ABOUD, A. C. S. Solubilização de fosfato por microrganismos rizosféricos de genótipos de guandu cultivados em diferentes classes de solo. **Semina. Ciências Agrárias**, v. 28: 11-18. 2007.
- SOUZA, A. M.; SUTHERLAND, I. W. Exopolysaccharide and storage polymer production in *Enterobacter aerogenes* type 8 strains. **Journal of Applied Bacteriology**. v.76: 463–468. 1994.
- SOUZA, F.A.; TRUFEM, S.F.B.; ALMEIDA, D.L.; SILVA, E.M.R.; GUERRA, J.G.M. Efeito de pré cultivos sobre o potencial de inoculo de fungos micorrízicos arbusculares e produção da mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34: 1913–1923. 1999.
- SOUZA, L. A. ; BEZERRA NETO, E. ; SANTOS, C. E. R. S. ; STAMFORD, N. P.. Desenvolvimento e nodulação natural de leguminosas arbóreas em solos de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42: 207-217. 2007.
- SOUZA, M.F.M.; VALE,H.M.M.; STRALIOTTO, R. Competitividade de estirpes pertencentes a diferentes espécies de rizóbio para ocupação nodular em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Agronomia**, v. 37:59-63. 2003.
- SPAINK, H,P, Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 257–288. 2000.
- SPRENT, J. I. 60Ma of legume nodulation. What's new? What's changing? **Journal of Experimental Botany**. v. 59: 1081-1084. 2008.
- SPRENT, JI. An interdisciplinary look at legumes and their bacterial symbionts: some thoughts from Big Sky. **New Phytologist**, v. 184: 15-17. 2009.
- SPRENT, J.I. Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. **New Phytologist**, v. 174: 11-25. 2007.
- SPRIGGS, A. C.; DAKORA, F. D. Assessing the suitability of antibiotic resistance markers and the indirect ELISA technique for studying the competitive ability of selected *Cyclopi* Vent. rhizobia under glasshouse and field conditions in South Africa. **BMC Microbiology**, v. 9. n.p. 2009.
- SRIDHAR, K. R.; ARUN, A. B.; NARULA, N.; DEUBEL, A.; MERBACH, W. Patterns of sole-carbon-source utilization by fast-growing coastal sand dune rhizobia of the southwest coast of India. **Engineering in Life Sciences**, v. 5: 425-430. 2005.
- STOCCO, P.; SANTOS, J.C.P.; VARGAS, V.P.; HUNGRIA, M. Avaliação da

biodiversidade de rizóbios simbiotes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em Santa Catarina. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32: 1107-1120. 2008.

STREETER, J. G. Effect of trehalose on survival of *Bradyrhizobium japonicum* during desiccation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95: 484-491. 2003.

SULLIVAN, J.T.; RONSON, C.W. Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into phe-tRNA gene. **Proceedings of National Academy of Science of United States of America**, v. 95: 5145–5149. 1998.

SUTHERLAND, I. Microbial polysaccharides from gram negative bacteria, **International Dairy Journal**, v. 11: 663–674. 2001.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharide es, **Trends in Biotechnology**, v.16: 41–46. 1998.

SUZUKI, M.T.; GIOVANNONI, S.J. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 2: 625–630. 1996.

SY, A.; GIRAUD, E.; JOURAND, P.; GARCIA, N.; WILLEMS, A.; LAJUDIE, P.; PRIN, Y.; NEYRA, M.; GILLIS, M.; BOIVIN-MASSON, C.; DREYFUS, B. Methylothetic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. **Journal of Bacteriology**, v. 183: 214-220. 2001.

TAVARES, L. Z. ; SILVA, E. S. ; PRADELLA, J. G. C. . Production of poly(3-hydroxybutyrate) in airlift bioreactor by *Ralstonia eutropha*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 18: 21-31, 2004.

TAVERNIER, P.; PORTAIS, J. C.; SAUCEDO, J. E. N.; COURTOIS, J.; COURTOIS, B.; BARBOTIN, J. N. Exopolysaccharide and poly-beta-hydroxybutyrate coproduction in two *Rhizobium meliloti* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63: 21-26, 1997.

TEIXEIRA, F.C.P.; BORGES, W. L.; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N.G. Characterization of indigenous rhizobia from Caatinga. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41: 201-208. 2010.

TEODORO, C. E. D.; MARTINS, M. L. L. Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31: p. 298-302. 2000.

TESTA, V.M.; TEIXEIRA, L.A.J.; MIELNICZUK, J. Características químicas de um podzólico vermelho-escuro afetadas por sistemas de culturas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 16: 107–114. 1992.

THIPPAYARUGS, S.; TOOMSAN, B.; VITYAKON, P.; LIMPINUNTANA, V.; PATANOTHAI, A.; CADISH, G. Interactions in decomposition an N mineralization between tropical legume residues components. **Agroforestry Systems**. v. 72: 137–148. 2008.

TOLEDO, I.; LLORET, L.; MARTINEZ-ROMERO, E. *Sinorhizobium americanus* sp nov., a new *Sinorhizobium* species nodulating native *Acacia* spp. in Mexico. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 26: 54-64. 2003.

TRAINER, M. A.; CHARLES, T. C. The role of PHB metabolism in the symbiosis of rhizobia with legumes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71: 377-386. 2006.

TRUJILLO, M. E.; WILLEMS, A.; ABRIL, A.; PLANCHUELO, A. M.; RIVAS, R.; LUDENA, D.; MATEOS, P. F.; MARTINEZ-MOLINA, E.; VELAZQUEZ, E. Nodulation of *Lupinus albus* by Strains of *Ochrobactrum lupini* sp nov. **Applied and Environmental**



**Microbiology**, v. 71: 1318-1327. 2005.

TRUJILLO, M. E.; WILLEMS, A.; ABRIL, A.; PLANCHUELO, A. M.; RIVAS, R.; LUDENA, D.; MATEOS, P. F.; MARTINEZ-MOLINA, E.; VELAZQUEZ, E. Nodulation of *Lupinus albus* by Strains of *Ochrobactrum lupini* sp nov. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71: 1318-1327. 2005.

TSUKADA, S.; AONO, T.; AKIBA, N.; LEE, K. B.; LIU, C. T.; TOYAZAKI, H.; OYAIZU, H. Comparative Genome-Wide Transcriptional Profiling of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 Grown under Free-Living and Symbiotic Conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75: 5037-5046. 2009.

TULLY, R.E. New culture media to suppress exopolysaccharides production by *Rhizobium japonicum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 21: 252-254. 1985.

VALARINI, M.J.; GODOY, R. Contribuição da fixação simbiótica de nitrogênio na produção do guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp). **Scientia Agricola**, v. 51: 500-504. 1994.

VALVERDE, A.; IGUAL, J. M.; PEIX, A.; CERVANTES, E.; VELAZQUEZ, E. *Rhizobium lusitanum* sp nov a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56: 2631-2637, 2006.

VALVERDE, A.; VELAZQUEZ, E.; FERNANDEZ-SANTOS, F.; VIZCAINO, N.; RIVAS, R.; MATEOS, P. F.; MARTINEZ-MOLINA, E.; IGUAL, J. M.; WILLEMS, A. *Phyllobacterium trifolii* sp nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55: 1985-1989. 2005.

VALVERDE, A.; VELAZQUEZ, E.; FERNANDEZ-SANTOS, F.; VIZCAINO, N.; RIVAS, R.; MATEOS, P. F.; MARTINEZ-MOLINA, E.; IGUAL, J. M.; WILLEMS, A. *Phyllobacterium trifolii* sp nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55: 1985-1989. 2005.

VALVERDE, A.; VELAZQUEZ, E.; GUTIERREZ, C.; CERVANTES, E.; VENTOSA, A.; IGUAL, J. M. *Herbaspirillum lusitanum* sp nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53: 1979-1983. 2003.

VAN BERKUM, P.; EARDLY, B. D. The aquatic budding bacterium *Blastobacter denitrificans* is a nitrogen-fixing symbiont of *Aechinomene indica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68: 1132-1136. 2002.

VAN BERKUM, P.; LEIBOLD, J.M.; EARDLY, B.D. Proposal for combining *Bradyrhizobium* spp. (*Aeschynomene indica*) with *Blastobacter denitrificans* and to transfer *Blastobacter denitrificans* to (Hirsh and Muller, 1985) to the genus *Bradyrhizobium* as *Bradyrhizobium denitrificans* (comb nov.). **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29: 207-215. 2006.

VAN DER MAESEN, L.J.G. 1986. *Cajanus* DC. and *Atylosia* W.&A. (Leguminosae). Agricultural University, Wageningen, the Netherlands, 225pp.

VANDAMME, P.; COENYE, T. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54: 2285-2289. 2004.

VANDAMME, P.; GORIS, J.; CHEN, W. M.; VOS, P.; WILLEMS, A. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes.

**Systematic and Applied Microbiology**, v. 25: 507-512. 2002.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, v.60, p.407-438, 1996.

VARGAS, A.A.T.; GRAHAM, P.H. Cultivar and pH effects on competition for nodule sites between isolates of *Rhizobium* in beans. **Plant and Soil**, v.117, p.195-200, 1989.

VELASCO, S. E.; AREIZAGA, J.; IRASTORZA, A.; DUENAS, M. T.; SANTAMARIA, A.; MUNOZ, M. E. Chemical and rheological properties of the, beta-glucan produced by *Pediococcus parvulus* 2.6. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57: 1827-1834. 2009.

VERMANI, M.V.; KELKAR, S.M.; KAMAT, Y, Novel exopolysaccharide production by *Azotobacter vinelandii* MTCC 2459, a plant rhizosphere isolate. **Letters in Applied Microbiology**, v.24: 379–383. 1997.

VESSEY, J. K.; PAWLOWSKI, K.; BERGMAN, B. Root-based N<sub>2</sub>-fixing symbioses: Legumes, actinorhizal plants, *Parasponia* sp. and cycads. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 266, p. 205–230, 2004.

VINCENT, J.M. **A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria**. Oxford, Blackwell Scientific Publications. 164p. (IBP Handbook, 15).

VINCENZINI, M.; SILI, C.; DEPHILIPPIS, R.; ENA, A.; MATERASSI, R. Occurrence of poly-beta-hydroxybutyrate in *Spirulina* species. **Journal of Bacteriology**, v. 172: 2791-2792. 1990.

VINUESA, P.; LEON-BARRIOS, M.; SILVA, C.; WILLEMS, A.; JARABO-LORENZO, A.; PEREZ-GALDONA, R.; WERNER, D.; MARTINEZ-ROMERO, E. *Bradyrhizobium canariense* sp nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae : Genisteeae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55: 569-575. 2005.

WANG, C.X.; SHENG, X.Y.; EQUI, R.C.; TRAINER, M.A.; CHARLES, T.C.; SOBRAL, B.W.S. Influence of the poly-3-hydroxybutyrate (PHB) granule-associated proteins (PhaP1 and PhaP2) on PHB accumulation and symbiotic nitrogen fixation in *Sinorhizobium meliloti* Rm1021. **Journal of Bacteriology**, v. 189: 9050-9056. 2007.

WANG, P.; ZHONG, Z.; ZHOU, J.; CAI, T.; ZHU, J. Exopolysaccharide biosynthesis is important for *Mesorhizobium tianshanense*: plant host interaction. **Archives of Microbiology**, v. 189: 525–530. 2008.

WEI G.H.; ZHANG Z.X.; CHEN, C.; CHEN, W.M.; JU W.T. Phenotypic and genetic diversity of rhizobia isolated from nodules of the legume genera *Astragalus*, *Lespedeza* and *Hedysarum* in northwestern China. **Microbiological Research**. v. 29: 315–332. 2008.

WEN, F.; CELOY, R.; PRICE, I.; EBOLO, J. J.; HAWES, M. C. Identification and characterization of a rhizosphere beta-galactosidase from *Pisum sativum* L. **Plant and Soil**, v. 304: 133-144. 2008.

WILLEMS, A. The taxonomy of rhizobia: an overview. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 287, p. 3-14, 2006.

WILLEMS, A.; FERNANDEZ-LOPEZ, M.; MUNOZ-ADELANTADO, E.; GORIS, J.; VOS, P.; MARTINEZ-ROMERO, E.; TORO, N.; GILLIS, M. Description of new *Ensifer*

- strains from nodules and proposal to transfer *Ensifer adhaerens* Casida 1982 to *Sinorhizobium* as *Sinorhizobium adhaerens* comb. nov. Request for an opinion. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53: 1207-1217. 2003.
- WILLIS, L.B.; WALKER, G.C. The *phbC* (poly-3-hydroxybutyrate synthase) gene of *Rhizobium* (*Sinorhizobium*) *meliloti* and characterization of *phbC* mutants. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44:554–564. 1998.
- WOESE, C.R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, v.51, p.221-271, 1987.
- WONG, P.P.; EVANS, H.J. Poly-3-hydroxybutyrate utilization by soybean (*Glycine max* Merr.) nodules and assessment of its role in maintenance of nitrogenase activity. **Plant Physiology**, v. 47 :750–755. 1971.
- WOOD, M.; COOPER, J. E.; BJORSON, A. J.; Response of Lotus rhizobia to acidity and aluminum in liquid culture and in soil. . **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 107, p. 227-231, 1988.
- XAVIER, G.R.; MARTINS, L.M.V.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Edaphic factors as determinants for the distribution of intrinsic antibiotic resistance in a cowpea, rhizobia population. **Biology and Fertility of Soils**, v. 27: 386-392. 1998.
- XAVIER, G.R.; MARTINS, L.M.V.; RIBEIRO, J.R.A.; RUMJANEK, N.G. Especificidade simbiótica entre rizóbios e acessos de feijão-caupi de diferentes nacionalidades. **Caatinga**, v. 1: 25-33. 2006.
- XAVIER, G.R.; MARTINS, L.M.V.; RUMJANEK, N.G.; NEVES, M.C.P. Tolerância de rizóbio de feijão-caupi à salinidade e à temperatura em condição in vitro. **Caatinga**, v. 20: 1-9. 2007.
- XAVIER, T.F.; ARAÚJO, A.S.F.; SANTOS, V.B.S.; CAMPOS, F.L. Ontogenia da nodulação em duas cultivares de feijão-caupi. **Ciência Rural**, v.37: 561–564. 2007a.
- YOUNG, J. M.; KUYKENDALL, L. D.; MARTINEZ-ROMERO, E.; KERR, A.; SAWADA, H. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R.vitis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51: 89-103. 2001.
- ZAHARAN, H.H. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in arid climate. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63: 968–989. 1999.
- ZILLI, J.É. **Caracterização e seleção de estirpes de rizóbio para a inoculação de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) em áreas de Cerrado**. Seropédica. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 112 f. 2001. (Dissertação de Mestrado).
- ZILLI, J.É; VALISHESKI, R.R.; FREIRE FILHO, F.R.; NEVES. M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Assesment of cowpea rhizobium in cerrado area of northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35: 281–287. 2004.

## ANEXO

### Planilha com as características culturais avaliadas para os 306 isolados bacterianos de nódulos de guandu.

Isolado	Dias de crescimento	Cor da colônia	Aparência da colônia	Reação de pH	Tamanho da colônia	Forma da colônia	Elevação da colônia	Borda	Transparência	Aparência da colônia	Aparência do muco	Elasticidade	Quantidade de muco	Aderência ao meio de cultura
1.2a	3	Br.	Hom.	Ác.	5 mm	Irr.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Hom.	1	3	n
1.2b	1	Am.	Het.	Neu.	1 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	1	3	n
1.4	2	Br.	Hom.	Ác.	5 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Het.	1	3	n
1.5	3	Br.	Hom.	Alc.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	1	n
1.6	2	Am.	Het.	Ác.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	1	2	n
10.1	2	Am.	Hom.	Ác.	1mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	3	n
10.2	3	Br.	Hom.	Alc.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Het.	1	2	s
10.4a	3	Br.	Het.	Ác.	5 mm	Irr.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	2	1	n
10.4b	3	Am.	Hom.	Neu.	3 mm	Irr.	Conv.	Int.	Transp.	Hom.	Het.	1	3	n
11.1b	2	Am.	Het.	Ác.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	2	2	n
11.2	1	Br.	Hom.	Neu.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	3	n
11.3a	2	Br.	Het.	Ác.	1 mm	Circ.	Plan.	Int.	Transp.	Het.	Hom.	1	2	n
12.1a	1	Br.	Het.	Ác.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	hetero	Het.	1	3	n
12.1b	2	Br.	Het.	Ác.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	1	2	n
12.3a	4	Br.	Het.	Ác.	3 mm	Irr.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	2	2	n
12.3b	3	Br.	Hom.	Neu.	4 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Hom.	1	3	n
12.4	1	Am.	Het.	Ác.	7 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Het.	2	3	s
12.5a	3	Br.	Hom.	Alc.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Het.	1	3	n
13.1	8	Br.	Hom.	Alc.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Hom.	1	3	n
14.1b	1	Br.	Hom.	Ác.	1 mm	Irr.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Het.	1	2	n
14.2a1	3	Am.	Het.	Ác.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Het.	Hom.	1	2	n
14.2a2	2	Br.	Hom.	Neu.	1 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Hom.	1	3	n
14.2b	2	Br.	Het.	Ác.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Het.	2	1	n

Isolado	Dias de crescimento	Cor da colônia	Aparência da colônia	Reação de pH	Tamanho da colônia	Forma da colônia	Elevação da colônia	Borda	Transparência	Aparência da colônia	Aparência do muco	Elasticidade	Quantidade de muco	Aderência ao meio de cultura
14.3	2	Br.	Hom.	Alc.	8 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Hom.	1	3	n
14.4a	2	Br.	Hom.	Alc.	1 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transp.	Hom.	Het.	2	2	n
14.4b	3	Am.	Hom.	Ác.	2 mm	Irr.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	2	n
15.1	2	Am.	Het.	Ác.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	1	3	s
15.2	2	Br.	Hom.	Neu.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Het.	1	3	n
15.3	6	Br.	Hom.	Neu.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Het.	1	3	n
15.5a	6	Br.	Hom.	Alc.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transp.	Hom.	Hom.	1	3	n
16.1	2	Br.	Hom.	Ác.	7 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Hom.	1	2	n
16.2	3	Br.	Het.	Ác.	4 mm	Irr.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	1	3	n
16.3	3	Br.	Hom.	Alc.	6 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	1	n
16.4a	2	Am.	Hom.	Ác.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	2	n
16.4b	2	Am.	Het.	Ác.	1mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Het.	Hom.	1	3	n
16.5	3	Br.	Het.	Ác.	4 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	1	2	n
17.1a	2	Am.	Het.	Neu.	<1mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Het.	Hom.	1	1	n
17.1b	2	Br.	Het.	Ác.	6 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	1	3	n
17.2	6	Br.	Hom.	Alc.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	trnasl	Hom.	Hom.	1	3	n
17.3a	5	Br.	Het.	Neu.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Het.	1	3	n
17.3b	5	Br.	Hom.	Ác.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Het.	1	1	n
17.4	3	Br.	Hom.	Ác.	9 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Hom.	1	2	n
17.4a	4	Br.	Het.	Ác.	5 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Het.	1	1	n
17.5	3	Br.	Hom.	Ác.	4 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Hom.	1	3	n
18.3	1	Br.	Hom.	Ác.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Hom.	1	3	n
18.5a2	7	Br.	Hom.	Alc.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	trnasl	Hom.	Hom.	1	3	n
19.1a	8	Br.	Hom.	Alc.	5 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transp.	Hom.	Het.	1	2	n
19.2	8	Br.	Hom.	Neu.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	tranal	Hom.	Hom.	2	2	s
19.4a	3	Br.	Hom.	Neu.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Hom.	1	3	n
19.4b	4	Br.	Hom.	Ác.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	2	2	n
19.5a	3	Br.	Hom.	Neu.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transp.	Hom.	Hom.	1	2	n

Isolado	Dias de crescimento	Cor da colônia	Aparência da colônia	Reação de pH	Tamanho da colônia	Forma da colônia	Elevação da colônia	Borda	Transparência	Aparência da colônia	Aparência do muco	Elasticidade	Quantidade de muco	Aderência ao meio de cultura
19.5b	3	Am.	Het.	Ác.	<1mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	1	2	n
20.1	1	Br.	Hom.	Ác.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Het.	1	3	n
20.2	1	Br.	Hom.	Ác.	<1mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Hom.	1	2	n
20.3	2	Br.	Het.	Ác.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Het.	Hom.	1	3	n
21.1a	2	Br.	Hom.	Ác.	6 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	2	n
21.1c	5	Br.	Hom.	Alc.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	2	n
21.3b	1	Br.	Hom.	Neu.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Het.	2	2	n
21.5	3	Br.	Hom.	Ác.	6 mm	Irr.	Conv.	Int.	Transp.	Hom.	Hom.	1	3	n
22.1	3	Am.	Hom.	Ác.	1mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Het.	1	2	n
22.2	1	Br.	Hom.	Ác.	<1mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Hom.	1	3	n
22.3	2	Br.	Hom.	Ác.	<1mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Het.	1	3	n
22.3b	2	Am.	Hom.	Neu.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Het.	1	2	n
23.3	2	Br.	Het.	Ác.	1 mm	Irr.	Plan.	Int.	Op.	Het.	Hom.	1	3	n
23.4	2	Br.	Hom.	Ác.	<1mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	2	n
23.5	2	Br.	Het.	Ác.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Het.	2	1	n
23.5	2	Br.	Het.	Ác.	9 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	2	2	s
24.1	3	Br.	Hom.	Ác.	6 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	2	n
24.2	3	Br.	Het.	Ác.	5 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Het.	1	3	n
24.3	2	Br.	Het.	Ác.	9 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Het.	Hom.	1	3	n
24.4a	2	Br.	Hom.	Neu.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Het.	1	3	n
24.4b	3	Br.	Het.	Ác.	4 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	1	2	n
24.6a	2	Br.	Hom.	Neu.	1 mm	Circ.	Conv.	Rec.	Op.	Hom.	Het.	1	2	n
24.6b	3	Br.	Het.	Ác.	10 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transp.	Het.	Hom.	1	2	n
25.1a	1	Br.	Het.	Neu.	5 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Het.	Hom.	1	2	n
25.1b	1	Br.	Hom.	Ác.	<1mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Hom.	1	1	n
25.2	5	Br.	Hom.	Alc.	<1mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	3	n
25.3	1	Br.	Het.	Ác.	1 mm	Irr.	Plan.	Int.	Transl.	Het.	Hom.	2	2	n
25.5a	2	Br.	Het.	Ác.	1 mm	Circ.	Conv.	Rec.	Transl.	Het.	Het.	1	3	n

Isolado	Dias de crescimento	Cor da colônia	Aparência da colônia	Reação de pH	Tamanho da colônia	Forma da colônia	Elevação da colônia	Borda	Transparência	Aparência da colônia	Aparência do muco	Elasticidade	Quantidade de muco	Aderência ao meio de cultura
25.5b	5	Br.	Hom.	Alc.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	3	s
26.1a	2	Br.	Hom.	Neu.	5 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Het.	1	3	n
26.1b	2	Br.	Hom.	Ác.	1 mm	Irr.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	2	2	n
26.2b	3	Am.	Het.	Ác.	1 mm	Circ.	Plan.	Int.	Transp.	Het.	Hom.	1	2	n
26.3	3	Incolor	Hom.	Neu.	<1mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Het.	1	3	n
26.4	3	Br.	Hom.	Neu.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Hom.	1	2	n
26.5	2	Br.	Hom.	Ác.	1 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	1	n
27.1	3	Br.	Hom.	Alc.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Het.	2	1	n
27.2	4	Br.	Het.	Ác.	5 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Het.	1	2	n
27.3	3	Br.	Hom.	Alc.	1 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Het.	1	3	n
27.4	3	Br.	Hom.	Alc.	1 mm	Irr.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	2	n
27.5	3	Br.	Hom.	Neu.	3 mm	Irr.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	2	1	n
28.3	4	Br.	Het.	Neu.	<1mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	1	3	n
28.4	2	Br.	Hom.	Ác.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Hom.	1	3	n
28.6	5	Br.	Hom.	Ác.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	2	1	n
29.1	3	Br.	Hom.	Alc.	1 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Het.	1	2	n
29.2	3	Br.	Hom.	Alc.	<1mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Hom.	2	2	n
29.3	3	Br.	Hom.	Alc.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	3	n
29.4a	3	Br.	Hom.	Alc.	1 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Hom.	1	3	n
29.4b	1	Br.	Het.	Ác.	<1mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Het.	Het.	1	2	n
29.5a	7	Br.	Hom.	Alc.	1 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Het.	1	2	n
29.5b	3	Br.	Hom.	Ác.	1 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Hom.	1	3	n
29.6	4	Br.	Hom.	Ác.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Het.	1	1	n
3.1a	2	Br.	Het.	Neu.	5 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	1	2	n
3.1b	2	Br.	Het.	Ác.	9 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Het.	Hom.	1	3	n
3.2	4	Br.	Hom.	Neu.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	3	n
3.3	4	Br.	Het.	Ác.	1 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Het.	Hom.	1	3	n
3.4	4	Br.	Hom.	Neu.	4 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transp.	Hom.	Hom.	1	2	s

Isolado	Dias de crescimento	Cor da colônia	Aparência da colônia	Reação de pH	Tamanho da colônia	Forma da colônia	Elevação da colônia	Borda	Transparência	Aparência da colônia	Aparência do muco	Elasticidade	Quantidade de muco	Aderência ao meio de cultura
3.5	2	Br.	Het.	Neu.	<1mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	1	2	n
3.6	3	Br.	Hom.	Ác.	7 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Hom.	1	2	n
30.1	2	Br.	Het.	Alc.	1 mm	Irr.	Conv.	Int.	Transp.	Het.	Hom.	1	1	n
30.2b	2	Br.	Het.	Alc.	<1mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Het.	Het.	1	2	n
30.3	4	Br.	Hom.	Ác.	1 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Het.	1	2	n
30.5	4	Br.	Hom.	Neu.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	3	s
30.6a	3	Br.	Het.	Neu.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	1	2	n
31.2	4	Br.	Hom.	Neu.	1 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transp.	Hom.	Het.	1	3	n
32.1	3	Br.	Hom.	Alc.	7 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	3	n
33.2a	1	Br.	Het.	Ác.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Het.	Hom.	1	3	n
33.2b	1	Br.	Het.	Ác.	<1mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	1	3	n
34.1	3	Br.	Hom.	Neu.	4 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Hom.	1	2	n
34.2a	1	Br.	Het.	Ác.	9 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	1	2	n
34.2b	3	Br.	Hom.	Alc.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Het.	1	3	n
34.3	1	Br.	Het.	Ác.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	2	2	s
34.5	6	Br.	Hom.	Alc.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	2	2	n
35.1	1	Br.	Het.	Ác.	5 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	1	2	n
35.2	1	Br.	Het.	Ác.	5 mm	Irr.	Conv.	Int.	Transl.	Het.	Het.	1	2	n
35.4	3	Br.	Hom.	Alc.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Hom.	1	1	s
35.5	1	Br.	Het.	Ác.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Het.	Het.	2	2	n
37.1	4	Br.	Hom.	Neu.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Hom.	1	3	n
37.2	1	Br.	Het.	Ác.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Het.	Hom.	1	2	n
37.3	2	Br.	Hom.	Ác.	5 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	2	n
37.5b	1	Am.	Het.	Alc.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Het.	Hom.	1	2	n
38.2	3	Br.	Hom.	Alc.	4 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Hom.	2	2	n
38.3a	3	Br.	Hom.	Ác.	9 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transp.	Hom.	Hom.	1	3	n
38.5a	2	Br.	Hom.	Ác.	5 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Het.	1	3	n
38.5b	3	Br.	Het.	Ác.	7 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	1	3	n



Isolado	Dias de crescimento	Cor da colônia	Aparência da colônia	Reação de pH	Tamanho da colônia	Forma da colônia	Elevação da colônia	Borda	Transparência	Aparência da colônia	Aparência do muco	Elasticidade	Quantidade de muco	Aderência ao meio de cultura
38.5c	3	Br.	Het.	Ác.	5 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	1	2	n
38.6	2	Br.	Hom.	Ác.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Het.	1	2	s
39.1	3	Am.	Het.	Alc.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Het.	1	2	s
39.2a	1	Br.	Het.	Ác.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	1	3	n
39.2b	1	Br.	Hom.	Neu.	5 mm	Irr.	Plan.	Int.	Transp.	Hom.	Het.	1	2	n
39.2c	1	Br.	Het.	Ác.	6 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Het.	1	3	n
39.3	3	Br.	Hom.	Alc.	1 mm	Circ.	Plan.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	3	n
39.4	4	Br.	Hom.	Ác.	<1mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	2	2	n
39.5a	4	Br.	Hom.	Neu.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	3	n
39.5b	4	Br.	Het.	Neu.	1 mm	Irr.	Plan.	Int.	Transl.	Het.	Het.	1	3	n
4.1	4	Br.	Hom.	Ác.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	3	n
4.2	5	Br.	Het.	Ác.	1 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Het.	Hom.	1	3	n
4.4	5	Br.	Het.	Ác.	6 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Het.	Het.	2	3	n
4.5	3	Br.	Hom.	Alc.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	2	2	n
40.1	3	Br.	Hom.	Ác.	7 mm	Irr.	Conv.	Int.	Transp.	Hom.	Het.	1	3	n
40.3	4	Br.	Hom.	Neu.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	2	n
41.1	3	Br.	Hom.	Ác.	<1mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Het.	1	3	n
41.2	3	Br.	Hom.	Alc.	3 mm	Irr.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Het.	2	2	n
41.3	3	Br.	Hom.	Alc.	6 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	2	n
41.4	3	Br.	Hom.	Ác.	1 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Het.	1	2	n
41.5	3	Br.	Hom.	Alc.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Hom.	1	2	n
42.1	3	Br.	Hom.	Alc.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Het.	1	2	n
42.3b	1	Br.	Het.	Ác.	9 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	2	3	n
42.4	3	Br.	Hom.	Alc.	5 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Het.	1	3	n
43.1	3	Br.	Hom.	Alc.	9 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	1	n
43.2	1	Br.	Het.	Ác.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	1	3	n
43.4	4	Br.	Hom.	Alc.	7 mm	Irr.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Hom.	2	2	n
43.5	6	Br.	Hom.	Alc.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	2	s

Isolado	Dias de crescimento	Cor da colônia	Aparência da colônia	Reação de pH	Tamanho da colônia	Forma da colônia	Elevação da colônia	Borda	Transparência	Aparência da colônia	Aparência do muco	Elasticidade	Quantidade de muco	Aderência ao meio de cultura
44.1a	3	Br.	Het.	Neu.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Het.	Hom.	1	3	n
44.1b	6	Br.	Hom.	Alc.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	2	n
44.2	1	Br.	Hom.	Ác.	7 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Hom.	1	2	n
44.3	5	Br.	Hom.	Ác.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Het.	1	2	n
44.4	3	Br.	Hom.	Alc.	6 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	3	n
44.5	3	Br.	Het.	Ác.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Het.	1	2	n
44.6	5	Br.	Hom.	Alc.	1 mm	Irr.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Het.	2	3	n
45.1	3	Br.	Het.	Ác.	<1mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	1	3	n
45.2	1	Br.	Hom.	Ác.	9 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	2	2	n
45.3	1	Br.	Hom.	Ác.	6 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	3	n
45.4	1	Br.	Hom.	Ác.	1 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Hom.	1	1	n
46.1	3	Br.	Hom.	Alc.	5 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Hom.	1	3	n
46.1b	2	Am.	Het.	Alc.	4 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Het.	1	2	n
46.2	2	Br.	Het.	Ác.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	2	3	n
46.3	2	Br.	Het.	Ác.	5 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	2	2	n
46.4	3	Br.	Hom.	Alc.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Het.	1	1	n
46.5	3	Br.	Hom.	Alc.	5 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Het.	1	2	n
47.1	3	Am.	Hom.	Ác.	<1mm	Irr.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	2	n
47.2	1	Br.	Het.	Ác.	7 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Het.	Hom.	1	2	n
47.3a	2	Br.	Het.	Ác.	5 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	1	2	n
47.3b	2	Br.	Het.	Ác.	5 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	2	3	n
47.4	1	Br.	Het.	Neu.	5 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Het.	Hom.	1	3	n
47.5	1	Br.	Het.	Ác.	1 mm	Irr.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Het.	1	2	n
47.6	3	Br.	Hom.	Ác.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	3	n
48.1	4	Br.	Het.	Alc.	7 mm	Irr.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	1	2	n
48.3	2	Br.	Het.	Ác.	6 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	1	2	n
48.4a	3	Br.	Hom.	Ác.	2 mm	Irr.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	2	2	n
48.4b	1	Br.	Hom.	Ác.	1 mm	Irr.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	2	n

Isolado	Dias de crescimento	Cor da colônia	Aparência da colônia	Reação de pH	Tamanho da colônia	Forma da colônia	Elevação da colônia	Borda	Transparência	Aparência da colônia	Aparência do muco	Elasticidade	Quantidade de muco	Aderência ao meio de cultura
48.5a	2	Br.	Het.	Ác.	5 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transp.	Het.	Het.	1	3	n
48.5b	3	Br.	Hom.	Alc.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Het.	2	2	n
49.1	2	Am.	Het.	Neu.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Het.	Het.	2	2	n
49.2	4	Br.	Hom.	Alc.	7 mm	Circ.	Plan.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	1	n
49.3a	4	Br.	Hom.	Alc.	<1mm	Circ.	Conv.	Int.	Transp.	Hom.	Hom.	1	2	n
49.3b	4	Br.	Hom.	Alc.	10 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transp.	Hom.	Hom.	1	2	n
5.2	6	Br.	Hom.	Alc.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	2	n
5.5	2	Br.	Het.	Ác.	3 mm	Irr.	Conv.	Int.	tranp	Het.	Hom.	1	1	n
50.1	3	Br.	Hom.	Ác.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Hom.	1	1	n
50.2	4	Br.	Hom.	Alc.	4 mm	Circ.	Plan.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	2	3	n
50.3	2	Br.	Het.	Ác.	<1mm	Irr.	Plan.	Int.	Transp.	Het.	Het.	2	2	n
50.4	2	Br.	Het.	Ác.	6 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	1	2	n
50.5a	2	Br.	Het.	Ác.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	1	3	n
50.5b	2	Br.	Het.	Ác.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	1	3	n
51.2	5	Br.	Hom.	Alc.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom	Het.	1	3	n
51.3	5	Br.	Hom.	Alc.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	3	n
51.4	5	Br.	Hom.	Ác.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Het.	1	2	n
51.5a	3	Br.	Het.	Neu.	4 mm	Circ.	Conv.	irreg	Op.	Het.	Hom.	1	3	n
51.5b	4	Br.	Hom.	Alc.	5 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	2	2	n
52.2a	4	Am.	Hom.	Ác.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Het.	1	3	n
52.3a	1	Am.	Hom.	Ác.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Hom.	1	2	n
52.5	4	Br.	Hom.	Alc.	4 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Hom.	1	2	n
53.1	3	Br.	Het.	Ác.	5 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Het.	1	2	n
53.3	1	Br.	Hom.	Ác.	4 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Het.	1	2	n
53.4	4	Br.	Hom.	Alc.	6 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Hom.	1	2	s
53.5b	4	Br.	Hom.	Neu.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Het.	1	3	n
53.6	3	Am.	Het.	Ác.	1 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	1	3	n
54.1a	3	Br.	Het.	Ác.	4 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Het.	Hom.	1	2	n

Isolado	Dias de crescimento	Cor da colônia	Aparência da colônia	Reação de pH	Tamanho da colônia	Forma da colônia	Elevação da colônia	Borda	Transparência	Aparência da colônia	Aparência do muco	Elasticidade	Quantidade de muco	Aderência ao meio de cultura
54.1b	4	Am.	Het.	Ác.	2 mm	Irr.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	1	2	n
54.3	2	Am.	Het.	Neu.	2 mm	Circ.	Conv.	Rec.	Transl.	Het.	Hom.	1	3	n
54.4	2	Am.	Hom.	Ác.	<1mm	Circ.	Plan.	Rec.	Op.	Hom.	Het.	2	2	n
54.5	2	Am.	Hom.	Ác.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Het.	1	3	n
54.6	3	Am.	Het.	Ác.	2 mm	Irr.	Conv.	Int.	Transp.	Het.	Het.	1	3	n
54.6b	3	Br.	Hom.	Ác.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	2	n
55.3a	3	Am.	Het.	Ác.	<1mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	1	2	n
56.1	4	Br.	Het.	Ác.	1 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	1	2	n
56.2	4	Br.	Hom.	Neu.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Het.	1	1	n
56.3	2	Br.	Hom.	Ác.	4 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Hom.	1	3	n
56.3a	2	Br.	Het.	Ác.	4 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	2	3	n
56.4a	2	Br.	Het.	Ác.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Het.	Het.	1	3	n
56.5	3	Br.	Hom.	Ác.	9 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Hom.	2	2	n
57.1a	3	Br.	Het.	Ác.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Het.	Hom.	1	3	n
57.1b	3	Br.	Het.	Ác.	1 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Het.	Hom.	1	2	n
57.2	2	Br.	Het.	Ác.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	2	1	n
57.3	2	Br.	Het.	Ác.	5 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Het.	1	3	n
57.3	2	Br.	Hom.	Ác.	5 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	2	n
57.4	4	Br.	Hom.	Ác.	<1mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Het.	1	2	n
57.4a	3	Br.	Het.	Ác.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	2	2	n
57.4b	2	Br.	Het.	Ác.	4 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Het.	Hom.	1	2	n
58.1	4	Br.	Het.	Neu.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Het.	1	3	n
58.2	2	Br.	Het.	Ác.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Het.	1	2	n
58.4	2	Br.	Hom.	Ác.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	2	2	n
58.5	4	Br.	Het.	Ác.	1 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Het.	Hom.	1	3	n
59.1	3	Br.	Het.	Ác.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	1	2	s
59.3	6	Br.	Hom.	Alc.	4 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Het.	2	2	n
59.4	1	Am.	Hom.	Ác.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	2	n

Isolado	Dias de crescimento	Cor da colônia	Aparência da colônia	Reação de pH	Tamanho da colônia	Forma da colônia	Elevação da colônia	Borda	Transparência	Aparência da colônia	Aparência do muco	Elasticidade	Quantidade de muco	Aderência ao meio de cultura
59.5	2	Br.	Het.	Ác.	4 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	1	3	n
59.6a	1	Br.	Hom.	Ác.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	3	n
6.2a	4	Br.	Het.	Neu.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	1	1	n
6.2b	3	Br.	Het.	Ác.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	1	3	n
6.3	5	Br.	Hom.	Ác.	1 mm	Circ.	Plan.	Int.	Op.	Hom.	Het.	1	2	n
6.5	8	Br.	Hom.	Ác.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transp.	Hom.	Hom.	2	2	n
6.6	5	Br.	Hom.	Neu.	6 mm	Irr.	Conv.	nteira	Op.	Hom.	Hom.	1	3	n
61.1	2	Am.	Hom.	Ác.	<1 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	3	n
61.2	4	Am.	Hom.	Ác.	6 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Het.	1	3	n
61.3	4	Br.	Hom.	Neu.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	2	n
61.4	2	Am.	Hom.	Ác.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Het.	1	2	n
61.5	7	Br.	Hom.	Alc.	5 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Het.	1	2	n
61.6	6	Br.	Hom.	Neu.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	3	s
62.3	2	Br.	Het.	Ác.	4 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Het.	Hom.	1	2	n
62.4	1	Br.	Het.	Ác.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	2	2	n
62.5	4	Am.	Hom.	Ác.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	2	2	n
62.5b3	3	Am.	Hom.	Ác.	4 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Hom.	1	2	n
63.1	4	Br.	Hom.	Neu.	4 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Het.	1	3	n
63.2a1	4	Br.	Hom.	Neu.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Het.	1	1	n
63.2a2	2	Br.	Het.	Ác.	4 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Het.	Hom.	1	3	n
63.3	4	Br.	Het.	Ác.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Het.	Het.	1	2	n
63.3b	5	Br.	Hom.	Neu.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Het.	1	1	n
65.1	6	Br.	Hom.	Ác.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Hom.	1	3	n
65.2b2	2	Br.	Het.	Neu.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	trasl	Het.	Het.	1	3	n
65.3	2	Br.	Het.	Ác.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Het.	Hom.	1	3	n
65.4a	5	Br.	Hom.	Neu.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	3	n
65.4b	2	Br.	Hom.	Ác.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Het.	1	2	n
66.1	2	Br.	Hom.	Ác.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Het.	1	3	n

Isolado	Dias de crescimento	Cor da colônia	Aparência da colônia	Reação de pH	Tamanho da colônia	Forma da colônia	Elevação da colônia	Borda	Transparência	Aparência da colônia	Aparência do muco	Elasticidade	Quantidade de muco	Aderência ao meio de cultura
66.3	6	Incolor	Hom.	Ác.	1 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transp.	Hom.	Hom.	1	3	n
67.1a	6	Br.	Het.	Alc.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transp.	Het.	Het.	2	2	n
67.1b	2	Br.	Het.	Ác.	6 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Het.	Hom.	1	2	n
67.2	2	Am.	Hom.	Alc.	1 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Het.	1	1	n
67.3	4	Br.	Hom.	Alc.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Het.	1	1	n
67.5	2	Br.	Het.	Ác.	9 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Het.	1	2	n
68.3a	3	Br.	Het.	Ác.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	1	3	n
68.3b	7	Br.	Hom.	Alc.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Hom.	1	2	n
68.3c	5	Br.	Hom.	Neu.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	2	n
68.4	4	Br.	Het.	Ác.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Het.	Hom.	1	3	n
69.1	4	Br.	Hom.	Alc.	6 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Het.	1	2	n
69.4	4	Br.	Hom.	Neu.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Het.	1	3	n
7.1	2	Br.	Het.	Ác.	5 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Het.	Hom.	1	3	n
71.2a	2	Br.	Het.	Ác.	5 mm	Irr.	Conv.	Rec.	Op.	Het.	Het.	1	3	n
71.2b	3	Br.	Het.	Ác.	3 mm	Irr.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	2	2	n
71.3a	3	Br.	Het.	Ác.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Het.	Hom.	1	3	n
71.3b	3	Br.	Het.	Ác.	3 mm	Irr.	Plan.	Int.	Transp.	Het.	Het.	1	3	n
71.3c	3	Br.	Het.	Ác.	<1 mm	Irr.	Conv.	Int.	Transl.	Het.	Hom.	2	2	n
71.4	2	Br.	Het.	Ác.	5 mm	Irr.	Conv.	Rec.	Op.	Het.	Hom.	1	3	n
71.6	2	Br.	Hom.	Neu.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Het.	1	3	n
8.1a	2	Br.	Hom.	Ác.	5 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Hom.	1	2	n
8.1b	2	Br.	Hom.	Alc.	1 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Het.	1	3	s
8.1c	2	Am.	Hom.	Neu.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	transal	Hom.	Het.	1	3	n
8.2	3	Br.	Het.	Ác.	1 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Het.	Hom.	1	3	n
8.5	5	Am.	Hom.	Ác.	2 mm	Circ.	Conv.	Int.	transal	Hom.	Het.	1	3	n
8.5b	7	Br.	Hom.	Alc.	<1mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	3	n
9.2	2	Br.	Hom.	Ác.	5 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Het.	1	3	s
9.3	8	Br.	Hom.	Alc.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	2	n

Isolado	Dias de crescimento	Cor da colônia	Aparência da colônia	Reação de pH	Tamanho da colônia	Forma da colônia	Elevação da colônia	Borda	Transparência	Aparência da colônia	Aparência do muco	Elasticidade	Quantidade de muco	Aderência ao meio de cultura
9.4a	8	Br.	Hom.	Alc.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Het.	1	3	s
9.5	6	Br.	Hom.	Alc.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Transl.	Hom.	Hom.	1	2	n
9.5a	6	Br.	Hom.	Alc.	3 mm	Circ.	Conv.	Int.	Op.	Hom.	Hom.	1	2	n

Cor da colônia: Br.= branca, Am.=amarelada; Aparência da colônia: Hom.= homogênea, Het.= heterogênea; Reação de pH: Ác.= ácida, Neu.= neutra, Alc.= alcalina; Forma da colônia: Circ.= circular, Irr.= irregular; Elevação da colônia: Conv.= convexa, Plan.= plana; Aparência da colônia: Hom.= homogênea, Het.= heterogênea; Elasticidade: 1= muco sem elasticidade, 2=muco com elasticidade; Quantidade de muco: 1=pouca, 2= mediana, 3= abundante; Aderência ao meio de cultura: s=aderente, n=não aderente.