

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
CAMPUS DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM
CIÊNCIAS MOLECULARES

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE
BACTÉRIAS ISOLADAS DAS RAÍZES DE
ARROZ DE SEQUEIRO QUANTO A
PRODUÇÃO DE BIOCOMPOSTOS E
PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO
VEGETAL**

MAURICIO DE SOUSA OLIVEIRA

ANÁPOLIS-GO

2016



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
CAMPUS DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
MOLECULARES

MAURICIO DE SOUSA OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DAS
RAÍZES DE ARROZ DE SEQUEIRO QUANTO A PRODUÇÃO DE
BIOCOMPOSTOS E PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL**

Anápolis-GO

Março/2016

MAURICIO DE SOUSA OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE
BACTÉRIAS ISOLADAS DAS RAÍZES DE
ARROZ DE SEQUEIRO QUANTO A
PRODUÇÃO DE BIOCOMPOSTOS E
PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO
VEGETAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Moleculares da Universidade Estadual de Goiás como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares.

Área de Concentração: Química Orgânica

Orientador: Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves

Co-Orientadora: Dra. Cláudia Cristina Garcia
Martin Didonet

Anápolis-GO

Março/2016

Oliveira, Mauricio de Sousa

Caracterização bioquímica de bactérias isoladas das raízes de arroz de sequeiro quanto a produção de biocompostos e promoção do crescimento vegetal-2016.

106 folhas. 11 figuras.

Orientador: Prof. Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Goiás, 2016.

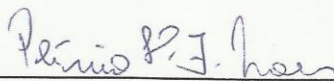
1. Biofilme. 2. Ácido indol-3-acético. 3. Região espaçadora intergênica. 4. Crescimento total. 5. Proteínas totais. 6. Teste de germinação

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DAS
RAÍZES DE ARROZ DE SEQUEIRO QUANTO A PRODUÇÃO DE
BIOCOMPOSTOS E PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL

MAURICIO DE SOUSA OLIVEIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências Moleculares do
Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas Henrique Santillo, da
Universidade Estadual de Goiás, apresentada como parte dos requisitos
necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares.

Aprovada em 28/03/2016 por:



Prof. Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves (UEG)



Profa. Dra. Valdirene Neves Monteiro (UEG)



Prof. Dr. Flávio Marques Lopes (UFG)

ANÁPOLIS – GO
MARÇO 2016

RESUMO

A melhoria da fertilidade do solo e a produtividade das culturas com redução dos impactos negativos dos fertilizantes químicos no ambiente é algo imprescindível para a agricultura moderna. Nesta vertente tem se observado um grande interesse pelo estudo de micro-organismos do solo que contribuam para a atividade agrícola, sobretudo melhorando a fertilidade do solo e sustentabilidade da agricultura. O processo de fixação biológica de nitrogênio permite que diferentes micro-organismos supram total ou parcialmente a demanda de nitrogênio da planta hospedeira. Este trabalho objetivou analisar parâmetros que possam indicar a eficácia de isolados bacterianos de nódulos radiculares de plantas de arroz de sequeiro quanto a sua eficiência na produção de biocompostos e promoção do crescimento vegetal. Foram avaliados parâmetros como o perfil de crescimento e produção de proteínas totais, formação de biofilme com a determinação da biomassa e da viabilidade celular, produção da auxina (ácido indol-3-acético), análise molecular da região espaçadora intergênica 16S-23S e teste de germinação com os cultivares de arroz Caiapó e Canastra. O comportamento das estirpes foi diferente nos três meios de cultura avaliados. O perfil de crescimento e produção de proteínas totais foram superiores no caldo batata a partir de 12 e 36 horas de incubação, respectivamente. Todas as cepas formaram biofilme com células viáveis associadas em níveis variáveis dependendo do meio e da estirpe em questão. Foi observado que o caldo batata propiciou uma melhor formação de biomassa associada ao biofilme, entretanto quando considerada a razão entre a formação de biofilme e a taxa de crescimento, a formação de biofilme foi maior nos meios RDM e YM. Todos os isolados produziram a auxina ácido indol-3-acético, com valores variando entre $0,207 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $33,212 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Na caracterização molecular por meio da amplificação da região espaçadora intergênica 16s-23S foram observados fragmentos de produtos de PCR variando entre 787 a 9.045 pares de base (pb), com presença de 1 a 3 bandas separadas em gel de agarose, desta forma foi possível dividir as estirpes em nove grupos com 100% de similaridade, sendo o grupo II composto por nove cepas. No teste de germinação o genótipo Canastra sobressaiu em relação ao Caiapó para o número de ramificações, massa fresca da parte aérea e raiz e massa seca raiz e o genótipo Caiapó sobressaiu ao Canastra apenas para massa seca da parte aérea. Na avaliação geral por tratamento foram observadas diferenças significantes apenas para raiz e parte aérea, sendo que o isolado R5 foi o que apresentou melhores resultados.

Palavras Chave: biofilme, ácido indol-3-acético, região espaçadora intergênica, crescimento total, proteínas totais, teste de germinação.

ABSTRACT

Improve soil fertility and crop productivity, reducing the negative impact of chemical fertilizers on the environment is something essential for modern agriculture. In this context it has been observed a constant interest in the study of soil microorganisms, which contribute to agricultural activity, especially improving soil fertility and for a sustainable agriculture. The process of biological nitrogen fixation allows that different microorganisms supplement totally or partially the nitrogen demand of the host plant. This study aimed to analyze parameters that can indicate the efficacy of bacterial isolates from root nodules of sequeiro rice plants, in relation their efficiency in the production of biocompounds and plant growth promotion. Were evaluated parameters as growth cellular profile, production of total proteins, biofilm formation with the determination of biomass and cell viability, production of auxin (indole-3-acetic acid), molecular analysis of intergenic spacer region 16S-23S and germination test with the cultivars Canastra and Caiapó. The behavior of the strains were different in the three culture mediums. The growth profile and production of total proteins were greater in potato broth than another mediums from 12 and 36 hours of incubation, respectively. All strains formed biofilm with viable cells associated, with levels depending on the medium and the strain in question. Was observed that the potato broth provide a better formation of the biofilm with associated biomass, however when the ratio between biomass and growth rate is considered the biofilm index was higher for RDM and YM medium. All isolates produced AIA, with values variation from $0.207 \mu\text{g.mL}^{-1}$ to $33.212 \mu\text{g.mL}^{-1}$. In molecular characterization by amplification of the spacer intergenic region 16S-23S were observed that PCR products fragments ranging from 787-9045 base pairs (bp) with presence of 1 to 3 separate bands in agarose gel, thus, it allowed share the strains into nine groups with 100% similarity, with group II compound for nine strains. In germination test, the Canastra genotype was better than Caiapó in relation of the number of ramifications, fresh mass for root and shoots and dry mass for root. Caiapó was better than Canastra only for dry mass of shoots. In the overall assessment by treatment, significant differences were observed only for root and shoot, and the isolated R5 showed the best results in these two parameters.

Keywords: biofilm, indole-3-acetic acid, intergenic spacer region, total growth, total protein, germination test.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3 REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1 BACTÉRIAS DO SOLO FIXADORAS DE NITROGÊNIO	17
3.2 AGRICULTURA SUSTENTÁVEL.....	20
3.3 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO.....	22
3.4 BIOFILME.....	29
3.5 EXOPOLISSACARÍDEOS	33
3.6 AUXINAS.....	35
3.7 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 MATERIAL BIOLÓGICO	41
4.2 MEIOS DE CULTURA	41
4.3 MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS	42
4.4 CURVA DE CRESCIMENTO	43
4.5 PROTEÍNAS TOTAIS	44
4.6 FORMAÇÃO DE BIOFILME.....	44
4.6.1 Biomassa Total e Índice de Formação de Biofilme.....	45
4.4.2 Viabilidade Celular no Biofilme (VCB).....	46
4.7 PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO (AIA)	48

4.8 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA	49
4.8.1 Extração DNA.....	49
4.8.2 Amplificação das Regiões IGS 16s-23S e 16S rDNA.....	50
4.9.2 Análise dos Resultados dos Fragmentos Obtidos pela Amplificação por PCR da Região Intergênica.....	53
4.9 TESTE DE GERMINAÇÃO	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1 CURVA DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS.....	56
5.2 BIOFILME.....	58
5.3 PRODUÇÃO ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO (AIA).....	69
5.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR POR PCR (REGIÃO IGS)	73
5.5 TESTE DE GERMINAÇÃO	76
6 CONCLUSÃO	84
7 BIBLIOGRAFIA.....	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Nódulos fixadores de nitrogênio formados por rizóbios em plantas leguminosas.....	24
Figura 02 – Microscopia eletrônica de nódulos formados por bacteroides de <i>Rhizobium</i> em raízes de feijoeiro.....	24
Figura 03 – Representação do processo de infecção e produção de nódulos fixadores de nitrogênio por agro bactérias simbióticas.....	27
Figura 04 – Estrutura geral de um fator Nod produzido por bactérias do gênero <i>Rhizobium</i> . R1-R9 são grupos químicos substituintes que são observados para diferentes estirpes bacterianas.....	28
Figura 05 – Curva de crescimento populacional das estirpes nos distintos meios de cultura.....	56
Figura 06 – Curva de proteínas totais das estirpes nos distintos meios de cultura.....	57
Figura 07 – Resultados obtidos após a adição do reagente de Salkowski ao sobrenadante do CB crescido suplementado com triptofano.....	69
Figura 08 – Perfil eletroforético da amplificação em PCR da região intergênica (16S-23S rDNA) de 15 isolados de nódulos de arroz e 5 estirpes controles em gel de agarose (1,7%) com marcador molecular 1 kb-DNA-Ladder e 100pb-DNA-Ladder.....	75
Figura 09 – Dendrograma definido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard para as avaliações dos fragmentos da região espaçadora intergênica 16S-23S rDNA obtidos em gel de agarose (1,7%) nas análise molecular das bactérias em estudo.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Meios de cultura utilizados no trabalho e suas respectivas composições.....	42
Tabela 02 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação de sequencias genicas IRS 16S-23S rDNA.....	51
Tabela 03 – Reação de amplificação da região espaçadora intergênica 16S-23S rDNA segundo protocolo de Reis Júnior e colaboradores (2004) com modificações.....	51
Tabela 04. Protocolo com ciclos de amplificação para termociclador para a região IRS 16S-23S.....	52
Tabela 05 – Resultados obtidos para biomassa total, crescimento total e índice de formação de biofilme no meio RDM.....	58
Tabela 06 – Resultados obtidos para biomassa total, crescimento total e índice de formação de biofilme no meio YM.....	59
Tabela 07 – Resultados obtidos para biomassa total, crescimento total e índice de formação de biofilme no meio caldo batata.....	61
Tabela 08 – Resultados obtidos na análise de viabilidade celular nos meios de cultura analisados.....	62
Tabela 09 – Desempenho das bactérias nos testes de formação de biofilme nos meios de cultivo empregados.	64
Tabela 10 – Correlação entre os índices de IFB e VCB e os meios de cultura empregados.....	66
Tabela 11 – Concentração de AIA sintetizado por bactérias da família <i>Rhizobiaceae</i> isoladas de nódulos das raízes de arroz sequeiro e crescidas em meio caldo batata suplementado com triptofano.....	70

Tabela 12 – Taxa de germinação (%) dos genótipos nos cinco tratamentos realizados mantidos em placas de Petri com papel filtro em câmara de germinação.....	76
Tabela 13 – Médias obtidas no teste de Tukey para comprimento da raiz no teste de germinação.....	77
Tabela 14 – Médias obtidas no teste de Tukey para comprimento da parte aérea no teste de germinação.....	78
Tabela 15 – Médias obtidas no teste de Tukey para número de ramificações no teste de germinação.....	78
Tabela 16 – Médias obtidas no teste de Tukey para massa fresca da parte aérea no teste de germinação.....	79
Tabela 17 – Médias obtidas no teste de Tukey para massa fresca da raiz no teste de germinação.....	80
Tabela 18 – Médias obtidas no teste de Tukey para massa seca parte aérea no teste de germinação.....	81
Tabela 19 – Médias obtidas no teste de Tukey para massa seca raiz no teste de germinação.....	81

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

- a – Número de combinações com características menos as combinações de ausência
- Abs – Absorbância
- AIA – Ácido indol-3-acético
- AIP – Ácido indol-3-pirúvico
- BMT – Biomassa total
- BSA – Albumina bovina
- CB – Caldo batata
- CV – Cristal violeta
- d – Número de combinações de ausência de características
- EDTA – Ácido etilenodiamino tetracético
- EPS – Exopolissacarídeos
- FBN – Fixação biológica de nitrogênio
- IAM – Indol-3-acetamida
- IAO_x – Indol-3-acetaldoxima
- IFB – Índice de formação de biofilme
- IGS – Região espaçadora intergênica
- J – Coeficiente de Jaccard
- n – Números de combinações possíveis
- RDM – *Rhizobium defined medium*
- RFLP – Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição
- RNase – Ribonuclease
- SDA – Dodecil sulfato de sódio
- SFE – Solução fisiológica estéril
- sp – Várias espécies
- TAM – Triptamina
- TBE – Tampão tris/borato/EDTA
- Tris – tris (hidroximetil aminometano)
- UPGMA – *Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean*
- UV - Ultravioleta
- VCB – Viabilidade celular no biofilme
- YM – *Yeast manitol*

1 INTRODUÇÃO

O alto custo da produção agrícola tanto no âmbito ambiental quanto financeiro impacta diretamente na função primária do sistema alimentar mundial. Isso acaba por contribuir no aumento da miséria, em um mundo já devastado pela má distribuição de renda. O uso de agrotóxicos e fertilizantes no cultivo das culturas, além de onerar o processo, contribui para a poluição do solo, dos corpos d'água e pode causar diversos danos à saúde consumidores destes produtos (GARNETT, 2013). Dessa forma novas alternativas que visem aumentar a produtividade agrícola e diminuir os impactos ambientais devem ser pesquisadas.

Os micro-organismos representam a mais antiga e numerosa forma de vida da terra. O estudo da genômica deste grupo oferece indícios sobre processo evolutivo frente às mudanças no ambiente que ocorrem ao longo dos anos. Alterações enzimáticas e formação de biofilmes são exemplos de mecanismos adaptativos que contribuem para a sobrevivência destes seres em diferentes ambientes (MARTINS, MARTINS, 2013).

O uso de micro-organismos ao longo da história da humanidade propiciaram o desenvolvimento de inúmeros produtos e processos que são largamente utilizados na indústria. Fármacos, insumos químicos e produtos de gênero alimentar são exemplos de possibilidades que esses seres podem oferecer (TORTORA, FUNKE, CASE, 2012). Da mesma forma que os micro-organismos contribuem para o desenvolvimento industrial, estes podem contribuir para o desenvolvimento de uma agricultura eficiente e sustentável (JHA et al, 2013).

Melhorar a fertilidade do solo e a produtividade das culturas reduzindo os impactos negativos dos fertilizantes químicos no ambiente é algo imprescindível

para a agricultura moderna. Ao longo das últimas décadas tem se observado um constante interesse pelo estudo de micro-organismos do solo que contribuam de alguma forma para atividade agrícola, contribuindo para o desenvolvimento e sustentabilidade da agricultura (HUNGRIA, ARAÚJO, 1994; GRANQVIST et al, 2015).

Rizobactérias promotoras de crescimento vegetal e bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio são alternativas no atendimento destas necessidades (BABALOLA, 2010). A interação entre bactérias diazotróficas e leguminosas é um exemplo de associação biológica intensamente estudada, cujos benefícios para a sustentabilidade da agricultura são bem conhecidos, principalmente em função do processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) e seus efeitos sobre o crescimento e produção das plantas hospedeiras (SILVA et, 2012).

A interação entre rizobactérias e plantas é de fundamental importância agrônômica e ambiental, pois torna possível a produção de culturas em solos deficientes de nitrogênio, por meio da diminuição ou até mesmo ausência do fornecimento de fertilizantes nitrogenados (RABLEDO et al, 2012).

A simbiose é iniciada pela formação de nódulos na raiz em resposta a presença da bactéria. As bactérias penetram no córtex, induzem a formação de nódulos na raiz, multiplicam-se e subsequentemente distinguem-se em bacteróides que produzem o complexo enzimático da dinitrogenase. Dentro dos nódulos radiculares, a planta cria uma concentração de oxigênio baixa, o que permite que a enzima produzida pela bactéria converta o nitrogênio atmosférico em amônia. Em contrapartida a planta supre a bactéria com uma fonte de carbono (BLOEMBERG, LUGTENBERG et al, 2001).

A produção auxinas como o ácido indol-3-acético (AIA) é outro exemplo de efeito benéfico que determinadas bactérias podem apresentar e que pode afetar o crescimento e desenvolvimento das plantas. Este fito hormônio promove efeitos no sistema radicular aumentando a área da raiz, o qual é importante para

a absorção de água e nutrientes, também pode contribuir para o crescimento de gemas apicais no caule e na raiz favorecendo o desenvolvimento da planta. A mesma retribui com um exsudato rico em nutrientes e um abrigo ideal para as bactérias proporcionando uma interação simbiótica entre a planta e o micro-organismo (DUCA et al, 2014).

Assim, este trabalho avaliou parâmetros indicadores da eficiência de isolados de plantas de arroz de sequeiro (*Oryza sativa*) quanto à sua capacidade e eficiência na formação de biocompostos com atividade para favorecer o crescimento das plantas. Foram avaliados parâmetros como crescimento celular, proteínas totais, produção de biofilme, viabilidade celular em biofilme, produção de AIA, testes de germinação e caracterização genética através da amplificação da região espaçadora intergênica (IGS).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar fenotipicamente bactérias isoladas das raízes de arroz de sequeiro com ênfase na formação de biofilme, produção de AIA e promoção de crescimento vegetal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar a curva de crescimento bacteriano e produção de proteínas totais pelas estirpes nos meios de cultura RDM (*Rhizobium defined medium*), YM (*yeast manitol*) e CB (caldo batata);

Determinar o índice de formação de biofilme e viabilidade das células associadas em três meios de cultura: RDM, YM e CB;

Avaliar o perfil de produção do ácido indol-3-acético (AIA) pelas estirpes estudadas;

Caracterizar genotipicamente as estirpes pela análise da região espaçadora intergênica (16-23S rDNA);

Verificar o potencial de promoção do crescimento vegetal pelas estirpes com maiores índices de formação de biofilme e produção de AIA.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 BACTÉRIAS DO SOLO FIXADORAS DE NITROGÊNIO

O nitrogênio é um elemento químico fundamental para o desenvolvimento dos organismos vivos, pois está diretamente ligada a síntese celular de aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos, clorofila e ao crescimento e produção de alimento por parte das plantas (HAYAT et al, 2010). Contudo grande parte deste elemento está na forma gasosa, inacessível para animais e vegetais (HUNGRIA, ARAÚJO, 1994).

A habilidade de converter nitrogênio atmosférico em compostos metabolicamente úteis é observada para algumas classes de bactérias e algas, podendo ser observadas no solo ou na rizosfera por meio de relações simbióticas ou associativas (MOREIRA et al, 2008). Bactérias fixadoras de nitrogênio pertencem na sua maior parte ao filo Proteobactéria e às classes Alfaproteobactéria, Betaproteobactéria, Gammaproteobactéria, Deltaproteobactéria e Epsilonproteobactéria (ROCHA, 2007).

Bactérias que colonizam a rizosfera são chamadas de rizobactérias as quais também são definidas como rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (CARVALHO et al, 2014). Algumas bactérias promotoras de crescimento vegetal são diazotróficas e possuem a habilidade de desenvolver associações com diferentes plantas inclusive gramíneas (SANTI, BOGUSZ, FRANCHE, 2013). Estes organismos ocupam nichos distintos, podendo dessa forma ser divididos em três grupos, os quais se diferenciam pelo tipo de interação bactéria/planta (VAN-DEN-BOS, ROELVINK, 1990).

No primeiro grupo estão os organismos de vida livre, que fixam nitrogênio de forma associativa com as raízes, sendo encontradas aderidas à superfície do tecido da raiz, dentro deste grupo, destacam-se: *Klebsiella*

pneumoniae e *Azotobacter vinelandii* (VAN-DEN-BOS, ROELVINK, 1990; SANTI, BOGUSZ, FRANCHE, 2013).

No segundo grupo estão os micro-organismos não simbióticos, bactérias diazotróficas endofíticas, que contribuem para o desenvolvimento das plantas sem a formação de estruturas diferenciadas, destacando-se neste grupo os gêneros *Azospirillum*, *Gluconacetobacter* e *Herbaspirillum* (MOURE et al, 2012).

No terceiro grupo estão micro-organismos diazotróficos simbiotes que dependem de uma íntima interação com o hospedeiro vegetal para promover sua sobrevivência, tais como às pertencentes aos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* (MOURE et al, 2012).

Estas bactérias têm a capacidade de promover na planta o aumento das taxas de germinação, aumento da biomassa da área foliar, caule, raízes e pelos radiculares e foliares, nos teores de clorofila, nitrogênio, proteínas, favorece a atividade hidráulica e na lignificação de vasos de xilema (JHA et al, 2013; BARRETTI, SOUZA, POZZA, 2008).

Bactérias associadas às plantas podem promover o desenvolvimento das mesmas, por meio da produção de biofertilizantes, da fixação biológica de nitrogênio, produção de fito hormônios, produção e solubilização de fosfatos, ou indiretamente através da indução de resistência a patógenos (BARRETTI, SOUZA, POZZA, 2008; BLOEMBERG, LUGTENBERG et al, 2001).

A habilidade das rizobactérias em controlar ou induzir a resistência a patógenos está relacionada a mecanismos como a competição por nutrientes, nicho de exclusão, resistência sistêmica induzida e produção de metabólitos antifúngicos. Várias rizobactérias têm a capacidade de induzir um estado de resistência sistêmica em plantas, o qual fornece proteção contra um largo espectro de organismos fito patogênicos, incluindo fungos, bactérias e vírus (BLOEMBERG, LUGTENBERG et al, 2001).

Bactérias como, por exemplo, as da família *Rhizobiaceae* estão presentes no solo e podem sobreviver desde um ambiente rico em nutrientes e exsudatos radiculares, a solos deficientes em nitrogênio, fósforo e água (RINALDI et al, 2010). Essas bactérias conseguem responder a variações na disponibilidade de nutrientes pela formação de biofilmes, fato que permite a sua sobrevivência até a colonização da planta hospedeira (RINAUDI et al, 2006; RINALDI et al, 2010). Para bactérias associativas a formação de biofilme e a consequente produção de polissacarídeos de superfície, exopolissacarídeos e lipopolissacarídeos são fundamentais na colonização da superfície da raiz (SANTI, BOGUSZ, FRANCHE, 2013). Outro fator que contribui para a sobrevivência destas bactérias no solo é a sua capacidade de habitar a rizosfera de diferentes tipos de plantas (DOWNIE, 2010).

Rizobactérias além de possuírem um importante papel na fixação biológica de nitrogênio, possuem um potencial ainda inexplorado para a degradação de substâncias aromáticas, tais como, fenóis e derivados. Tal capacidade está relacionada à exposição natural destas bactérias a uma gama de exsudados aromáticos secretados pelas raízes das plantas (MARTINS, MARTINS, 2013).

A fixação biológica de nitrogênio em monocotiledôneas é realizada pelo processo associativo. Particularmente em gramíneas, tais como arroz, Santi e colaboradores, (2013) reportam cepas de *Azoarcus* como colonizadora da superfície de suas raízes, as quais realizam o processo de fixação biológica de nitrogênio.

Santi e colaboradores, (2013) também reportam que a colonização simbiótica realizada por rizóbios em plantas não leguminosas é conhecida apenas para espécies de *Parasponia*, família *Cannabaceae*.

3.2 AGRICULTURA SUSTENTÁVEL

Andreola e Ferandes (2007), em seu trabalho definem os parâmetros para uma agricultura sustentável, a qual deve transmitir a longo prazo a manutenção dos recursos naturais e da produtividade agrícola, o mínimo de impactos adversos ao ambiente, um retorno adequado aos produtores, a otimização da produção com o mínimo de recursos externos e satisfação das necessidades humanas, atuais e futuras, no âmbito de alimento e renda.

Técnicas sustentáveis de cultivo, tais como o poli cultivo, sistemas agroflorestais, rotação de culturas, cultivos de cobertura, cultivo mínimo, uso de composto e esterco, adubação verde, reciclagem da matéria orgânica promovem diversos benefícios ao meio ambiente como um todo. Entre os benefícios que podem ser observados com a adoção de técnicas sustentáveis está à reciclagem de nutrientes, melhora da microbiota local, diminuição de patógenos e insetos-praga, conservação da fertilidade do solo e qualidade da água (ANDREOLA, FERNANDES, 2007).

O nitrogênio, após a água, é um dos fatores limitantes e que norteiam a produção vegetal. Culturas de grãos, tais como, arroz e milho necessitam de cerca de 20 a 40 kg de nitrogênio por tonelada de grão produzido a fim de se obter uma produção adequada (ORR et al, 2011).

A utilização de fertilizantes nitrogenados implica em um alto custo econômico e ambiental, estima-se que a síntese de uma tonelada de amônia consuma seis barris de petróleo, o que torna o processo dispendioso. Ambientalmente observa-se a eutrofização de lagoas, acidificação do solo, perda de oligonutrientes, liberação de metais pesados do solo para os sistemas aquíferos, aumento do efeito estufa e mudanças no ciclo global de nitrogênio (NEIVERTH, 2012).

Em climas tropicais, a agricultura é mais dependente de fertilizantes nitrogenados, devido à grande quantidade de chuvas e a rápida decomposição da matéria orgânica. Esses fatores resultam na rápida perda de nitrogênio por lixiviação, desnitrificação e imobilização microbiana (SALA, SILVEIRA, CARDOSO, 2007).

A utilização de bactérias promotoras de crescimento vegetal é uma alternativa viável ao uso de fertilizantes químicos nitrogenados, uma vez que esse processo consome ATP (adenosina trifosfato) ao invés de derivados de petróleo na produção de amônia. Sendo dessa forma um processo renovável, de baixo custo e que não provoca impactos ambientais (ROCHA, 2007).

Rizobactérias promotoras de crescimento vegetal constituem um amplo grupo de micro-organismos, uma vez que essa definição englobe todas as bactérias que vivem na rizosfera e afetem benéficamente o crescimento de uma ou mais espécies vegetais (FREITAS, 2007).

Inúmeros trabalhos vem relatando o uso de bactérias fixadoras de nitrogênio para a produção de inoculantes agrícolas, a fim de se obter uma agricultura sustentável e eficiente no cumprimento de seus objetivos (CHUEIRE et al, 2003; FREITAS, 2007; TOLEDO, MARCONDES, LEMOS, 2009; OLIVEIRA et al, 2012)

No Brasil a legislação prevê que somente podem ser comercializados inoculantes produzidos com estirpes recomendadas pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). A Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO) através da coleção de culturas de rizóbios é a responsável por prover à indústria de inoculantes as estirpes recomendadas pelo órgão controlador (OLIVEIRA et al, 2012).

Os inoculantes bacterianos geralmente são aplicados na forma de revestimento nas sementes. Após a semeadura as bactérias inoculadas devem ser capazes de se estabelecer na rizosfera em densidades populacionais satisfatórias,

fazer uso dos nutrientes liberados pelas raízes das plantas, proliferarem, serem capazes de colonizar de forma eficiente o sistema radicular da planta e competir com micro-organismos endógenos, de forma a produzir o efeito benéfico desejado (BLOEMBERG, LUGTENBERG et al, 2001).

O maior exemplo de aplicação de inoculantes está na cultura de soja, com mais de 95% do mercado. Estirpes de diferentes gêneros de rizóbios, também vem sendo selecionadas para o uso em mais de 90 diferentes espécies de leguminosas utilizadas para adubação verde, forrageiras, espécies arbóreas e gramíneas (OLIVEIRA et al, 2012).

3.3 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

Visto que nitrogênio é um nutriente essencial para todos os organismos vivos e necessários para a produção e qualidade das plantas na agricultura, faz-se necessário técnicas que maximizem sua presença no solo (SMIL, 1997).

O nitrogênio disponível no solo, proveniente da decomposição de plantas e animais, é na grande maioria das situações, insuficiente para uma agricultura intensiva. Dessa forma intervenções são necessárias para promover o enriquecimento do solo com este nutriente, a fim de aumentar os níveis e a qualidade do plantio (SMIL, 1997).

Dessa forma a fixação biológica de nitrogênio promovida por algumas classes de organismos procariontes é fundamental para reduzir os impactos na atividade agrícola (RASHID, et al, 2014).

Em torno das raízes das plantas há uma área definida como rizosfera, um interface solo/planta que consiste no solo aderido a raiz além do solo circundante, região na qual estão presentes em abundância uma grande quantidade de micro-organismos, que se beneficiam dos nutrientes secretados pelas mesmas (BABALOLA, 2010).

Na rizosfera há grande concentração de compostos orgânicos proveniente das plantas, os quais são provenientes do processo de rizodeposição. Entre esse exsudatos estão carboidratos, ácidos orgânicos, poliamidas, vitaminas, aminoácidos e derivados fenólicos, os quais contribuem para o desenvolvimentos dos micro-organismos (SANTOS, REIS, 2008).

Ácidos orgânicos e carboidratos são excretados por exsudação, secreção e autólise de raízes mais velhas. Compostos como celulose, lignina e proteínas são expelidos a partir de esfoliação celular e poda radicular (BABALOLA, 2010).

A fixação biológica de nitrogênio promovida pela simbiose entre plantas leguminosas e bactérias fixadoras de nitrogênio está entre as formas mais interessantes de mutualismo (MADIGAN et al, 2010). Rizóbios interagem com as leguminosas provocando uma infecção, que resulta na formação e desenvolvimento de estruturas anatômicas altamente especializadas na raiz principal e lateral, estas estruturas são denominadas de nódulos Figura 01.

Leguminosas podem desenvolver dois tipos diferentes de nódulos, os determinados e os indeterminados. Nódulos determinados são esféricos devido desenvolvimento do meristema esférico temporário, esse tipo de formação é observado em espécies de *Bradyrhizobium*. Os nódulos indeterminados são alongados, por causa da presença de um meristema persistente localizado no seu ápice, tal estrutura é formada devido ao rápido crescimento de espécies como *Rhizobium leguminosarum* e *Sinorhizobium meliloti* (FUJISHIGE et al, 2006).

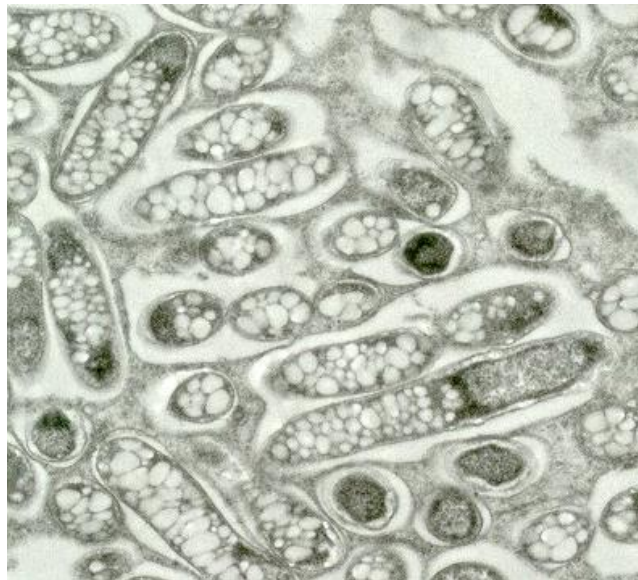
Figura 01 – Nódulos fixadores de nitrogênio formados por rizóbios em plantas leguminosas.



Fonte: (DENARDIN, 2007)

Ao colonizarem a raiz há a formação de nódulos os quais consistem principalmente de células bacterianas que se diferenciam em bacteroides Figura 02 (FUJISHIGE et al, 2006; SANTOS, REIS, 2008). A infecção pelo rizóbio e o desenvolvimento de nódulos são resultado de uma cascata complexa de comunicação entre as duas espécies participantes (STAEHELIN et al, 1995).

Figura 02 – Microscopia eletrônica de nódulos formados por bacteroides de *Rhizobium* em raízes de feijoeiro.



Fonte: (LODWING et al, 2003)

O processo simbiótico inicia-se com um diálogo molecular, onde as plantas liberam uma série de sinais na rizosfera, e atraem os micro-organismos

pelo processo denominado quimiotaxia (SANTOS, REIS, 2008). Esses compostos, denominados de flavonoides induzem nas bactérias a expressão de genes *nod*, que estão envolvidas na síntese e secreção de moléculas de sinal conhecidas como fatores Nod (RABLEDO et al, 2012).

Vários tipos de polissacarídeos de superfície, incluindo exopolissacarídeos, lipopolissacarídeos de superfície, polissacarídeos capsulares e β -glucanas cíclicas desempenham papéis importantes durante a infecção e formação dos nódulos (GONZETLEZ, YORK, WALKER, 1996; RINAUDI, GIORDANO, 2010; CASTELLANE, 2007).

Polissacarídeos capsulares formam uma camada coesa aderida à superfície celular, os lipopolissacarídeos encontrados na superfície externa tem a função de proteger à membrana, as β -glucanas cíclicas concentram-se no espaço periplasmático desempenhando importante papel na adaptação osmótica do micro-organismo e os exopolissacarídeos por sua vez formam uma camada protetora para as bactérias (SANTOS, REIS, 2008).

Segundo Rinaudi e Giordano (2010) o estabelecimento da simbiose entre a planta e a bactéria requer a formação do biofilme, sendo que essa particularidade um processo sequencial de desenvolvimento que culmina no estabelecimento das comunidades bacterianas.

As bactérias no processo associativo visam principalmente à assimilação de carbono e outros nutrientes para produção de entre outros compostos, energia na forma de ATP e moléculas nitrogenadas. Na planta hospedeira, as mudanças visam à incorporação da amônia produzida pelas bactérias (PEREIRA, 2008). A amônia é tóxica para a planta, dessa forma ela é rapidamente convertida em amidas ou ureídeos que são os responsáveis por nutrir a planta hospedeira (SANTOS, REIS, 2008).

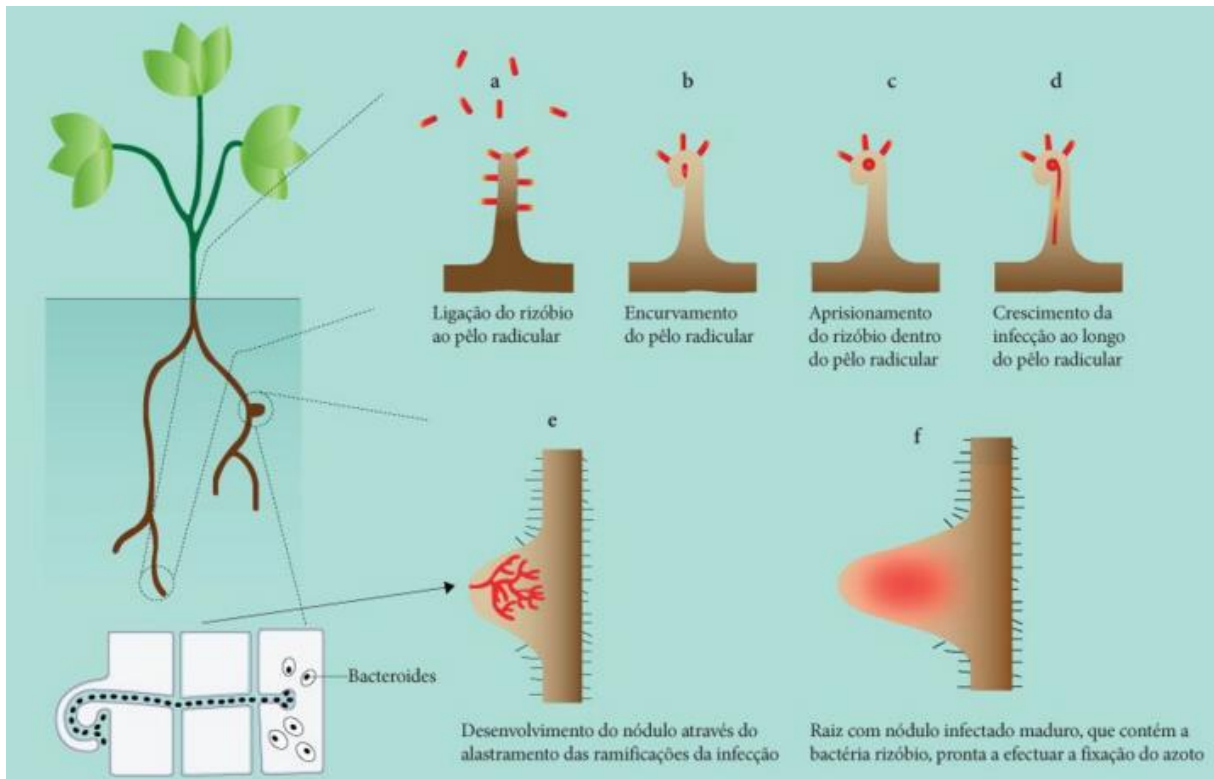
A interação entre hospedeiro e micro-organismo é fundamental para a fixação biológica de nitrogênio, pois a reação de produção de amônia pelas

bactérias é endergônica, ou seja, a amônia é mais rica em energia do que o nitrogênio atmosférico, dessa forma para que tal reação ocorra é necessário o fornecimento de energia, armazenada na forma de ATP pelas plantas (HOFFMANN, 2007).

A colonização das raízes por rizobactérias requerem duas etapas Figura 03. A fixação é a primeira etapa do processo, na qual é mediada por adesinas bacterianas ou lectinas vegetais. Na etapa subsequente ocorre o anexo secundário via fibrilas de celulose na superfície bacteriana. Em resposta, os pelos radiculares da raiz da planta se deformam e exibem uma ondulação acentuada típica para facilitar a penetração das bactérias (ROBLEDO et al., 2012).

Segundo Santos e colaboradores (2008), a etapa inicial se dá pela fraca adesão ao pelo radicular, sendo que esse processo é dependente do íon cálcio (Ca^{2+}) e mediado pela proteína ricadesina. Na segunda etapa Santos e colaboradores (2008), descrevem a síntese de celulose e fibrilas que resultam num tipo de biofilme na ponta das raízes da planta hospedeira.

Figura 03 – Representação do processo de infecção e produção de nódulos fixadores de nitrogênio por agro bactérias simbióticas.



Fonte: (FERNANDES e RODRIGUES, 2014)

A produção de lecitinas pela planta hospedeira também é descrita como fator importante no estabelecimento da simbiose, pelo fato de ajudarem na especificidade da comunicação entre os envolvidos. Tal proteína intermeia a ligação simultânea à parede celular da planta e a açucares na superfície bacteriana (SANTOS, REIS, 2008).

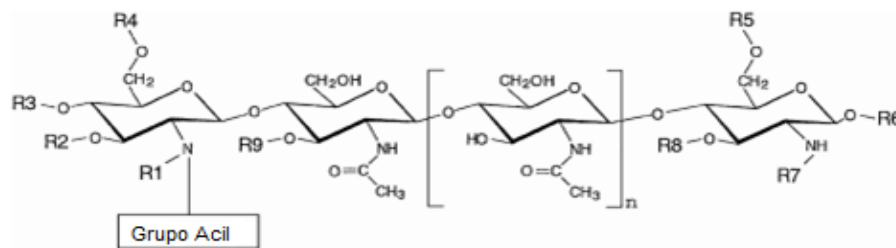
As bactérias são liberadas nas células corticais e envolvidas por membranas peribacteroides diferenciando-se em bacteroides. Cada passo deste estabelecimento é altamente controlado através de uma rede de sinais em cascatas entre a planta e o micro-organismo (SCHULZE et al., 1998; LONG., 2001)

O estabelecimento da relação entre o hospedeiro e as bactérias a nível molecular está ligada aos genes responsáveis pelo processo de fixação biológica de nitrogênio, genes *nif* e *fix*, e também aos genes responsáveis pelo processo de

nodulação, genes *nod*, *nol* e *noe* (PEREIRA, 2008). Na maioria das espécies de rizóbios os genes que controlam a nodulação, a especificidade hospedeira e a fixação de nitrogênio estão localizados no chamando plasmídeo simbiótico pSym (DÁVILA, 2005).

Segundo Mercante e colaboradores 2002, a etapa inicial da nodulação ocorre pela expressão dos genes *nod* na rizobactéria. A liberação de flavonoides pelas plantas ativa a expressão deste gene regulatório, formando a proteína NodD. O complexo NodD-flavonóide interage com uma região promotora conservada chamada de Nod boxes, a qual induz a transcrição dos genes de nodulação *nod A*, *B* e *C*. Os genes *nod A*, *B* e *C* estão presentes em todas as espécies de rizóbios, e são responsáveis pela biossíntese de moléculas de oligossacarídeos lipoquitinos chamados de fatores Nod. Os fatores Nod são constituídos por uma estrutura de oligossacarídeo onde o grupo acil é ligado ao nitrogênio do açúcar não redutor. A Figura 04 mostra a estrutura geral de um fator Nod.

Figura 04 – Estrutura geral de um fator Nod produzido por bactérias do gênero *Rhizobium*.



R1-R9 são grupos químicos substituintes que são observados para diferentes estirpes bacterianas.

A fixação biológica de nitrogênio é catalisada pela enzima complexo enzimático dinitrogenase. Essa enzima é um complexo de duas subunidades proteicas (metaloenzimas), uma enzima dinitrogenase e outra dinitrogenase redutase. Uma subunidade contém o íon Ferro e é chamada de Fe Proteína e a outra possui os íons ferro e molibdênio, sendo denominada de MoFe proteína (PETERS, FISHER, DEAN, 1995).

3.4 BIOFILME

Na natureza, os micro-organismos encontram-se em comunidades com diferentes graus de complexidade estrutural denominadas de biofilmes. Biofilmes são comunidades ou agregados microbianos envoltas por uma matriz polimérica de aspecto gelatinoso, aderida a uma superfície sólida biótica ou abiótica. São constituídos essencialmente por um ou mais tipos de micro-organismos, por suas substâncias poliméricas extracelulares auto produzidas e por água. Configuram uma estrutura complexa de micro colônias e canais verticais e horizontais que permitem o fluxo de fluidos, a dispersão de nutrientes e resíduos. (WIEDMANN, 2002; FREITAS, SAND, SIMONETTI, 2010; PLYUTA et al, 2013).

Do volume total do biofilme, 97% é composto pro água, em menor proporção estão exopolissacarídeos, proteínas, DNA e produtos de lise celular (RINAUDI et al, 2010).

Componentes da superfície bacteriana e componentes extracelulares, principalmente, lipopolissacarídeos, exopolissacarídeos e proteínas em combinação com fatores ambientais e sinais *quorum sensing* são cruciais para auto agregação e desenvolvimento do biofilme nas mais diversas espécies bacterianas (BOGINO et al, 2013).

A mudança de estilo de vida planctônico para biofilme é mediada por vários sinais ambientais, incluindo a disponibilidade de nutrientes, potencial osmótico e *quorum sensing* (FUJISHIGE et al, 2006).

Quorum sensing é definido como um mecanismo de comunicação através do qual bactérias regulam a expressão de genes especializados em resposta à densidade celular. O comportamento coletivo como resultado do *Quorum Sensing* permite comportamentos vantajosos para toda a população, como por exemplo a migração para ambientes com melhor oferta de nutrientes, a adoção

de modelos de crescimento, tais como, esporulação ou formação de biofilme (RUMJANEK, FONSECA, XAVIER, 2004).

Na formação do biofilme, o *quorum sensing* é ativado após a etapa de adesão e no início da formação de micro colônias. Com o aumento da densidade populacional o *quorum sensing* pode ser ativado de forma a ativar a maturação do biofilme e sua posterior desmontagem. A desmontagem do biofilme feita de forma coordenada em resposta ao *quorum sensing* é essencial para que as bactérias busquem um novo nincho quando os nutrientes e outros recursos se tornam limitados (SOLANO, ECHEVERZ, LASA, 2014).

A estrutura organizacional na forma de biofilme confere maior estabilidade e resistência às agressões ambientais, a agentes antimicrobianos, proteção contra radiação UV, mudanças de pH, estresse osmótico e dessecação, possibilitando a sobrevivência em ambientes hostis (MARTINS, MARTINS, 2013; RINAUDI, GIORDANO, 2010).

Os biofilmes desempenham um importante papel na natureza e em processos tecnológicos. Do ponto de vista do interesse do homem estes podem apresentar características que os tornam benéficos ou prejudiciais (CHAVES, 2004).

De forma negativa, os biofilmes podem estar presentes em diversos ambientes, em ambientes médicos podem causar infecções persistentes e recorrentes, na indústria podem causar incrustações em sistemas de distribuição de água e contaminação de alimentos (PEETERS et al, 2008).

Como exemplo de biofilmes benéficos se destacam os que se desenvolvem em associação com as raízes de algumas plantas fornecendo lhe nutrientes e também os usados em biotecnologia ambiental, no tratamento de efluentes (CHAVES, 2004).

Os biofilmes são a estratégia de vida mais comum para as bactérias em ambientes naturais, incluindo na rizosfera (FUJISHIGE et al, 2006). Rizobactérias, como muitas outras bactérias do solo, persistem na natureza provavelmente nestas comunidades sésseis, que são na maioria das vezes composta de múltiplas espécies (RINALDI et al, 2006).

A capacidade de espécies bacterianas de se coordenarem como biofilme, atribui a elas características de um organismo multicelular, trazendo vantagens para a população bacteriana como um todo. As células bacterianas que vivem em biofilmes tem maior resistência a vários agentes antimicrobianos e estão melhor adaptadas a sobreviver a períodos de estresse ambiental (STANLEY, LAZAZZERA, 2004).

A formação e o desenvolvimento do biofilme se dão em resposta a estímulos ambientais específicos, como por exemplo, a disponibilidade de nutrientes, temperatura, pH, força iônica, velocidade de escoamento, tipo e rugosidade do material, presença de material particulado, de micronutrientes e agentes antimicrobianos. Contudo esse processo é estritamente dependente do tipo de micro-organismo em questão (O'TOOLE, KAPLAN, KOLTER, 2000; CHAVES, 2004).

A produção de polissacarídeos pelas bactérias é fundamental para o estabelecimento da simbiose. Rizobactérias possuem a capacidade de síntese de diferentes polissacarídeos, entre eles lipopolissacarídeos, polissacarídeos capsulares e polissacarídeos extracelulares. Tais moléculas são utilizadas no reconhecimento do hospedeiro (SANTOS, REIS, 2008).

Estudos indicam que os biofilmes são um ponto estável em um ciclo biológico, e sua formação inclui os estágios de iniciação, maturação, manutenção e dissolução (O'TOOLE, KAPLAN, KOLTER, 2000).

A formação do biofilme é regulada em quatro etapas principais, sendo elas, a fixação na superfície, formação de micro colônias, desenvolvimento

estrutural e arquitetura do biofilme. Os passos iniciais são regulados por sinais que diferem entre as espécies bacterianas e refletem o habitat natural em que as bactérias estão localizadas. Os passos posteriores de maturação, controle de profundidade e arquitetura do biofilme, são regulados por sinais conservados, refletindo a fisiologia da células (STANLEY, LAZAZZERA, 2004).

No estado inicial de adesão de células isoladas a uma determinada superfície, a hidrofobicidade da membrana celular, aliada à capacidade de autogregação e produção de exopolissacarídeos são fatores primordiais que norteiam essa etapa (MARTINS, MARTINS, 2013).

Após a formação das micro colônias a produção de sinais de *quorum sensing* são requeridos para formação de um biofilme maduro (BOGINO et al, 2013). A profundidade do biofilme maduro é regulada para permitir a máxima aquisição de nutrientes (STANLEY, LAZAZZERA, 2004).

A formação de biofilme pode ser inibida por repressão catabólica, possivelmente como um indicador de que as células estão em um ambiente rico em nutrientes, não sendo necessária a formação do biofilme, pois em modo planctônico há uma maior área de superfície de células expostas aos nutrientes (STANLEY, LAZAZZERA, 2004).

Os ensaios para quantificação de biofilme em microplacas podem ser classificados em três diferentes classes. Ensaios de biofilme biomassa os quais são baseados na quantificação da matriz, células vivas e mortas. Ensaios de viabilidade com base na quantificação células viáveis e ensaios de quantificação de matriz baseado na coloração específica dos componentes da matriz (PEETERS, HANS, COENYE, 2008).

3.5 EXOPOLISSACARÍDEOS

Os biopolímeros de origem microbiana são polissacarídeos, sintetizados por bactérias, fungos e leveduras. Esses polissacarídeos de cadeia complexa também são conhecidos como gomas devido a sua capacidade de formar soluções viscosas e géis em meio aquoso (BARRETO et al., 2011). Estes biopolímeros são objetos de pesquisa, tendo em vista seu elevado potencial de aplicação em diferentes setores (SILVA et al., 2006; MONTEIRO et al, 2012).

Os exopolissacarídeos podem ser solúveis e insolúveis em meio aquoso e são classificados como homo e heteropolissacarídeos. Os homopolissacarídeos são na grande maioria glucanas neutras, enquanto os hetero polissacarídeos são polianiônicos devido à presença de ácido urônico (ARANDA-SELVERIO et al, 2010).

Os polissacarídeos microbianos juntamente com ácidos nucleicos e proteínas, determinam a funcionalidade e especificidade de uma espécie (MONTEIRO et al, 2012). Os polissacarídeos podem ser divididos em duas classes: polissacarídeos capsulares os quais se encontram dentro da célula e exopolissacarídeos (EPS) presentes na parte externa da mesma (MISHRA, JHA, 2013).

Segundo Aranda-Selverio e colaboradores (2010), as características físico-químicas dos polissacarídeos estão estritamente relacionadas com a sequência em que os açúcares estão dispostos na molécula, da presença de resíduos iônicos e da forma com que as cadeias se entrelaçam. Os EPS são constituídos por unidades repetidas de açúcares, e podem estar associados com as proteínas, lípideos, compostos orgânicos e inorgânicos, íons metálicos e DNA (MISHRA, JHA, 2013).

Os polímeros de uso comercial podem ser de origem vegetal, tais como algas (alginato, ágar, carragena), de sementes (gomas guar e locusta), exsudados

de árvores (gomas arábica e karaya) e produtos de biossíntese microbiana (gomas xantana, gelana, dextrana, curdlana) (SOUZA, CRUZ, 2004).

Um grande número de bactérias tem a capacidade de sintetizar excretar polissacarídeos extracelulares. Estes complexos carboidratos variam amplamente em termos de estrutura e função (STAUDT, LAWRENCE, SHROUT, 2012).

Segundo Chaves, 2004, a matriz polimérica é responsável pela morfologia, estrutura, coesão e integridade funcional dos biofilmes e sua composição determina a maioria das propriedades físico-químicas e biológicas desta estrutura.

Rizóbios produzem vários polissacáridos de superfície que são fundamentais para a formação do biofilme e conseqüentemente para o estabelecimento da simbiose. Alguns destes polissacarídeos são específicos para o seu crescimento em pelos radiculares e pode aumentar consideravelmente a sua capacidade de infecção de leguminosas (DOWNIE, 2010; SILVA, LIMA-FILHO, 2011).

Essa diversidade aliada à composição química resulta em uma variedade de propriedades que não são encontradas nos polissacarídeos de origem vegetal. Os EPS microbianos são considerados alternativas ideais para os polissacarídeos de origem vegetal, pois uma vez que estabelecida as melhores condições de cultivo as moléculas produzidas apresentaram características químicas e físicas constantes (ARANDA-SELVERIO, 2010).

Devido a essas características físicas e reológicas, os EPS são amplamente usados na indústria de alimentos no aumento da viscosidade, como estabilizantes, gelificante e agentes emulsificantes (DAHECHA et al., 2013; YILDIZ et al., 2014).

A produção de EPS, suas propriedades físico-químicas e constitucionais dependem das condições de cultivo das culturas bacterianas e do fornecimento de nutrientes (MENESES *et al.*, 2009).

Assim pesquisas sobre a produção de EPS em condições rotineiras de laboratório podem representar uma alternativa de obtenção de EPS com baixo custo de produção (FERNANDES *et al.*, 2010).

3.6 AUXINAS

Uma alternativa química para regular o crescimento de plantas e conseqüentemente conseguir alta produção agrícola é através do uso de fito hormônios. Dentre esses compostos destacam-se as auxinas, citocininas e as giberilinas (NETO *et al.*, 2004).

Estes compostos são aplicados de forma exógena durante o cultivo de diferentes culturas de plantas. As concentrações utilizadas destes fitorreguladores exógenos variam entre 1,0 e 10,0 μM , concentrações muito elevadas se comparadas às concentrações dos fito hormônios produzidos de forma endógena pela planta (CHEN *et al.*, 2010).

As auxinas destacam-se dentro do grupo de reguladores de crescimento. Esses compostos são um tipo de hormônio vegetal produzido pelas plantas e que são utilizados na transdução de sinal intracelular e intercelular. As auxinas estão envolvidas em processos de desenvolvimento, incluindo divisão e diferenciação celular, fototropismo, gravitropismo, dominância apical e diferenciação vascular (SUGAWARA *et al.*, 2009).

A presença de auxinas provocam alterações morfológicas, tais como, o aumento do comprimento da raiz, o número de pelos radiculares e raízes laterais. Esses compostos estimulam na planta respostas rápidas, como o aumento do

alongamento celular e respostas lentas entre elas a divisão e diferenciação celular (BONILLA, 2011).

A divisão celular, a diferenciação e formação de feixe vascular são eventos induzidos por auxinas, mas que também são observados no processo de nodulação, o que pode indicar uma estrita correlação entre as auxinas e o tal processo (SPAEPEN, VANDERLEYDEN, REMANS, 2007).

O ácido indol-3-acético (AIA) é a auxina natural mais abundante e estudada atualmente. Ela atua como uma molécula de sinalização e é um regulador chave, exercendo inúmeros papéis no desenvolvimento da planta (SUGAWARA *et al*, 2015).

Em dicotiledôneas AIA induz especificamente a formação de raízes laterais, enquanto que em monocotiledôneas ele induz a formação de raízes adventícias. Em árvores coníferas e angiospermas AIA promove o aumento da espessura da parede secundária e o tamanho das células do xilema (DUCA *et al*, 2014).

A inoculação de plantas leguminosas com rizobactérias é um dos principais métodos biotecnológicos de utilização de micro-organismos em plantas visando à fixação biológica de nitrogênio na agricultura, e tais bactérias podem também agir como uma alternativa para o uso de fito hormônios sintéticos, as quais possuem a capacidade de produzir hormônios, vitaminas e fatores de crescimento que auxiliam no desenvolvimento de diferentes tipos de plantas ((STROSCHEIN *et al*, 2011; DIMKPA *et al*, 2012).

Essas bactérias exercem efeitos positivos diretos e indiretos no desenvolvimento das plantas. Diretamente se observa o aumento da solubilização e entrada de nutrientes e a produção de reguladores de crescimento vegetal. Indiretamente se observa a supressão de patógenos devido à produção de antibióticos (KUSS *et al*, 2007).

A produção de AIA por bactérias vem sendo relatada em diversos estudos (PRINSEN et al, 1991; KUSS et al, 2007; TSAVKELOVA et al, 2012). Existem duas vias de biossíntese propostas para AIA, Uma via dependente de triptofano e outra independente deste aminoácido. Na via dependente de triptofano diferentes caminhos vem sendo postuladas, entre eles destacam-se a via indol-3-acetamida (IAM), via do ácido indol-3-pirúvico (AIP), via triptamina (TAM), e a via indol-3-acetaldoxima (IAOx) sendo as duas primeiras as mais observadas (MANO, NEMOTO, 2012; BARTEL, 1997; DUCA *et al*, 2014).

Em cepas de *Azospirillum* em interação com gramíneas Kuss e colaboradores (2007) relatam a produção de AIA por diferentes vias, sendo que 90% do fito hormônio produzido por essa cepa vem de vias independentes da adição de triptofano.

Na via indol-3-acetamida (IAM) ocorre uma reação de dois passos, onde o triptofano é inicialmente convertido a IAM pela enzima triptofano monooxigenase a qual é codificada pelo gene *AUX1*. Posteriormente há a conversão do IAM para AIA em uma reação catalisada pela enzima indol-3-acetamida hidrolase codificada pelo gene *AUX2* (BARTEL, 1997; RADWANT, MOHAMED, REIS, 2005; (DUCA *et al*, 2014).

Na via do ácido indol-3-pirúvico (AIP) inicialmente, o triptofano é desaminado a AIP por uma aminotransferase codificada pelo gene *TAA1*. Subsequentemente, a enzima indol-3-piruvato descarboxilase, codificada pelo gene *ipdC*, converte AIP a indol-3-acetaldeído, o qual é então oxidado a IAA por aldeído desidrogenase mutase ou pela enzima indol-3-acetaldeído oxidase codificada pelo gene *AAO1* (RADWAN, MOHAMED, REIS, 2004; TSAVKELOVA et al, 2012).

Na via de produção Triptamina (TAM), a enzima citosólica triptofano descarboxilase codificada pelo gene *TOC* converte a molécula de triptofano a

triptamina (TAM). Posteriormente uma enzima oxidase converte TAM a indol-3-acetaldeído, o qual é convertido a AIA pela ação da enzima Acetaldeído Desidrogenase (BARTEL, 1997).

A via de síntese de AIA por indol-3-acetaldoxima é observada com maior frequência em plantas. Esta é codificada pelos genes *CYP79B2* e pelos genes *CYP79B3*. Nesta via o triptofano é inicialmente convertido a indol-3-acetaldoxima (IOAx) por uma enzima Oxireductase. Subsequentemente a enzima Indol Acetaldoxima Disidratase catalisa a conversão do IOAx ao composto indol-3-acetonitrila, o qual é convertido a AIA por uma enzima nitrilase (KOBAYASHI et al, 1993; SUGAWARAA et al, 2009, BONILLA, 2011; DUCA et al, 2014).

A quantidade de AIA produzida pelas bactérias é influenciada por entre outros fatores pela localização dos genes responsáveis por sua biossíntese (BRANDLAND, LINDOW, 1996).

As localizações dos genes responsáveis pela síntese em plasmídeos ou nos cromossomos modulam o nível de AIA produzido. Nos plasmídeos geralmente presentes em várias cópias na célula proporcionam um elevado número de genes para biossíntese de AIA que podem ser mais facilmente transcritos em relação aos localizados no cromossomo. Fato que pode ser observado em cepas do fitopatógeno *Pseudomonas savastanoi* que possui genes biossintéticos produtores de AIA localizado no plasmídeo e que consequentemente produz significativamente mais AIA do que cepas de *P. syringae* cujos genes homólogos estão localizados nos cromossomos (SPAEPEN, VANDERLEYDEN, REMANS, 2007).

Fatores abióticos como pH, estresse osmótico, variações na concentração de oxigênio, temperatura, limitação de carbono e presença de extratos de plantas influenciam na produção de AIA. Foi observado que em cepas de *Azospirillum*

brasiliense a produção de AIA foi favorecida mediante a limitação da oferta de carbono e pH ácido (SPAEPEN, VANDERLEYDEN, REMANS, 2007).

A presença de compostos específicos tais como sais e vitaminas também influencia na quantidade de AIA produzido pelas bactérias. Por exemplo, em baixos níveis de vitaminas do complexo B, especialmente ácido nicotínico e piridoxina foi observado o aumento da biossíntese de AIA em cepas de *Azospirillum brasiliense* (DUCA et al, 2014).

A produção de AIA por vias bacterianas normalmente é observada em Rizobactérias promotoras de crescimento vegetal não simbióticas (BABALOLA, 2010). Contudo diferentes estudos vêm demonstrando a produção deste composto por bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio (KUSS et al, 2007), (SCHLINDWEIN et al, 2008).

A produção de fito hormônios por rizóbios durante o processo de nodulação vem sendo relatada como uma possível forma de estímulo ao crescimento vegetal (STROSCHEIN et al, 2011). PRINSEN e colaboradores (1991) observaram que na presença de flavonoides normalmente secretados pelas plantas durante o processo de nodulação ativam não somente a expressão de genes de nodulação (*nod*) na bactéria, mas também causam um significativo aumento na produção de AIA. (PRINSEN et al, 1991).

3.7 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA

O emprego de técnicas de biologia molecular, tais como a de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) vem sendo cada vez mais empregada no estudo da diversidade bacteriana. Inúmeros avanços foram observados na taxonomia e diversidade genotípica de bactérias da família *Rhizobiaceae* através do emprego de tais técnicas. (STRALIOTTO, RUMJANEK, 1999; FERNANDES, FERNANDES, HUNGRIA, 2003; ORRILLO et al, 2015).

A amplificação do DNA bacteriano através da reação em cadeia de polimerase associadas com a técnica de RFLP (Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição) permitem a ampliação de sequências definidas da molécula de DNA. De forma geral são amplificadas regiões de genes cromossômicos conservados, mas com variabilidade suficiente para detectar diferenças entre gêneros e espécies, entre esses genes estão 16S rDNA, 23S rDNA e Região Intergênica IGS (FERNANDES, FERNANDES, HUNGRIA, 2003).

A região espaçadora intergênica (IGS), corresponde ao intervalo entre os genes 16S e 23S rDNA. Essa região apresenta uma grande variabilidade e são úteis para identificar grupos genômicos no nível intra-específico. O estudo dessa região em particular, é uma forma confiável de investigar a diversidade entre as populações (BOURCIER et al, 2000).

Em contraste com outros genes do rDNA que são extremamente bem conservados em toda a maioria das espécies, a região intergênica exibe um elevado grau de variabilidade em tamanho e composição da sequência de pares de base, o que permite a discriminação entre espécies (TAN et al, 2001).

Estudos reportados por Straliozzo e colaboradores (1999) descrevem a amplificação da região IGS em bactérias do gênero *Rhizobium*, utilizando primers específicos, gerando um fragmento de cerca de 1350 pb.

A caracterização de estirpes através de genes conservados e simbióticos é fundamental para identificar rizóbios nativos e entender as relações entre planta e simbionte (TOLEDO, MARCONDES, LEMOS, 2009).

Dados levantados em estudos genéticos de populações de diferentes gêneros de rizobactérias, mostram o alto grau de diversidade genética deste grupo (CHAGAS JUNIOR, OLIVEIRA, OLIVEIRA, 2009).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Para a condução deste trabalho foram previamente selecionados, a partir de trabalhos anteriores, quinze rizobactérias isoladas de nódulos plantas de arroz de sequeiro (*Oryza sativa*) cultivado no cerrado goiano, obtidas a partir do isolamento em meio YM (*yeast manitol*) específico para bactérias da família *Rhizobiaceae*.

Os micro-organismos estão catalogados e estocados na coleção do Laboratório de Bioquímica da Universidade Estadual de Goiás, Campus de Ciências Exatas e Tecnológicas em Anápolis. Foram selecionados os isolados R5, R25, R30, R31, R40, R54, R58, R59, R65, R73, R80, R82, R127, R132 e R134.

Também foram utilizadas cinco estirpes controle obtidas junto a Embrapa Arroz e Feijão de Santo Antônio de Goiás, destas 4 bactérias do gênero *Rhizobium* BR322 (*Rhizobium tropici*), BR520 (*Rhizobium tropici*), BR10055 (*Rhizobium galegae*), CFN42 (*Rhizobium etli*), 1 do gênero *Mesorhizobium* BR522 (*Mesorhizobium mediterraneum*).

4.2 MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura que foram utilizados no trabalho nos diferentes estudos realizados estão listados na Tabela 01 juntamente com suas respectivas composições:

Tabela 01 – Meios de cultura utilizados no trabalho e suas respectivas composições.

Meio	Composição
YM (HUNGRIA, ARAUJO, 1994)	200 mg.mL ⁻¹ sulfato de magnésio 100 mg.mL ⁻¹ cloreto de sódio 500 mg.mL ⁻¹ extrato de levedura 10 g.L ⁻¹ manitol 500 mg.L ⁻¹ fosfato de potássio monobásico, pH 6,5
RDM (CASTELLANE, 2007)	100 mg.mL ⁻¹ sulfato de magnésio 1,1 g.L ⁻¹ glutamato de sódio 230 mg.L ⁻¹ fosfato de potássio monobásico 10 g.L ⁻¹ de sacarose, pH 6,5
CB (DOBEREINER, ANDRADE, BALDANI, 1999)	caldo cozido de 200 g de batata inglesa 2,5 g.L ⁻¹ ácido málico 2,5 g.L ⁻¹ açúcar cristal comercial 1 mL de solução de biotina 0,001 g.L ⁻¹ 2 mL de solução de micronutrientes (0,2 g.L ⁻¹ de molibdato de sódio, 0,235 g.L ⁻¹ de Sulfato de manganês, 0,28 g.L ⁻¹ de ácido bórico, 0,008 g.L ⁻¹ de sulfato de cobre e 0,024 g.L ⁻¹ de sulfato de zinco) , pH 6,8.

RDM = *Rhizobium defined medium*; YM = *yeast manitol*; CB = caldo batata.

4.3 MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS

A manutenção das cepas foi realizada conforme descrito por Silva e colaboradores (2008), com modificações. Inicialmente foram realizados repiques das cepas com intuito de se obter colônias isoladas. As cepas foram repicadas em meio sólido YM, pela técnica de esgotamento de estrias e as placas foram incubadas a 28 °C por 24 horas. Após o crescimento 3 a 5 colônias isoladas e típicas foram transferidas para frascos de penicilina estéreis contendo

10 mL de meio líquido YM. Os frascos com meios de cultura inoculados foram levados ao agitador e incubados a 28 °C por 24 horas.

Após crescimento em meio líquido, alíquotas de 1,5 mL do meio crescido foram transferidas para tubos de micro-centrífuga previamente esterilizados e rotulados e centrifugados a 13.000 RPM por 5 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi removido e as células ressuspendidas em solução glicérol 30%. Os tubos foram armazenados a 8 °C por sete dias e posteriormente congelados em freezer a - 40 °, sendo os estoques renovados a cada seis meses.

As cepas foram reativadas em meio sólido YM, pela técnica de esgotamento em placa. O estoque foi retirado do freezer e deixado na câmara de fluxo laminar até atingirem a temperatura ambiente. Foram pipetados 2 µL do estoque e colocados sobre a placa, as quais foram posteriormente semeadas com auxílio de alças de platina e em seguida incubadas a 28 °C por 24 horas.

4.4 CURVA DE CRESCIMENTO

As estirpes selecionadas foram caracterizadas quanto ao crescimento. Após o isolamento, colônias típicas foram transferidas para 5mL de solução fisiológica estéril 0,9% (SFE) e o inóculo ajustado com escala 0,5 McFarland a qual corresponde à aproximadamente $1,5 \times 10^8$ ufc.mL⁻¹.

Para a realização deste procedimento uma alíquota de 1,0 mL do pré-inóculo a $1,5 \times 10^8$ ufc.mL⁻¹ foi inoculado em 250 mL de cada meio de cultura estudado. As culturas foram crescidas sob agitação (140 rpm), sendo coletados alíquotas de 1,8 mL a tempos determinados de (0, 12, 24, 36, 48, 56 e 72 horas). A alíquota foi utilizada para a obtenção do número de células por meio da determinação da densidade óptica a 600nm (MENDRYGAL, GONZALEZ, 2000).

4.5 PROTEÍNAS TOTAIS

A concentração de proteínas totais nos meios de cultura analisados foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Bradford, (1976) com adaptações. Foram utilizadas microplacas de poliestireno para a realização dos testes.

A solução reagente de Bradford foi preparada solubilizando 10 mg do corante Azul de Comassie G250 em 5 mL de etanol. Posteriormente foram adicionados 100 mL de água Milli Q. Em banho de gelo foram adicionados lentamente 10 mL de ácido fosfórico 85%.

Alíquotas de 500µL das amostras das culturas bacterianas crescidas e coletadas na execução da curva de crescimento, foram tratadas com hidróxido de sódio 0,1mol.L⁻¹ na proporção de (1:1) e deixadas em repouso por 30 minutos para a obtenção das proteínas totais solúveis. Após a lise, 100 µL dos lisados foram transferidos para poços da microplaca, onde foram adicionados 100 µL do reagente de Bradford. A absorbância foi determinada a 595nm em leitora de microplaca.

A curva padrão foi preparada a partir de uma solução-mãe de soro albumina bovina (BSA) na concentração de 1mg/mL. As concentrações utilizadas para a produção da curva padrão foram de 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0 e 40,0; µg.mL⁻¹. Sendo obtida a seguinte equação da reta: $Y = 24,15x + 0,7557$ com coeficiente de correlação $R^2 = 0,9973$.

4.6 FORMAÇÃO DE BIOFILME

Para a avaliação da formação de biofilme com quantificação da biomassa total e viabilidade celular foram utilizados três meios de cultura: YM, RDM e CB.

Após o crescimento das estirpes, colônias típicas foram resuspendidas em 5mL de solução fisiológica estéril 0,9% (SFE) e o inóculo ajustado com escala 0,5 McFarland a $1,5 \times 10^8$ ufc.mL⁻¹. Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas para o ajuste do inóculo a $1,5 \times 10^5$ ufc.mL⁻¹.

A formação de biofilme foi realizada em duas microplacas de poliestireno, sendo uma para o teste de biomassa no biofilme e a outra para o teste de viabilidade no biofilme. Foram transferidos 100 µL do inóculo ajustado de cada linhagem bacteriana para os poços de cada placa, sendo as mesmas incubadas por 24 horas a 30 °C. Os testes foram realizados em triplicata biológica para cada um dos meios estudados.

4.6.1 Biomassa Total e Índice de Formação de Biofilme

O composto cristal violeta foi utilizado para corar a biomassa aderida ao poço da microplaca. Esse composto atua como um corante básico que se liga a moléculas carregadas negativamente e a polissacarídeos na matriz extracelular. Nesta técnica tanto as células vivas e mortas quanto a matriz ficam manchadas pelo corante, permitindo a quantificação da biomassa total produzida (PEETERS, HANS, COENYE, 2008).

Para o ensaio da formação de biomassa total, as placas foram tratadas segundo a metodologia descrita por Naves e colaboradores (2008). Após o período de incubação foi realizada a leitura da densidade óptica dos poços que compunham uma das placas a 630nm. Após o tratamento inicial anteriormente descrito o meio crescido foi removido, e cada poço foi lavado uma vez com 200 µL de solução fisiológica estéril para a remoção das células não aderidas.

Foram adicionados a cada poço da placa 100 µL de solução do corante cristal violeta (CV) 0,1%. O CV foi deixado em contato com o poço por 15 minutos, em seguida o corante foi removido e cada poço lavado com 200 µL de

água destilada por quatro vezes. As placas foram secas à temperatura ambiente por 15 minutos.

Posteriormente, 100 µL de álcool etílico absoluto foram adicionados em cada poço para a solubilização do CV aderido a matriz. A quantificação da biomassa foi realizada por meio da leitura da densidade óptica a 492nm e o cálculo do Índice de Formação de Biofilme de acordo com a Equação 2.

Equação 2: Fórmula para o cálculo do Índice de Formação de Biofilme (IFB).

$$IFB = \frac{Abs_{492} - AbsBr_{492}}{Abs_{630} - AbsBr_{630}}$$

(2)

Sendo:

Abs_{492} = Absorbância do poço a 492 nm;

Abs_{630} = Absorbância do poço a 630 nm;

$AbsBr_{492}$ = Absorbância do poço controle negativo a 492 nm;

$AbsBr_{630}$ = Absorbância do poço controle negativo a 630 nm.

4.4.2 Viabilidade Celular no Biofilme (VCB)

Para a distinção entre células vivas e células mortas, são utilizadas técnicas de quantificação baseadas na atividade metabólica das células viáveis. Entre as técnicas utilizadas para esta finalidade estão o uso de sais de tetrazólio e resazurina (HONRAETA, GOETGHEBEURB, NELIS 2005).

O corante indicador de viabilidade celular resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona-10-óxido) é um composto azul que pode ser reduzido a resorufina de cor rosa que é fluorescente. Este corante também conhecido como azul de Alamar é usado também no ensaio de viabilidade de células de

mamíferos e também em testes de susceptibilidade de fungos (PEETERS, HANS, COENYE, 2008).

O corante resazurina é solúvel em tampão fosfato, é extremamente estável, não tóxico, não lesivo e não promove a desagregação celular. Assim, torna-se uma técnica vantajosa porque além de não danificar as células, permite a monitorização celular (BORRA et al, 2009).

A resazurina age no citosol, atuando como um transportador de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial, ao nível do complexo IV. A atividade enzimática mitocondrial, através dos aceitadores de elétrons NADPH reduz a resazurina a resorufina. O nível de redução pode ser quantificado por espectrofotometria usando filtros apropriados, uma vez que resazurina exibe um pico de absorção a 600 nm e a resorufina a 570 nm (BORRA et al, 2009).

Após o período de incubação o meio crescido foi removido, e cada poço foi lavado uma vez com 200 μL de SFE para a remoção das células não aderidas. Após o tratamento inicial, foram adicionados a cada poço de uma das placas, 100 μL de solução de resazurina 200,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ preparada no meio de cultura em que procedeu-se a realização do experimento.

As placas foram então incubadas a 37 °C por quatro horas. Em seguida procedeu-se a leitura das densidades ópticas dos poços a 570 e 600nm para o cálculo da porcentagem de metabolização da resazurina. A determinação da porcentagem de metabolização da resazurina foi calculada pela Equação 3, obtida junto ao teste de viabilidade celular disponibilizado pela empresa G-BIOSCIENCES®.

A equação em questão leva em consideração a correção para o uso da absorbância em relação ao uso da fluorescência.

Equação 3: Equação para o cálculo da viabilidade celular no biofilme (VCB), disponibilizada no kit de viabilidade celular da empresa G-BIOSCIENCES.

$$VCB = \left(\frac{((117216 \cdot Abs_{570}) - (80586 \cdot Abs_{600}))}{((155677 \cdot AbsBr_{600}) - (14652 \cdot AbsBr_{570}))} \right) \cdot 100 \quad (3)$$

Sendo:

Abs_{570} = Absorbância do poço a 570 nm;

Abs_{600} = Absorbância do poço a 600 nm;

$AbsBr_{570}$ = Absorbância do poço controle negativo a 570 nm;

$AbsBr_{600}$ = Absorbância do poço controle negativo a 600 nm.

4.7 PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO (AIA)

O meio de cultura utilizado no experimento foi o CB, suplementado com L-triptofano na concentração de 0,25 g.L⁻¹ como precursor para a síntese de AIA (DUCA *et al*, 2014).

Para quantificar as auxinas produzidas pelas bactérias selecionadas, alíquotas de 500 µL de inóculo de cada um dos isolados bacterianos, ajustadas ao correspondente 0,5 da escala de McFarland, foram colocadas para crescimento em 20 mL de meio caldo batata suplementado com triptofano. Os recipientes foram incubados a 28°C, 140 RPM por 62 horas.

Após o período de crescimento cada uma das culturas homogeneizadas foram transferidas para tubos e centrifugadas a 10.000 RPM por, 15 min, a 4°C. Foram colhidas alíquotas de 500 µL do sobrenadante e transferidas para tubos tipo Ependorf contendo 500 µL do reagente ácido de Salkowski (0,5 mol.L⁻¹ FeCl₃ e 7,9 mol.L⁻¹ de H₂SO₄). Após a mistura do reagente e sobrenadante, a

mesma foi homogeneizada e colocada ao abrigo da luz por 30 minutos para o desenvolvimento da cor característica do teste.

O desenvolvimento da cor rosa indica a produção de AIA qualitativo, a intensidade da coloração rosa é diretamente proporcional à concentração de AIA presente no meio (KUSS *et al*, 2007). Após esse período procedeu-se a leitura da densidade óptica a 540 nm.

O cálculo da quantidade AIA produzida pelas bactérias foi realizado por meio do preparo de curva padrão com as concentrações de AIA iguais a 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 30,0 µg/mL. Sendo obtida a seguinte equação da reta: $Y = 13,42x - 0,338$ com coeficiente de correlação $R^2 = 0,9989$.

4.8 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA

4.8.1 Extração DNA

As 20 estirpes utilizadas neste estudo foram submetidas ao processo de extração de DNA. As mesmas foram cultivadas em meio líquido YM sem corante e com adição de cloranfenicol (2,5 µg/mL) e ácido nalidíxico (10 µg/mL), por 24h sob agitação de 140 rpm a 28 °C. Posteriormente, 3,0 mL da suspensão bacteriana foram transferidos para tubos tipo Eppendorf e centrifugados por 4 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células lavadas com solução salina (NaCl 0,9%), a fim de remover produtos do metabolismo celular.

O aglomerado de células foi resuspendido em 600 µL de solução de lise (50 µM de Tris (hidroximetil) aminometano – tris pH 7,6; 20 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético – EDTA; 400 mM de cloreto de sódio – NaCl; 1% de dodecil sulfato de sódio – SDS) e incubado em banho termostatizado por 10 minutos a 80 °C. Posteriormente as amostra foram transferidas para o banho de gelo por 5 minutos.

Quatro microlitros de solução de RNase (24 mg/mL) foram adicionados ao sistema e o mesmo foi levado a incubação por 15 minutos a 37 °C. A reação foi submetida ao banho de gelo por 5 minutos para interromper a reação enzimática. Em seguida 200 µL de cloreto de sódio 0,5M foram transferidos para reação e incubados por 5 minutos em banho de gelo para aglomeração e precipitação do DNA.

A mistura foi então centrifugada a 13.000 rpm por 15 minutos e seu sobrenadante foi transferido para um novo tubo já contendo 600 µL de isopropanol a temperatura ambiente, e levado ao banho de gelo por 15 minutos. O meio reacional foi centrifugada a 13.000 rpm no período de 20 minutos e o sobrenadante descartado. O volume de 600 µL de solução de etanol 70% foi adicionado para lavagem do precipitado e a mistura foi levada a centrifugação por 3 minutos a 13.000 rpm, posteriormente o sobrenadante foi descartado; esta última etapa foi repetida mais uma vez.

O DNA extraído foi seco em temperatura ambiente por um período de aproximado de 24 horas, e em seguida, 55 µL de tampão T₁₀E₁ foi adicionado ao sistema para a ressuspender o material genético e prevenir a ação de exonucleases. A suspensão foi armazenada a - 20 °C em ultrafreezer (Q315U-32 Quimis®) para utilização em análises posteriores (CHUEIRE, 2003).

4.8.2 Amplificação das Regiões IGS 16s-23S e 16S rDNA

O DNA proveniente da extração foi submetido à técnica da PCR. A amplificação foi realizada utilizando *primers* para regiões específicas do genoma como a região espaçadora intergênica 16S-23S rDNA Tabela 02, com 20 µL de uma mistura reacional seguindo protocolo de Reis Júnior e colaboradores (2004) com modificações Tabela 03.

Tabela 02 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação de sequencias genicas IRS 16S-23S rDNA.

Região	Primer	Sequência (5' – 3')*	Tamanho (pb)	Referência
IRS 16S-23S	pHRf	TGC GGC TGG ATC ACC TCC TT	**	(LAGUERRE et al, 1996)
rDNA	p23r	CCG GGT TTC CCC ATT CGG	**	

* H: A, C ou T; I: inosina; K: G ou T; M: A ou C; N: A, C, G ou T; R: A ou G; S: C ou G; Y: C ou T.

** Tamanho variado

Tabela 03 – Composição da mistura reacional para a reação de amplificação da região espaçadora intergênica 16S-23S rDNA segundo protocolo de Reis Júnior e colaboradores (2004) com modificações.

Região	16-23S
Tris-HCl (pH 8,8)	10 mM
KCl	50 mM
MgCl ₂	1,5 mM
Dntp	0,25 mM
Primer 1	0,25 µM
Primer 2	0,25 µM
Taq polimerase	1,5 U
DNA	1,0 µL
Volume da Reação	20 µL

O protocolo com os ciclos de amplificação da região IRS 16S-23S está descrito na tabela 04.

Tabela 04. Protocolo com ciclos de amplificação para termociclador para a região IRS 16S-23S.

Temperatura	Tempo	Número de Ciclos
95,0 °C	3,0 minutos	1,0
94,0 °C	45,0 segundos	
62,0 °C	45,0 segundos	30,0
72,0 °C	1,5 minutos	
72,0 °C	5,0 segundos	1,0
4,0 °C	60,0 minutos	1,0

Os fragmentos obtidos após a amplificação da região IRS 16S-23S foram analisados em eletroforese com gel de agarose (1,7%), a 70 volts por 150 minutos, utilizando tampão TBE 0,5X (44,5 mM de tris base; 44,5 mM de ácido bórico; 25,5 mM de EDTA, pH 8,0).

Os perfis de bandas formados foram comparados a marcadores de peso molecular da BioLabs®, 1Kb-DNA-Ladder e 100pb-DNA-Ladder. Os géis foram corados segundo Sambrook e colaboradores (1989), em brometo de etídio (1 mg.mL^{-1}); observados em transiluminador UV modelo Multi Doc-It Imaging System® (UVD) e fotografados com câmera digital, a fim de separar e classificar os fragmentos de DNA amplificados na reação da PCR (OLIVEIRA et al., 2012).

4.9.2 Análise dos Resultados dos Fragmentos Obtidos pela Amplificação por PCR da Região Intergênica.

Como recomendado por Hungria e colaboradores, 2011, fragmentos maiores que 12000 pb e inferiores a 300 pb dos produtos da PCR para bactérias promotoras de crescimento vegetal foram desconsiderados para análise. Pois apresentam alta variabilidade e pouca resolução no perfil, dificultando a determinação do peso molecular dos fragmentos. Tais bandas também podem representar falsos amplificadas de PCR (DNA não amplificado, maiores que 12000pb, ou RNAs, inferiores a 300pb).

Os perfis de bandas das análises moleculares pela PCR foram transformadas em dados binários e analisados utilizando-se o Programa NTSYS-pc® (versão 2.10), a partir da construção de uma matriz 0-1, onde a presença de determinada característica era declarada 1 e sua ausência 0. Os valores gerados para cada isolado foram comparados e suas semelhanças estimadas pelo Coeficiente de Jaccard (J) em que $J = a/(n-d)$, sendo “a” o número de combinações com a presença das características menos as combinações de ausência das mesmas, “d” o número de combinações de ausência de características e “n” o números de combinações possíveis. O índice de Jaccard foi obtido pelo algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean*) e os isolados foram agrupados e representados graficamente por um dendrograma de similaridade (SNEATH, SOKAL, 1973).

4.9 TESTE DE GERMINAÇÃO

Para a condução dos testes de germinação foram escolhidas duas variedades de plantas de arroz (*Oryza sativa*), cedidas pela Embrapa Arroz e Feijão de Santo Antônio de Goiás, sendo os cultivares Caiapó e Canastra.

As sementes foram inicialmente desinfetadas superficialmente com álcool etílico 70% por 5 minutos e posteriormente com hipoclorito de sódio 6,0 % e Triton-X100 (polietileno glicol *terc*-octilphenil éter) por 30 minutos. Posteriormente as sementes foram lavadas dez vezes com água destilada. Após a lavagem foram deixadas submersas em solução fungicida 0,2 µg/mL de 5,6-dihidroxi-2-metil-1,4-oxatino-3-carboxanilida 200 g/L e dissulfeto de tetrametilurano 200 g.L⁻¹ (Vitavax-Thiram 200 SC) por 24 horas. Após a incubação em solução antifúngica as sementes foram novamente lavadas com água destilada por 10 vezes.

Para a execução do teste de germinação foram selecionadas quatro estirpes, dentre elas estão as de melhor desempenho nos testes de produção de AIA e viabilidade celular no biofilme. O inóculo foi preparado em CB, as estirpes foram crescidas em agitador orbital (140 RPM) a 30 °C por 24 horas. Posteriormente o inóculo foi ajustado a 0,5 na escala de McFarland, correspondendo a aproximadamente 1×10^8 ufc/mL .

Quarenta sementes inoculadas com 5 mL da suspensão dos microorganismos foram alocadas em placas de Petri contendo papel filtro umedecido com água destilada estéril. As placas foram incubadas em câmara de germinação a 28°C com fotoperíodo 16/8 para dia/noite, até a que se observasse a pré-germinação das mesmas (aproximadamente 62 horas).

Das sementes germinadas, 15 foram transferidas para um recipiente estéril contendo um rolo de papel Germitest[®] previamente esterilizado e umedecido com água destilada. Foi utilizando o método de folhas sobrepostas, segundo a regra de análise de sementes (Brasil, 2009). Os rolos contendo as sementes germinadas foram levados à câmara de germinação a 28°C com fotoperíodo 16/8 para dia/noite, por quatro dias.

Após o período de incubação os rolos foram abertos e foram tomadas as medidas com régua milimétrica da radícula, do folíolo, dos pesos úmido e seco da raiz e da parte aérea, respectivamente.

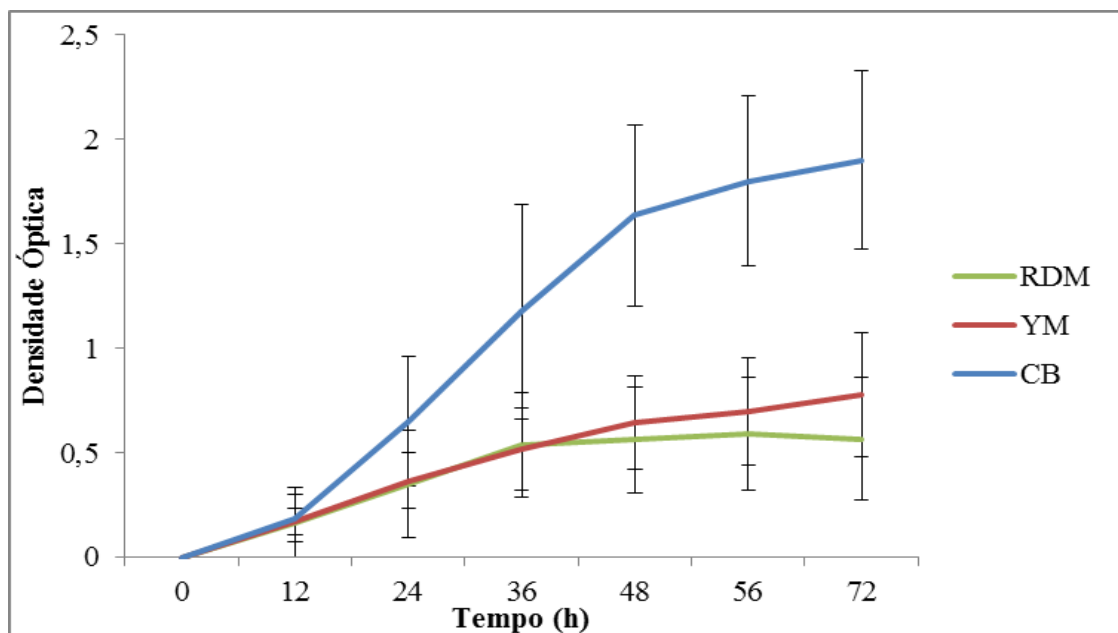
Todos os ensaios foram realizados em triplicata com experimentos independentes. Os dados foram submetidos ao teste de média de Tukey com 5% de significância através do software Sisvar (FERREIRA, 2009).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CURVA DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

Neste trabalho os isolados foram expostos a três condições nutricionais diferentes, onde se pode averiguar a influência de cada condição em seu crescimento e na produção de proteínas totais. Os resultados foram analisados por meio da média e desvio padrão de todas as estirpes nos tempos pré-determinados. Os resultados obtidos na execução da curva de crescimento e proteínas totais estão representados nas Figuras 05 e 06 respectivamente.

Figura 05: Curva de crescimento populacional das estirpes nos distintos meios de cultura.



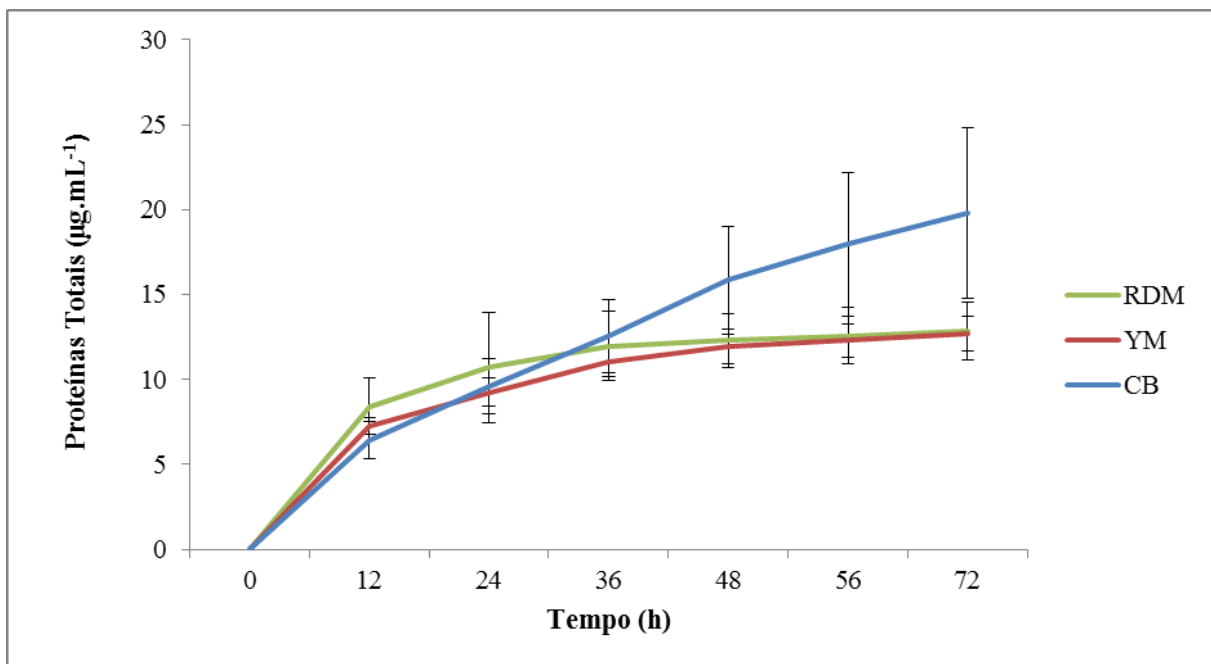
RDM = *Rhizobium defined medium*; YM = *yeast manitol*; CB = caldo batata

Observa-se que durante os tempos estipulados que o meio CB sobressaiu em relação aos demais. Os três meios entre 0 e 12 horas apresentaram valores semelhantes de densidade óptica, sendo observado que a partir deste intervalo o

meio CB apresentou resultados superiores aos demais mantendo esta diferença até o intervalo de 72 horas, o último considerado neste estudo. Os meios YM e RDM não apresentaram diferenças significativas para o crescimento total.

Quando considerado o desempenho de cada estirpe, após 24 horas de incubação houve um predomínio de resultados mais altos no meio CB com 16 resultados superiores contra 3 no YM e apenas 1 no RDM. Considerando 72 horas de incubação essa diferença aumenta ainda mais passando para 19 leituras superiores no CB, apenas no 1 YM e nenhuma no RDM.

Figura 06: Curva de proteínas totais das estirpes nos distintos meios de cultura.



RDM = *Rhizobium defined medium*; YM = *yeast manitol*; CB = caldo batata

No estudo da produção de proteínas totais não foram observadas diferenças significativas entre os três meios de cultura entre os intervalos de 0 a 36 horas, sendo que a partir deste intervalo o meio CB se diferenciou dos demais. Assim como na curva de crescimento também não foi observada diferença significativa entre os meios YM e RDM. A produção de proteínas no meio CB continuou elevando-se até o intervalo máximo de 72 horas, enquanto os demais apresentaram estagnação entre 36 e 48 horas.

Ao avaliar o desempenho individual das estirpes na produção de proteínas totais, após 24 horas de incubação 10 cepas apresentaram resultados superiores no RDM, 7 no CB e 3 no YM. Entretanto ao cabo de 72 horas de incubação os resultados no CB foram superiores para 19 estirpes, apenas 1 no YM e nenhuma no RDM.

5.2 BIOFILME

Todas as cepas formaram biofilme com células viáveis associadas a esta estrutura. As Tabelas 05, 06 e 07 mostram os resultados obtidos para biomassa total, crescimento total e índice de formação de biofilme para os meios RDM, YM e CB, respectivamente.

Tabela 05 – Biomassa total, crescimento total e índice de formação de biofilme no meio RDM.

Estirpe	BMT	CT	IFB (%)
	MED±DP	MED±DP	MED±DP
R30	0,020 ± 0,002	0,190 ± 0,013	10,230 ± 0,185
R31	0,010 ± 0,002	0,060 ± 0,015	9,090 ± 0,643
R54	0,020 ± 0,002	0,100 ± 0,011	20,060 ± 0,397
R58	0,030 ± 0,002	0,080 ± 0,006	33,210 ± 0,445
R59	0,020 ± 0,002	0,120 ± 0,007	16,110 ± 0,445
R65	0,010 ± 0,002	0,110 ± 0,009	11,790 ± 0,758
R73A	0,020 ± 0,001	0,120 ± 0,007	19,040 ± 0,459
R80	0,020 ± 0,001	0,260 ± 0,016	7,180 ± 0,423
R132	0,010 ± 0,001	0,030 ± 0,014	9,470 ± 1,504

R134	0,020 ± 0,001	0,090 ± 0,006	26,650 ± 0,724
R5	0,020 ± 0,001	0,140 ± 0,009	13,120 ± 0,415
R25A	0,010 ± 0,001	0,050 ± 0,009	12,190 ± 0,749
R40	0,010 ± 0,001	0,100 ± 0,005	14,780 ± 0,360
R82	0,020 ± 0,002	0,120 ± 0,007	22,270 ± 0,208
R127	0,020 ± 0,001	0,110 ± 0,004	15,920 ± 0,365
BR322	0,010 ± 0,001	0,020 ± 0,003	29,950 ± 1,590
BR520	0,020 ± 0,001	0,110 ± 0,005	19,340 ± 0,833
BR522	0,020 ± 0,001	0,11 ± 0,004	20,750 ± 0,256
BR10055	0,020 ± 0,001	0,090 ± 0,005	20,930 ± 0,520
CFN42	0,020 ± 0,001	0,120 ± 0,004	15,580 ± 0,327

BMT = biomassa total, CT = crescimento total, IFB = índice de formação de biofilme, MED = média, DP = desvio padrão.

Para o meio de cultura RDM, o isolado com melhor desempenho na formação de biofilme foi o R58, com IFB igual a 33,21% e BMT igual a 0,028 uA. A estirpe R80 apresentou o pior desempenho com IFB de 7,18% e o isolado R132 menor valor de BMT, 0,003 uA, para o meio de cultura em questão.

Tabela 06 – Biomassa total, crescimento total e índice de formação de biofilme no meio YM.

Estirpe	BMT	CT	IFB (%)
	MED ±DP	MED ±DP	MED ±DP
R30	0,020 ± 0,003	0,240 ± 0,014	10,310 ± 0,796
R31	0,010 ± 0,002	0,110 ± 0,011	7,690 ± 1,232
R54	0,030 ± 0,003	0,140 ± 0,011	20,750 ± 0,815

R58	0,030 ± 0,003	0,090 ± 0,006	33,770 ± 1,112
R59	0,030 ± 0,002	0,140 ± 0,007	19,120 ± 0,901
R65	0,020 ± 0,003	0,120 ± 0,008	16,370 ± 1,295
R73A	0,020 ± 0,003	0,120 ± 0,007	18,210 ± 1,307
R80	0,030 ± 0,003	0,270 ± 0,009	10,840 ± 0,688
R132	0,010 ± 0,003	0,060 ± 0,008	10,060 ± 3,512
R134	0,030 ± 0,001	0,070 ± 0,004	37,180 ± 1,791
R5	0,020 ± 0,003	0,170 ± 0,009	13,940 ± 0,839
R25A	0,010 ± 0,002	0,060 ± 0,006	17,980 ± 1,105
R40	0,020 ± 0,002	0,120 ± 0,005	20,340 ± 0,744
R82	0,030 ± 0,001	0,140 ± 0,005	22,520 ± 0,733
R127	0,020 ± 0,002	0,130 ± 0,004	17,340 ± 0,877
BR322	0,010 ± 0,001	0,060 ± 0,005	11,850 ± 0,638
BR520	0,010 ± 0,002	0,120 ± 0,009	12,890 ± 0,677
BR522	0,020 ± 0,002	0,130 ± 0,006	16,510 ± 1,129
BR10055	0,020 ± 0,002	0,110 ± 0,006	21,090 ± 0,690
CFN42	0,030 ± 0,003	0,130 ± 0,010	21,810 ± 0,746

BMT = biomassa total, CT = crescimento total, IFB = índice de formação de biofilme, MED = média,
DP = desvio padrão.

No meio de cultura YM a estirpe R134 apresentou o maior valor de IFB, 37,18%, e a estirpe R82 maior valor de BMT 0,03 uA. Os isolados R31 e R132 apresentaram os menores valores de IFB e BMT, 7,69% e 0,01 uA respectivamente no meio de cultura YM.

Tabela 07 - Biomassa total, crescimento total e índice de formação de biofilme no meio caldo batata.

Estirpe	BMT	CT	IFB (%)
	MED ±DP	MED ±DP	MED ±DP
R30	0,040 ± 0,008	0,350 ± 0,028	10,170 ± 1,603
R31	0,030 ± 0,004	0,100 ± 0,018	26,430 ± 1,688
R54	0,030 ± 0,006	0,220 ± 0,025	13,990 ± 1,328
R58	0,020 ± 0,004	0,170 ± 0,021	13,140 ± 1,931
R59	0,020 ± 0,004	0,220 ± 0,019	8,980 ± 1,043
R65	0,020 ± 0,002	0,210 ± 0,011	8,390 ± 0,620
R73A	0,030 ± 0,006	0,390 ± 0,017	8,490 ± 1,127
R80	0,030 ± 0,008	0,350 ± 0,016	9,010 ± 2,035
R132	0,010 ± 0,002	0,060 ± 0,012	13,260 ± 2,870
R134	0,030 ± 0,007	0,280 ± 0,019	12,840 ± 1,795
R5	0,030 ± 0,003	0,450 ± 0,016	6,100 ± 0,558
R25A	0,010 ± 0,002	0,070 ± 0,008	17,550 ± 1,792
R40	0,020 ± 0,003	0,350 ± 0,015	7,260 ± 0,623
R82	0,030 ± 0,008	0,400 ± 0,021	8,270 ± 2,211
R127	0,030 ± 0,006	0,320 ± 0,025	10,660 ± 1,497
BR322	0,010 ± 0,003	0,230 ± 0,011	3,440 ± 1,138
BR520	0,020 ± 0,007	0,370 ± 0,068	10,690 ± 1,079

BR522	0,030 ± 0,008	0,490 ± 0,033	13,620 ± 1,250
BR10055	0,060 ± 0,004	0,290 ± 0,020	20,520 ± 2,504
CFN42	0,050 ± 0,003	0,270 ± 0,022	18,250 ± 1,290

BMT = biomassa total, CT = crescimento total, IFB = índice de formação de biofilme, MED = média, DP = desvio padrão.

O isolado R31 apresentou comportamento oposto ao observado no meio YM, sendo no meio CB a estirpe com maior IFB, 26,43%. Com relação à BMT a cepa BR10055 foi a de maior produção com 0,058 uA. A cepa BR322 apresentou no meio CB os menores valores de IFB e BMT, 3,44% e 0,01 uA respectivamente.

A Tabela 08 mostra os resultados obtidos para viabilidade celular para os meios RDM, YM e CB.

Tabela 08 – Viabilidade celular das bactérias associadas aos biofilmes nos meios de cultura analisados.

Estirpe	RDM (%)	YM (%)	CB (%)
	MED±DP	MED±DP	MED±DP
R30	59,890 ± 0,599	65,270 ± 0,813	47,390 ± 0,997
R31	42,160 ± 0,522	33,930 ± 0,874	74,740 ± 1,087
R54	49,770 ± 0,806	70,930 ± 0,553	70,080 ± 0,566
R58	65,550 ± 0,793	67,650 ± 0,852	60,250 ± 0,622
R59	39,980 ± 0,657	50,120 ± 0,510	29,160 ± 0,698
R65	52,960 ± 0,737	55,390 ± 0,727	60,250 ± 0,694
R73A	61,850 ± 0,643	60,220 ± 0,790	64,840 ± 0,757

R80	45,480 ± 0,725	54,720 ± 0,572	60,650 ± 0,557
R132	18,920 ± 0,779	20,320 ± 0,547	17,060 ± 1,027
R134	57,430 ± 0,519	66,620 ± 1,462	61,120 ± 0,776
R5	62,570 ± 0,472	80,500 ± 0,505	77,160 ± 0,579
R25A	21,280 ± 0,474	22,690 ± 0,759	21,440 ± 0,758
R40	53,150 ± 0,696	73,120 ± 0,699	59,890 ± 0,492
R82	77,410 ± 0,790	70,380 ± 0,705	70,530 ± 0,775
R127	37,380 ± 0,413	75,070 ± 0,501	60,670 ± 0,529
BR322	31,890 ± 0,359	29,640 ± 0,653	31,190 ± 0,757
BR520	50,840 ± 0,736	63,990 ± 0,745	60,370 ± 0,558
BR522	67,750 ± 0,556	67,930 ± 0,357	76,850 ± 0,595
BR10055	47,560 ± 0,636	55,520 ± 0,442	59,610 ± 0,483
CFN42	41,400 ± 0,800	64,610 ± 0,896	63,380 ± 0,609

VCB = viabilidade celular; RDM = *Rhizobium defined medium*; YM = *yeast manitol*; CB = caldo batata; MED = media; DP = desvio padrão

O IFB foi definido como sendo a razão entre a biomassa total associada ao biofilme e crescimento total, observados durante o tempo de incubação do teste. Dessa forma, cepas com alto crescimento celular mostram um IFB menor, o que pode indicar a opção pelo modo de vida sésil, foi dependente da taxa de crescimento dos micro-organismos.

A Tabela 09 representa o desempenho obtido pelas estirpes nos diferentes meios de cultura na determinação dos índices estudados (VCB, IFB e BMT). O

meio YM proporcionou 32 resultados superiores, o CB 22 e o RDM apenas 6 resultados quando avaliando de forma global os três índices avaliados.

Tabela 09 – Desempenho das bactérias nos testes de formação de biofilme nos meios de cultivo empregados.

Teste	RDM	YM	CB
VCB	1	12	7
IFB	5	14	1
BMT	0	6	14
Total	6	32	22

VCB = viabilidade celular no biofilme; IFB = índice de formação de biofilme; BMT = biomassa total
RDM = *Rhizobium defined medium*; YM = *yeast manitol*; CB = caldo batata.

Pode-se inferir que o meio YM foi o que proporcionou os maiores valores de VCB e IFB, com 12 e 14 estirpes respectivamente. Tais resultados indicam que a composição do meio YM é mais adequada às necessidades fisiológicas das bactérias, no que diz respeito à síntese de compostos para sua subsistência, explicando seu melhor desempenho na VCB e IFB.

Observa-se na Tabela 09 que o meio CB proporcionou os melhores resultados para BMT, com 14 estirpes com maior produção de biomassa neste meio. A biomassa total engloba o conjunto formado pelas células microbianas constituídas em biofilme, juntamente com substâncias poliméricas por elas secretadas e fixadas em uma superfície sólida (CHAVES et al, 2004).

Neste contexto, observa-se que o meio CB, com maior concentração de nutrientes, foi o que melhor proporcionou a produção de biomassa, indicando que meios mais ricos suprem melhor as necessidades metabólicas das células bacterianas. Devido a sua composição complexa, rica em carboidratos e outras biomoléculas, as bactérias tendem a optar pelo modo de vida livre, o que resulta

na grande produção de biomassa. Fato corroborado pelas leituras superiores observadas na curva de crescimento, para a grande maioria das cepas, em 24 horas de incubação.

A formação de biofilme neste meio provavelmente é influenciada devido ao aumento da densidade populacional em relação ao tempo de incubação, fato que pode ser o indicador para o estabelecimento e indução da formação de biofilme, em resposta ao intenso crescimento que este meio proporcionou, ou seja, a formação neste caso pode ser dependente da taxa de crescimento celular.

O meio RDM proporcionou desempenho mais discreto entre os meios testados quando considerado a VCB, com apenas uma cepa com valor mais elevado e nenhuma em relação à BMT, entretanto foi superior ao CB quando levado em consideração o IFB, com cinco estirpes apresentando este índice mais elevado.

De modo a classificar seu desempenho, as bactérias foram divididas por meio de critério próprio em grupos de alto ($>15,0\%$) e baixo IFB ($\leq 15,0\%$). Para o meio de cultura RDM treze mostraram alto IFB e sete baixo IFB. Para o meio de cultura YM treze cepas apresentaram alto IFB e sete com baixo IFB. No meio caldo batata quatro estirpes apresentaram alto IFB e dezesseis baixo IFB. No estudo da viabilidade celular, cepas que mostraram VCB maior que 50% foram consideradas de alta viabilidade, dessa forma dez cepas foram consideradas de alta viabilidade no meio RDM, dezesseis no meio YM e quatorze no meio caldo batata.

A correlação entre IFB e VCB a partir da classificação acima possibilitou a divisão das estirpes em quatro grupos. No primeiro grupo estão bactérias com alto IFB e VCB, o segundo baixo IFB e baixa VCB e o terceiro alto IFB e baixo VCB e no quarto grupo baixo IFB e alto VCB, Tabela 10.

Para o meio RDM sete estirpes foram alocadas no grupo 1, quatro no grupo 2, seis no grupo 3 e três no grupo 4. Para o meio YM doze foram

colocadas no grupo 1, três no grupo 2, uma no grupo 3 e quatro no grupo 4. Para o meio caldo batata duas estirpes foram alocadas no grupo 1, quatro no grupo 2, duas no grupo 3 e doze no grupo 4. Estatisticamente por meio do teste de Fisher somente quando considerado o IFB, foram observadas diferenças significativas entre o meio CB e os demais ($p = 0,0095$).

Tabela 10 – Correlação entre os índices de índice de formação de biofilme e viabilidade celular no biofilme nos meios de cultura empregados.

Índices		Meios de Cultura			
IFB	VCB	RDM	YM	CB	
Alto	Alto	7	12	2	
Baixo	Baixo	4	3	4	
Alto	Baixo	6	1	2	
Baixo	Alto	3	4	12	

VCB = viabilidade celular no biofilme; IFB = índice de formação de biofilme; RDM = *Rhizobium defined medium*; YM = *yeast manitol*; CB = caldo batata.

Quando comparado os meios RDM e CB por meio do teste de Fisher observou-se que o segundo foi mais eficiente na viabilidade celular ($P = 0,0217$). Também foram observadas diferenças significativas nos parâmetros de IFB, BMT e crescimento celular entre os dois meios ($P = 0,0001$).

Quando comparado os meios RDM e YM por meio do teste de Fisher observou-se que o YM é mais eficiente para manutenção da viabilidade celular no biofilme ($P = 0,0077$), no BMT ($P = 0,0001$) e crescimento total ($P = 0,0112$). Contudo não foi observada diferença significativa para IFB entre esses dois meios.

Na análise entre os meios CB e YM por meio do teste de Fisher, constatou-se que houve diferença significativa para os parâmetros de BMT, ($P =$

0,0125) e crescimento celular ($P = 0,0001$), sendo o CB mais efetivo nestes dois quesitos. O parâmetro de IFB também foi estatisticamente significativo na comparação destes dois meios ($P = 0,0001$), sendo o meio YM mais efetivo neste quesito. Não são observadas diferenças estatisticamente significantes entre os meios CB e YM na viabilidade celular em biofilme.

A elevada taxa de crescimento bacteriano observada no meio CB poderia estar relacionada ao baixo desempenho das estirpes no IFB, pois o índice é gerado utilizando o crescimento total como denominador na equação. Corroborando esta observação, o alto desempenho das estirpes no VCB nesse meio demonstrou que a formação de biofilme pode ser dependente da alta taxa de crescimento das bactérias.

O meio YM proporcionou o desenvolvimento de biofilmes bacterianos com altos índices de células viáveis e de matriz polimérica extracelular. O meio YM pode ser considerado um meio complexo, rico em elementos essenciais à subsistência bacteriana.

Condições de formação de biofilme induzida em condições ricas de nutrientes são relatadas por Recouvreur (2004) o qual sugere que as bactérias iniciam a formação de biofilme em resposta a sinais ambientais, tais como disponibilidade e tipo de nutrientes, temperatura, pH e oxigênio. Esse autor ainda relata que micro-organismos que formam biofilme em meio rico em nutrientes quando em situações de escassez se desprendem do biofilme e retornam ao modo de vida isolado, provavelmente em busca de novas fontes de nutrientes. Quando há a disponibilidade e fornecimento de nutrientes, as bactérias promovem um constante desenvolvimento do biofilme (O'TOOLE, KAPLAN, KOLTER, 2000).

Em contraste, há casos em que a indução da formação de biofilme ocorre quando há baixa concentração de nutrientes. O'Toole e colaboradores, 2000 em seus estudos, mostraram que cepas de micro-organismos Gram-negativos, como

Myxococcus xanthus e *Escherichia coli* O517 passam do modo de vida livre para o sésil em resposta a deficiência de nutrientes no meio.

Sendo assim, a disponibilidade de nutrientes desempenha um papel importante na transição a partir de um modo de vida planctônico para um modo sésil, sendo a formação de biofilme regulada por sinais que diferem entre as espécies bacterianas e que refletem o habitat em que as mesmas estão expostas. (STANLEY LAZAZZERA *et al*, 2004).

A composição primária dos biofilmes de células rizobacterianas, segundo Martins e Martins (2013) é de exopolissacarídeos de estrutura complexa, sendo estes, metabólitos secundários produzidos durante a fase estacionária do crescimento microbiano, podendo ser homopolímeros ou heteropolímeros.

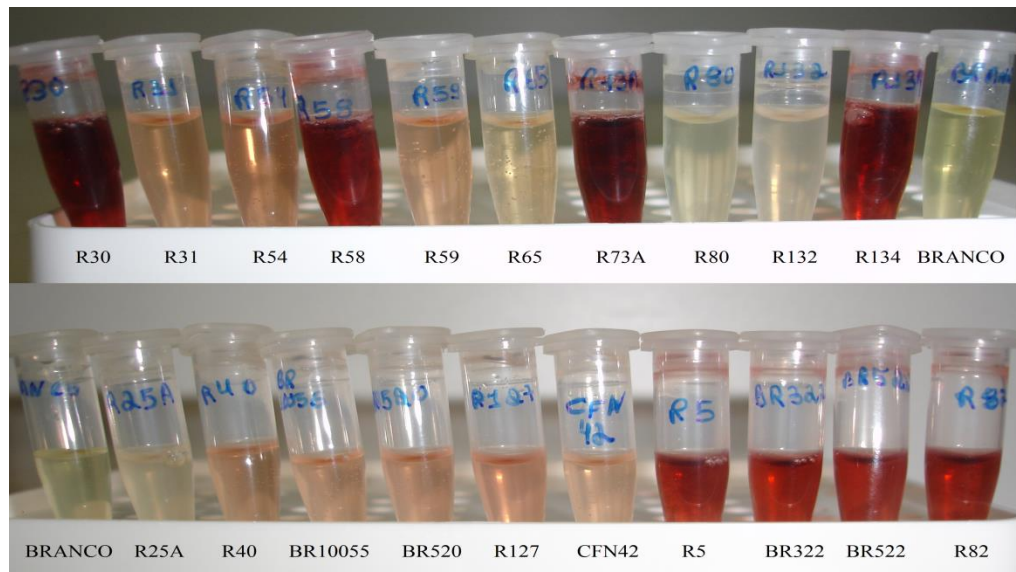
Rinaudi e colaboradores (2006) vêm estudando parâmetros que podem influenciar a formação de biofilme na espécie *Sinorhizobium melioli* em simbiose com plantas do gênero *Medicago*. Dentro destes parâmetros estão fonte de carbono, quantidade de nitrato, fosfato, cálcio e magnésio, como também os efeitos osmóticos e do pH. Neste estudo foram definidas, em experimentos isolados, as melhores faixas de concentração de cada composto, as quais otimizam a produção de biofilme em microplacas de poliestireno.

Visto que os polissacarídeos são um componente intrínseco do biofilme, estudos reportados por Rinaudi e Giordano (2010) mostraram que mutantes deficientes na produção destes compostos não conseguem induzir a infecção e o desenvolvimento de nódulos efetivos na raiz. Outra relação importante entre a formação de biofilme e a FBN é observada em bactérias associativas. Neste tipo de bactéria a colonização envolve a migração em direção à raiz por quimiotaxia, onde posteriormente há a adsorção e ancoragem ao sistema radicular, havendo proliferação microbiana e formação de micro colônias e estruturas de biofilme na superfície da raiz as quais se fixam às raízes mediante a formação de biofilme (SANTI, BOGUSZ, FRANCHE, 2013).

5.3 PRODUÇÃO ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO (AIA)

Foi observado que todas as cepas analisadas possuem a capacidade de sintetizar fito hormônios com anel indol em sua cadeia estrutural (Figura 07).

Figura 07 – Aspecto visual após a adição do reagente de Salkowski ao sobrenadante do CB crescido suplementado com triptofano.



Dentre as cepas analisadas foi observado valores de produção variando entre $0,207 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $33,212 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Dentre as cepas isoladas as que apresentaram maior produção de AIA foram as R82, R5, R134, R58, R73 e R30. As estirpes controle de maior produção foram as BR522 e BR322.

Os isolados de menor potencial produtivo do fito hormônio foram R80 e R65 com concentrações abaixo de $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os valores de concentração de AIA produzido pelas cepas em estudo estão listados na Tabela 11.

Tabela 11 – Concentração de AIA sintetizado por bactérias da família *Rhizobiaceae* isoladas de nódulos das raízes de arroz sequeiro e crescidas em meio caldo batata suplementado com triptofano.

Bactérias	Concentração AIA ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	
	Média	Desvio Padrão
R5	29,27	$\pm 1,39$
R25	3,09	$\pm 0,24$
R30	33,21	$\pm 0,00$
R31	3,08	$\pm 0,16$
R40	2,86	$\pm 0,37$
R54	4,98	$\pm 0,30$
R58	32,65	$\pm 0,24$
R59	2,84	$\pm 0,04$
R65	0,72	$\pm 0,05$
R73A	32,84	$\pm 0,22$
R80	0,21	$\pm 0,02$
R82	28,61	$\pm 0,84$
R127	4,56	$\pm 0,19$
R132	2,91	$\pm 0,07$
R134	32,25	$\pm 0,25$
CFN42	2,20	$\pm 0,17$
BR322	31,51	$\pm 1,20$
BR520	4,47	$\pm 0,48$
BR522	25,09	$\pm 0,760$
BR10055	2,71	$\pm 0,201$

AIA = ácido indol-3-acético

Foi observada uma grande variabilidade na produção do fito hormônio pelas estirpes estudadas, com a leitura da DO variando, entre o maior e menor produtor, mais de 150 vezes.

Kuss e colaboradores (2007) avaliando a produção de AIA por bactérias diazotróficas endofíticas isoladas de cultivares de arroz irrigado, observaram a produção de AIA entre 2,79 e 13,47 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ após 72 horas de crescimento em meio DYGS sem a adição de triptofano ao meio.

Stroschein e colaboradores (2011) por sua vez avaliando a produção de AIA por rizobactérias isolados de alfafa em meio LM enriquecido com triptofano, observaram que em todos os isolados testados produziam AIA, com valores que variaram de 43,04 a 101,26 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Shilindwein e colaboradores (2008) em estudos usando quatro isolados de *Bradyrhizobium sp* e um de *Rhizobium leguminosarum* observaram que a produção de AIA apresenta valores significativamente diferentes entre os gêneros testados. A produção de AIA variou entre 1,2 a 171,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ sendo a cepa de *Rhizobium leguminosarum* o de maior produção 171,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Stroschein e colaboradores 2011 observaram que bactérias isoladas de alfafa produziam AIA na ordem de 43,04 a 101,26 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

A seleção de bactérias para produção de AIA em associação com plantas passa pela avaliação de certos parâmetros, entre eles a capacidade de produção do composto pela bactéria, a faixa ideal de concentração exigida do hormônio pela planta e de parâmetros reguladores da produção AIA.

O hormônio AIA, assim como os outros fito hormônios, estimula o crescimento de plantas apenas dentro de uma faixa estreita de concentração. Fora da faixa ideal, baixas concentrações são ineficientes e altas concentrações são tóxicas. Essa faixa varia entre as diferentes culturas de leguminosas (SCHLINDWEIN et al, 2008).

Em alguns casos AIA também pode funcionar na regulação do gene *ipdC* através de mecanismo de feedback positivo, fato descrito para *Azospirillum brasilense* (BROEK et al, 1999).

O aumento da concentração de AIA no meio induz a expressão do gene *ipdC* que codifica a enzima indol-3-piruvato descarboxilase. Fato também observado por SOMERS e colaboradores (2005).

O gene *ipdC*, também pode ser controlado pela disponibilidade de triptofano no meio como observado em cepas de *Pseudomonas putida* GR12-2. Na rizosfera as bactérias podem obter triptofano a partir do exsudato das raízes das plantas, assim de certa maneira em alguns casos a planta hospedeira controla a produção microbiana de AIA (DUCA et al, 2014).

Outro fator a se observar na seleção de micro-organismos para a produção de AIA é a via de síntese a qual se utiliza a bactéria. Há evidências que micro-organismos podem selecionar uma via metabólica diferenciada, dependendo do meio ambiente. Este fato foi observado em espécies de *Rhizobium* que utilizavam a via do indol-3-acetamida quando associados ao hospedeiro e a via do ácido indol-3-piruvato quando em vida livre (RADWAN, MOHAMED, REIS, 2004).

Martins e colaboradores (2015) observaram em seus trabalhos que a quantidade de AIA produzida pela estirpe UFRGS Lu 59 não foi determinante na germinação de sementes de azevém (*Lolium multiflorum*), ou seja, mesmo produzindo baixa quantidade de AIA a estirpe em questão proporcionou os melhores resultados em testes de germinação.

5.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR POR PCR (REGIÃO IGS)

Entre as estirpes avaliadas neste trabalho, apenas a bactéria R80 não apresentou perfil eletroforético polimórfico da região intergênica entre os genes 16S e 23S rDNA, devido provavelmente por sua grande produção de exopolissacarídeos, que impactou diretamente na obtenção de DNA. Os fragmentos de produtos de PCR obtidas no gel da região IRS 16-23S variaram entre 787 a 9.045 pares de base (pb), com presença de 1 a 3 bandas separadas em gel da agarose.

Tal informação corrobora com os resultados obtidos por Geniaux, Laguerre e Amarger (1993) que também observaram múltiplas cópias no genoma de rizobactérias (três cópias), podendo ainda carregar uma ou mais sequencias conservadas com papéis funcionais, genes de RNAt, que aumentam o peso molecular do fragmento (SIEVERS et al, 1996).

Haukka (1997) encontrou em cepas de rizóbio, de uma a três cópias: uma em *Bradyrhizobium japonicum* e em *Rhizobium tropici*, três em *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium galegae*, *Rhizobium leguminosarum* e *Rhizobium etli*.

A presença de uma ou duas cópias da região IRS 16-23S pode ser explicada pela presença de uma única sequencia alvo no genoma, ou por mais sequencias com mesmo tamanho (DOLZANI et al. 1995)

A maior concentração de bandas foi encontrada na região entre 1500 e 1700 pb. Tal característica foi observada em 13 das bactérias analisadas (R5, R30, R31, R40, R54, R58, R65, R73A, R82, R127, R520, BR10055, CFN42). O isolado 59 apresentou duas bandas, sendo que a de tamanho 1.492 foi a única encontrada nesta faixa para todos os isolados.

Para bactérias FBN do gênero *Azospirillum* foram encontrados fragmentos com tamanho de 800 a 1300 pb, com até três fragmentos (REIS JUNIOR, REIS e TEIXEIRA; 2004).

Fernandes, Fernandes e Hungria (2003) relatam que em isolados de rizóbios de guandu é possível encontrar de 1 a 2 fragmentos para a IRS 16-23S rDNA com tamanhos entre 535 a 1630 pb. Mesmo número de fragmentos podem ser localizados em estirpes de *Bradyrhizobium* com tamanhos de 800 a 1800 pb (GERMANO et al, 2006).

A quantidade de mais de um fragmento também pode ser explicada pelo processo de transferência lateral parcial, ou total, dos operons rRNA, onde têm sido relatada em muitos gêneros de bactérias, incluindo os rizóbios (SHAMSELDIN et al., 2008).

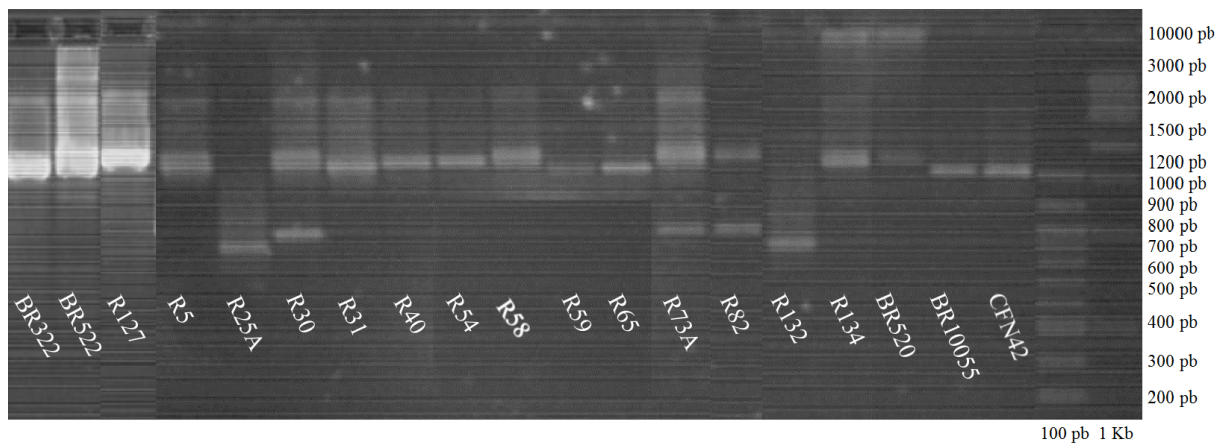
Para Jensen, Webster e Straus (1993), e Sievers e colaboradores (1996), a variabilidade também pode ser parcialmente explicada pela inserção de vários genes tRNA (sequências conservadas com papel funcional) em regiões IRS, aumentando o comprimento dos fragmentos e a variação no tamanho destas sequencias.

A região 16-23S DNAr foi escolhida por apresentar grande variabilidade, tanto em composição de bases quanto ao tamanho, se diferenciando dessa forma das regiões conservadas como 16S ou 23S. Esse perfil de separação permite a diferenciação das bactérias a nível intra-específico, pelo elevado grau de diversidade (LAGUERRE et al. 1996).

Os resultados podem ser divididos em três grupos, classificados de acordo com o número de fragmentos encontrados. Grupos de 1, 2 e 3 fragmentos. No grupo de 1 fragmento estão as cepas R25A, R31, R40, R54, R58, R65, R127, R134, BR520, BR522, BR10055, CFN42. As bandas deste grupo variaram entre 859 (R25A) a 1821 (R134) pares de base.

No grupo de 2 fragmentos estão presentes as cepas R5, R30, R59, R82, R132, BR322 com fragmentos de 787 (R132) a 9.045 (BR322) pares de base. O isolado R73A configura o grupo de 3 fragmentos, com pesos moleculares de 958, 1674 e 4631 pares de base Figura 08.

Figura 08 – Perfil eletroforético da amplificação em PCR da região intergênica (16S-23S rDNA) de 15 isolados de nódulos de arroz e 5 estirpes controles em gel de agarose (1,7%) com marcador molecular 1 kb-DNA-Ladder e 100pb-DNA-Ladder.



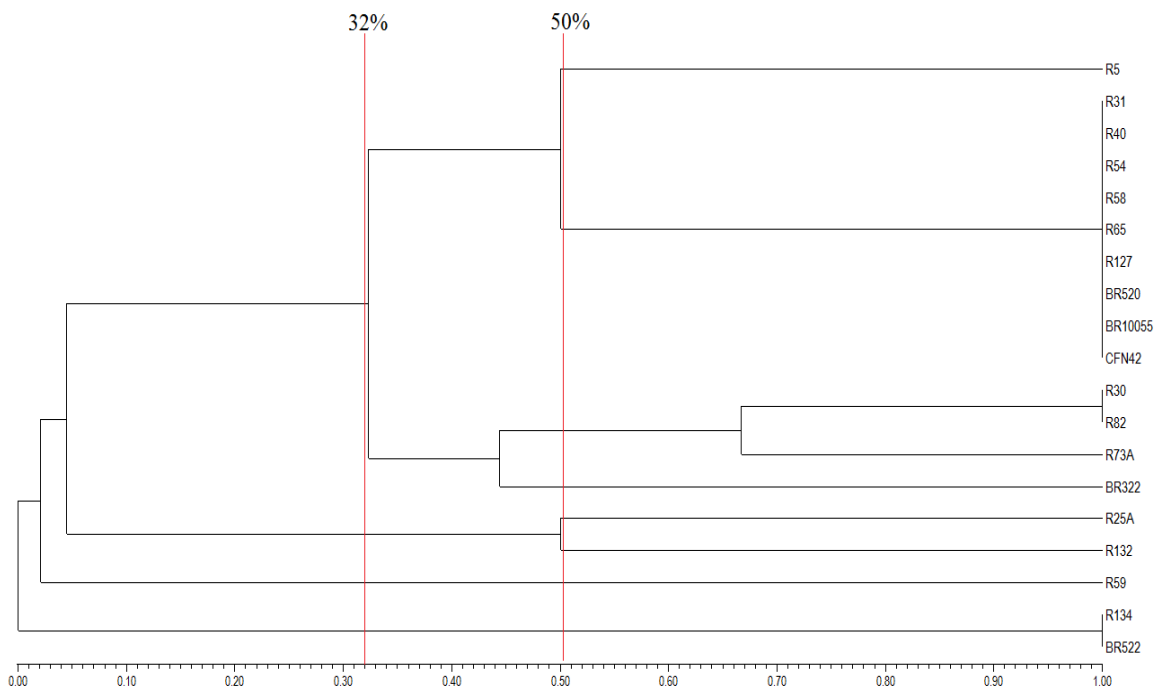
Com similaridade de 100% foram encontrados 9 grupos (I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX). No grupo I estão a cepa R5, no grupo II estão presentes os isolados R31, R40, R54, R58, R65, R127, que se agruparam com as estirpes controle BR520, BR10055 e CFN42, apresentando dessa forma uma maior probabilidade de se enquadrarem no grupo dos rizóbios. Essa hipótese pode ser estendida à bactéria R5 (grupo I) com a similaridade de 50%.

O grupo V é formado pela estirpe BR322, que se reúne com os grupos III e IV com semelhança de 44%. No grupo IX está o isolado R134 e a cepa controle BR522 que se agrupam com 100% de similaridade. Os grupos VI, VII e VIII são os grupos mais singulares, apresentando baixa similaridade com os outros grupos.

Com 32% de similaridade foram identificados quatro grupos, o maior grupo apresentou 14 bactérias (grupos I, II, III, IV, V). Sendo observado neste grupo o maior número de estirpes controle. Os demais grupos apresentaram

maior diversidade genômica da região IRS 16-23S. É possível observar uma distribuição das bactérias entre os grupos através da Figura 09.

Figura 09 – Dendrograma definido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard para as avaliações dos fragmentos da região espaçadora intergênica 16S-23S rDNA obtidos em gel de agarose (1,7%) nas análise molecular das bactérias em estudo.



5.5 TESTE DE GERMINAÇÃO

A influência dos isolados na capacidade germinativa dos genótipos testados está descrita na tabela 12.

Tabela 12 – Taxa de germinação (%) dos genótipos nos cinco tratamentos realizados mantidos em placas de Petri com papel filtro em câmara de germinação.

<i>Genótipos</i>	<i>T1</i>	<i>T2</i>	<i>T3</i>	<i>T4</i>	<i>T5</i>
<i>Caiapó</i>	94,4% ± 1,43	92,1% ± 2,78	86,3% ± 8,43	88,4% ± 1,54	87,9% ± 3,76
<i>Canastra</i>	77,7% ± 4,04	70,6% ± 5,61	66,4% ± 6,44	60,6% ± 3,34	65,8% ± 6,08

Legenda: Tratamento 1 (T1) controle negativo; tratamento 2 (T2) R40; tratamento 3 (T3) R127; tratamento 4 (T4) R5; tratamento 5 (T5) R54.

Dentre as variedades avaliadas a menor taxa de germinação foi observada para a variedade Canastra Tabela 12. De modo geral o processo de inoculação promoveu um efeito negativo na taxa de germinação para ambos os genótipos, diminuindo a mesma para todos os tratamentos em relação ao tratamento controle. O cultivar Caiapó apresentou taxa de germinação superior para todos os tratamentos avaliados.

Os resultados obtidos com os isolados foram comparados com o controle negativo através da comparação de médias pelo teste de Tukey. Os resultados obtidos estão descritos nas tabelas 13 a 19.

Tabela 13 – Médias obtidas no teste de Tukey para comprimento da raiz no teste de germinação.

Raiz - (Cm)						
<i>Genótipo</i>	<i>T1</i>	<i>T2</i>	<i>T3</i>	<i>T4</i>	<i>T5</i>	<i>Média Geral Genótipo</i>
<i>Caiapó</i>	12,96Aa	11,12Ba	11,13Aa	11,71Ba	11,50Aa	11,69A
<i>Canastra</i>	7,59Bb	13,79Aa	11,60Aa	14,58Aa	12,15Aa	11,94A
<i>Média Geral Tratamento</i>	10,28b	12,45ab	11,36ab	13,15a	11,83ab	11,81
<i>C.V. (%)</i>	-	-	-	-	-	12,60

T1 = tratamento 1 - controle negativo; T2 = tratamento 2 - R40; T3 = tratamento 3 - R127; T4 = tratamento 4 - R5; T5 = tratamento 5 - R54; C.V. Coeficiente de Variação. Médias seguidas por letras iguais (maiúsculas para coluna e minúsculas para linha), não diferem entre si no teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Na avaliação do comprimento da raiz observou-se que o cultivar Caiapó não mostrou diferença estatística entre controle e as estirpes testadas. Para o

genótipo Canastra houve diferença significativa entre o tratamento controle e os tratamentos inoculados. Neste cultivar o isolado R5 apresentou o maior comprimento de raiz com $11,60 \text{ cm}^{-1}$.

Tabela 14 – Valores de comprimento da parte aérea no teste de germinação com médias obtidas no teste de Tukey.

Parte Aérea (Cm)						
<i>Genótipo</i>	<i>T1</i>	<i>T2</i>	<i>T3</i>	<i>T4</i>	<i>T5</i>	<i>Média Geral Genótipo</i>
<i>Caiapó</i>	6,32Aa	5,30Aab	5,14Ab	6,12Aab	5,63Aab	5,69A
<i>Canastra</i>	5,43Ba	5,41Aa	5,41Aa	6,23Aa	5,98Aa	5,70A
<i>Média Geral Tratamento</i>	5,87ab	5,36b	5,27b	6,17a	5,80ab	5,7
<i>C.V. (%)</i>	-	-	-	-	-	7,35

T1 = tratamento 1 - controle negativo; T2 = tratamento 2 - R40; T3 = tratamento 3 - R127; T4 = tratamento 4 - R5; T5 = tratamento 5 - R54; C.V. Coeficiente de Variação. Médias seguida por letras iguais (maiúsculas para coluna e minúsculas para linha), não diferem entre si no teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Na avaliação da parte aérea, o processo de inoculação não proporcionou um aumento significativo no crescimento da parte aérea. Foi observada diferença estatística apenas para o tratamento controle (T1), onde o cultivar Caiapó se mostrou mais efetivo na promoção do crescimento da parte aérea.

Tabela 15 – Número de ramificações no teste de germinação com médias obtidas no teste de Tukey.

Ramificações						
<i>Genótipo</i>	<i>T1</i>	<i>T2</i>	<i>T3</i>	<i>T4</i>	<i>T5</i>	<i>Média Geral Genótipo</i>

<i>Caiapó</i>	4,20Bab	4,56Bab	3,89Bb	4,24Bab	4,87Ba	4,35B
<i>Canastra</i>	4,96Ab	6,29Aa	5,84Aab	5,88Aab	5,91Aa	5,78A
<i>Média Geral</i>						
<i>Tratamento</i>	4,58b	5,42b	4,86ab	5,06ab	5,39b	5,06
<i>C.V.(%)</i>	-	-	-	-	-	7,62

T1 = tratamento 1 - controle negativo; T2 = tratamento 2 - R40; T3 = tratamento 3 - R127; T4 = tratamento 4 - R5; T5 = tratamento 5 - R54; C.V. Coeficiente de Variação. Médias seguida por letras iguais (maiúsculas para coluna e minúsculas para linha), não diferem entre si no teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Levando em consideração o número de ramificações pode constatar-se que o cultivar Canastra apresentou resultados superiores ao cultivar Caiapó para todos os tratamentos. No cultivar Caiapó houve o aumento do número de ramificações quando a semente foi submetida ao tratamento T5 (isolado R54) e no cultivar Canastra quando submetido ao tratamento T2 (isolado R40).

Tabela 16 – Valores de massa fresca da parte aérea no teste de germinação com médias obtidas no teste de Tukey.

Massa Fresca Parte Aérea (mg)						
<i>Genótipo</i>	<i>T1</i>	<i>T2</i>	<i>T3</i>	<i>T4</i>	<i>T5</i>	<i>Média Geral</i> <i>Genótipo</i>
<i>Caiapó</i>	30,27Aa	29,28Aab	19,83Ab	25,42Aab	26,46Aab	18,87B
<i>Canastra</i>	18,70Ba	18,07Ba	17,86Aa	19,59Aa	20,15Aa	26,25A
<i>Média Geral</i>						
<i>Tratamento</i>	24,48a	23,67a	18,84a	22,51a	23,30 ^a	22,56
<i>C.V. (%)</i>	-	-	-	-	-	17,73

T1 = tratamento 1 - controle negativo; T2 = tratamento 2 - R40; T3 = tratamento 3 - R127; T4 = tratamento 4 - R5; T5 = tratamento 5 - R54; C.V. Coeficiente de Variação. Médias seguida por letras

iguais (maiúsculas para coluna e minúsculas para linha), não diferem entre si no teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

O cultivar Caiapó apresentou maior valor de massa fresca da parte aérea para os tratamentos T1 e T2 em comparação com o cultivar Canastra. Quando observado os tratamentos o processo de inoculação promoveu um efeito negativo no parâmetro em questão para o cultivar Caiapó. Para a variedade Canastra o processo de inoculação não proporcionou efeito significativo.

Tabela 17 – Valores de massa fresca da raiz no teste de germinação com médias obtidas no teste de Tukey.

Massa Fresca Raiz (mg)						
<i>Genótipo</i>	<i>T1</i>	<i>T2</i>	<i>T3</i>	<i>T4</i>	<i>T5</i>	<i>Média Geral Genótipo</i>
<i>Caiapó</i>	18,21Ba	15,06Bab	12,34Bab	9,13Bb	7,29Bb	12,41B
<i>Canastra</i>	25,65Aa	20,04Aa	25,59Aa	31,50Aa	33,20Aa	28,80A
<i>Média Geral Tratamento</i>	21,93a	21,55a	18,97a	20,32a	20,24 ^a	20,60
<i>C.V.(%)</i>						16,90

T1 = tratamento 1 - controle negativo; T2 = tratamento 2 - R40; T3 = tratamento 3 - R127; T4 = tratamento 4 - R5; T5 = tratamento 5 - R54; C.V. Coeficiente de Variação. Médias seguida por letras iguais (maiúsculas para coluna e minúsculas para linha), não diferem entre si no teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

O genótipo Canastra apresentou melhor resultado de massa fresca da raiz para todos os tratamentos em relação à variedade Caiapó. Não foi observada diferença estatística entre os tratamentos realizados para o genótipo Canastra. Para o genótipo Caiapó a inoculação promoveu um efeito negativo, diminuindo a massa fresca da raiz para todos os tratamentos inoculados.

Tabela 18 – Valores de massa seca parte aérea no teste de germinação com médias obtidas no teste de Tukey.

Massa Seca Parte Aérea (mg)						
<i>Genótipo</i>	<i>T1</i>	<i>T2</i>	<i>T3</i>	<i>T4</i>	<i>T5</i>	<i>Média Geral Genótipo</i>
<i>Caiapó</i>	6,68Aa	6,64Aab	4,50Ab	5,71Aab	5,80Aab	5,86A
<i>Canastra</i>	4,50Ba	4,28Ba	4,22Aa	4,56Aa	4,67Aa	4,44B
<i>Média Geral Tratamento</i>	5,59a	5,46a	4,36a	5,14a	5,21 ^a	5,15
<i>C.V.(%)</i>	-	-	-	-	-	17,19

T1 = tratamento 1 - controle negativo; T2 = tratamento 2 - R40; T3 = tratamento 3 - R127; T4 = tratamento 4 - R5; T5 = tratamento 5 - R54; C.V. Coeficiente de Variação. Médias seguidas por letras iguais (maiúsculas para coluna e minúsculas para linha), não diferem entre si no teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

O genótipo Caiapó, em relação ao Canastra, apresentou resultados significativos apenas para os tratamentos T1 e T2. Para a variedade Caiapó a inoculação atuou de forma negativa, diminuindo os valores de massa seca da parte aérea, já no genótipo Canastra não foi observada diferença significativa entre os tratamentos.

Tabela 19 – Valores de massa seca raiz no teste de germinação com médias obtidas no teste de Tukey.

Massa Seca Raiz						
<i>Genótipo</i>	<i>T1</i>	<i>T2</i>	<i>T3</i>	<i>T4</i>	<i>T5</i>	<i>Média Geral Genótipo</i>
<i>Caiapó</i>	9,05Aa	7,57Bab	5,84Bab	4,55Bb	3,64Bb	6,13B

<i>Canastra</i>	11,69Aa	12,71Aa	11,55Aa	13,85Aa	14,90Aa	12,94A
<i>Média Geral Tratamento</i>	10,37a	10,14a	8,70a	9,20a	9,27 ^a	9,53
<i>C.V.(%)</i>	-	-	-	-	-	18,46

T1 = tratamento 1 - controle negativo; T2 = tratamento 2 - R40; T3 = tratamento 3 - R127; T4 = tratamento 4 - R5; T5 = tratamento 5 - R54; C.V. Coeficiente de Variação. Medias seguida por letras iguais (maiúsculas para coluna e minúsculas para linha), não diferem entre si no teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Com relação a massa seca da raiz a variedade *Canastra* apresentou melhores resultados para todos os tratamentos inoculados, em relação ao genótipo *Caiapó*, não sendo observada diferença estatística entre os tratamentos dentro do genótipo *Canastra*. Na variedade *Caiapó*, o processo de inoculação impactou negativamente, diminuindo os valores de massa seca da raiz para todos os tratamentos inoculados.

De modo geral não foi observada diferença estatística entre os genótipos para os parâmetros de comprimento de raiz e parte aérea. O genótipo *Canastra* sobressaiu em relação ao *Caiapó* para o número de ramificações, massa fresca parte aérea e raiz e massa seca raiz. O genótipo *Caiapó* sobressaiu ao *Canastra* apenas para massa seca da parte aérea.

Na avaliação geral por tratamento foram observadas diferenças estatísticas apenas para raiz e parte aérea, sendo que o isolado R5 (tratamento 4) foi o que apresentou melhores resultados, sendo este isolado o que apresentou no teste de viabilidade celular no biofilme para CB o maior resultado 77,16% e valor de produção de AIA 29,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Fato que pode que pode ter contribuído para seu desempenho no teste de germinação.

Stroschein e colaboradores 2011, durante a avaliação da germinação de plantas de arroz *Oriza sativa* cultivar “IRGA 409” observaram que bactérias

isoladas de nódulos de alfafa favoreceram um aumento inicial na porcentagem de germinação e o aumento do índice de velocidade de germinação. Resultados contrários aos observados neste trabalho, onde a porcentagem de germinação decaiu em relação ao controle negativo. Stroschein e colaboradores 2011 também observaram que a inoculação das sementes com Rizóbios promoveram o aumento da raiz e da parte aérea das plântulas de arroz, fato semelhante observado para a estirpe R5. Desta forma, entre os isolados avaliados somente a estirpe R5 pode ser considerada uma bactéria promotora de crescimento vegetal.

6 CONCLUSÃO

- O perfil de crescimento e produção de proteínas totais foram variáveis para as rizobactérias isoladas dos nódulos das raízes da planta de arroz, dependendo da estirpe e do meio de cultura avaliado. O caldo batata propiciou resultados superiores a partir de 12 e 36 horas de incubação.
- As estirpes foram identificadas e classificadas com índice de formação de biofilme, produção de biomassa e viabilidade celular variáveis, sendo que cada rizobactéria apresentou comportamento específico nos diferentes meios de cultura avaliados. O melhor desempenho para índice de formação biofilme e viabilidade celular foi observado no meio YM com 14 e 12 estirpes respectivamente. Para biomassa total o meio CB apresentou 14 cepas com melhor desempenho, contra 6 do meio YM.
- Os isolados apresentaram a capacidade de síntese da auxina ácido indol-3-acético, variando de $0,207 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $33,212 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os isolados que apresentaram maior produção foram R82, R5, R134, R58, R73 e R30. As estirpes controle de maior produção foram as BR522 e BR322.
- A caracterização molecular através da amplificação da região espaçadora intergênica 16S-23S possibilitou agrupar as cepas em grupos com 100% de similaridade.
- O teste de germinação mostrou que o genótipo Caiapó possui taxa de germinação mais elevada, contudo a variedade Canastra possui maiores valores para número de ramificações, massa fresca da parte aérea e raiz e

massa seca raiz. Dos isolados selecionados, apenas a bactéria R5 propiciou aumento significativo no comprimento da raiz e da parte aérea nos genótipos testados.

7 BIBLIOGRAFIA

- ANDREOLA, F.; FERNANDES, S. A. P. A Microbiota do Solo na Agricultura Orgânica e no Manejo das Culturas. In: SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. (Ed.). Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental. São Paulo: **Instituto Agrônômico**, 2007. p. 21-37.
- ARANDA-SELVERIO, G.; PENNA, A. L.; CAMPOS-SÁS, L. F.; JUNIOR, O. S. VASCONCELOS, A. F. D.; SILVA, M. L. C.; LEMOS, E. G. M.; CAMPANHARO, J. L. M. S. Propriedades Reológicas e Efeito da Adição de Sal na Viscosidade de Exopolissacarídeos Produzidos por Bactérias do Gênero *Rhizobium*. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 895-899, 2010.
- BABALOLA, O. O. Beneficial Bacteria of Agricultural Importance. **Biotechnology Letters**, n. 32,1559-1570, 2010.
- BARRETO, M. C. S., FIGUEIREDO, M. V. B, BURITY, H. A., SILVA, M. L. R. B., LIMA-FILHO, J. L. Produção e Comportamento Reológico de Biopolímeros Produzidos por Rizóbios e Caracterização Genética. **Revista Brasileira de Agrociência**. V. 17, n.24, p. 221-227, 2011.
- BARTEL, B. Auxin Biosynthesis. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology** N. 48, 51–66, 1997.)
- BLOEMBERG, G. V., LUGTENBERG B. J. J., Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Current Opinion in Plant Biology**. v. 4, p. 343–350, 2001.
- BORRA R. C., LOTUFO, M. A., GAGIOTI, S. M., BARROS, F. M., ANDRADE, P. A. A Simple Method to Measure Cell Viability in Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Brazilian Oral Research**, v. 23, n. 3, p. 255-262, 2009.

- BONILLA, G. A. E. **Seleção de Bactérias Diazotróficas Solubilizadoras de Fósforo e seu Efeito no Desenvolvimento de Plantas de Arroz**. Rio de Janeiro, Dissertação Mestrado, 2011. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 86 f.
- BOURCIER, F. D.; WILLEMS, A.; COOPMAN, R.; LAGUERRE, G.; GILLIS, M.; LAJUDIE, P. Genotypic Characterization of Bradyrhizobium Strains Nodulating Small Senegalese Legumes by 16S-23S rRNA Intergenic Gene Spacers and Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprint Analyses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 99, p. 3987-3997, 2000.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRANDLAND, M. T.; LINDOW, S. E. Cloning and Characterization of a Locus Encoding an Indolepyruvate Decarboxylase Involved in Indole-3-Acetic Acid Synthesis in *Erwinia herbicola*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 11, 4121–4128, 1996. BRASIL.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**/ Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. –Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009, 399 p.
- BROEK, A. V.; LAMBRECHT, M.; EGGERMONT, K.; VANDERLEYDEN, J. Auxins Upregulate Expression of the Indole-3-Pyruvate Decarboxylase Gene in *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 4, 1338-1342, 1999.
- CARVALHO, T. L. G.; BALSEMÃO-PIRES, E.; SARÁIVA, R. M.; FERREIRA, P. C. G. HEMERLY, A. S. Nitrogen Signalling in Plant Interactions with Associative and Endophytic Diazotrophic Bacteria. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 19, p. 5631-5642, 2014.
- CASTELLANE, T. C.; **Análise de Polissacarídeos Essenciais para a Nodulação do Feijoeiro por *Rhizobium tropici* Cultivados em Diferentes**

Fontes de Carbono. Jaboticabal, São Paulo, Dissertação Mestrado, 2007. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 88 p.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N. Caracterização Genética de Rizóbio Isolado de Solos no Amazonas Baseada na Técnica de PCR-RFLP. **Ciências Agrárias**, v. 30, n. 4, p. 841-846, 2009.

CHAVES, L. C. D. **Estudo da Cinética de Formação de Biofilmes em Superfícies em Contacto com Água Potável.** Braga, Dissertação de Mestrado, 2004. Universidade do Minho, Escola de Engenharia Departamento de Engenharia Biológica, 99 p.

CHEN, H.; ZHANG Z. X.; ZHANG, G. M.; GUO, X. F.; ZHANG, H. S.; WANG, H. Liquid Chromatographic Determination of Endogenous Phytohormones in Vegetable Samples Based on Chemical Derivatization with 6-Oxy(acetylpiperazine) Fluorescein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, 4560–4564, 2010.

CHUEIRE, L. M. O.; BANGEL, E. V.; MOSTASSO, F. L.; CAMPO, R. J.; PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M. Classificação Taxonômica das Estirpes de Rizóbios Recomendadas para as Culturas da Soja e do Feijoeiro Baseada no Sequenciamento do Gene 16S rRNA. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, p. 833-840, 2003.

DAHECHA, I., FAKHFAKH, J., DAMAK, M., BELGHITH, H., MEJDOUB, H., BELGHITH, K. S. Structural Determination and NMR Characterization of a Bacterial Exopolysaccharide. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 59, p. 417-422, 2013.

DÁVILA, G.; GONZÁLES, V.; RAMÍRES-ROMERO, M. A.; RODRÍGUES, O. *Rizobium Etli* Genome Biology. In: PALACIOS, R.; NEWTON, W. E. (Ed.). *Genomes and Genomics of Nitrogen-fixing Organisms*. Netherlands, v. 3 **Springer & Business Media**, 2005. p. 133-143.

DENARDIN, N. D., 2007. Inoculação: por quê, quando e onde. **Revista Plantio Direto**, edição 100. Aldeia Norte Editora.

DIMKPA, C. O.; ZENG, J. MCLEAN, J. E. BRITT, D. W.; ZHAN, J. ANDERSON, A. J. Production of Indole-3-Acetic Acid via the Indole-3-Acetamide Pathway in the Plant-Beneficial Bacterium *Pseudomonas chlororaphis* O6 Is Inhibited by ZnO Nanoparticles but Enhanced by CuO Nanoparticles. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 5, 1404–1410, 2012.

DOBEREINER, J.; ANDRADE, V. O.; BALDANI, V. L. D. **Protocolos para Preparo de Meios de Cultura da Embrapa Agrobiologia**. Rio de Janeiro, 1999. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAB-2010/27335/1/doc110.pdf>> Acesso em: 03 jun. 2014.

DOLZANI, L.; TONIN, E.; LAGATOLLA, C.; PRANDIN, L.; MONTI-BRAGADIN, C. Identification of *Acinetobacter* isolates in the *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* Complex by Restriction Analysis of the 16S-23S rRNA intergenic spacer sequences. **Journal Clinical Microbial**, v.33, p. 1108-1113, 1995.

DOWNIE, J. A. The Roles of Extracellular Proteins Polysaccharides and Signals in the Interaction of Rhizobia with Legume Roots. **FEMS Microbial Reviews**, v. 34, p. 150-170, 2010.

DUCA, D.; LORV, J.; PATTEN, C. L.; ROSE, D.; GLICK, B. R. Indole-3-acetic acid in Plant–microbe Interactions. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 106, 85-125, 2014.

FERNANDES, J. R. C.; RODRIGUES, P. **Importância da Inoculação com Bactérias Rhizobium e Bradyrhizobium na Produção de Leguminosas e o Uso de Azoto**. Disponível em: <<http://www.agronegocios.eu/noticias/importancia-da-inoculacao-com-bacterias-rhizobium-e-bradyrhizobium-na-producao-de-leguminosas-e-o-uso-do-azoto/>> Acesso em: 16 de Dezembro de 2014.

- FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M. HUNGRIA, M. H. Caracterização Genética de Rizóbios Nativos dos Tabuleiros Costeiros Eficientes em Culturas do Guandu e Caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 8, p. 911-920, 2003.
- FERNANDES, P. I., ALMEIDA, J. P. S. PASSOS, S. R., OLIVEIRA, P. J., RUMJANEK, N. G., XAVIER, G. R. Produção e comportamento reológico de exopolissacarídeos sintetizados por rizóbios isolados de guandu. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 45, n. 12, p. 1465-1471, 2010.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: Um Programa para Análises e Ensino de Estatística. **Revista Symposium**, v. 6, p. 36-41, 2008.
- FREITAS, S. S. Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas. In: SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. (Ed.). **Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental**. São Paulo: Instituto Agronômico, 2007. p. 01-20.
- FREITAS, V. R., SAND, S. T. V. D., SIMONETTI, A. B. Formação in vitro de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* na superfície de canetas odontológicas de alta rotação. **Revista de Odontologia UNESP**, v. 39, p. 193-200, 2010.
- FUJISHIGE, N. A., KAPADIA, N. N. HOFF, P. L., HIRSCH A. M. Investigations of Rhizobium biofilm formation. **FEMS Microbiol Ecology**, Vol. 56 n° 2 195–206, 2006
- GARNETT, Tara;. Food sustainability: problems, perspectives and solutions. **Proceedings of the Nutrition Society**, 72, 29–39, 2013.
- GENIAUX, E. LAGUERRE G, AMARGER, N. Comparison of geographically distant populations of Rhizobium isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **Molecular Ecology** v. 2, p. 295-302, 1993
- GERMANO, M. G.; MENNA, P.; MOSTASSO, P. L.; HUNGRIA, M. RFLP analysis of the rRNA operon of a Brazilian collection of bradyrhizobial strains

from 33 legume species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 217–229, 2006.

GONZETLES, J. E.; YORK, G. M. WALKER, C. Meliloti Exopolysaccharides: Synthesis and Symbiotic Function. **Gene**, v. 179, p. 141-146, 1996.

GRANQVIST, E.; CAMP, O. D.; JUJIC, P.; HILL, L.; NORMAND, P.; MORRIS, R. J.; DOWNIE, J.; GEURTS, R. OLDROYD, G. E. Bacterial-induced Calcium Oscillations are Common to Nitrogen-Fixing Associations of Nodulating Legumes and Non-Legums. **New Phytologist**, v. 207, p. 551-558, 2015.

HAUKKA, K.; LINDSTROM, M, K.; YOUNG, J. P. W. Three phylogenetic groups of nodA and nifH genes in Sinorhizobium and Mesorhizobium isolated from leguminous trees growing in Africa and Latin America. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, p. 419-426, 1997.

HAYAT, R.; ALI, S. AMARA, U.; KHALID, R.; AHMED, I. Soil Beneficial Bacteria and Their Role in Plant Growth Promotion: a Review. **Annual Microbiol**, n. 60, 579-598, 2010.

HOFFMAN, B. M.; LUKOYANOV, D.; YANG, Z. Y.; DEAN, D. R.; SEEFELDT, L. C. Nitrogen Fixation by Nitrogenase: The Next Stage, **Chemical Reviews**, v. 114, p. 4041-4062, 2014.

HONRAETA, K.; GOETGHEBEURB, E.; NELIS, H. J. Comparison of Three Assays for the Quantification of Candida Biomass, in Suspension and CDC Reactor Grown Biofilms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 63 p. 287-295, 2005.

HUNGRIA, M., ARAUJO, R. S. Manual de Métodos Empregados em Estudos De Microbiologia Agrícola. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária 1º Ed. Ed. Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão, **Centro Nacional de Pesquisa de Soja**. Brasília, p. 45-57, 95-131, 157-170, 1994.

HUNGRIA, M.; SILVA, K. Manual de curadores de germoplasma – micro-organismos: rizóbios e bactérias promotoras do crescimento vegetal. Documentos 332. **Embrapa**. Brasília: Distrito Federal, 2011.

JHA, P. N.; GUPTA, G.; JHA, P.; MEHROTRA, R. Association of Rhizospheric/Endophytic Bacteria with Plants: A Potential Gateway to Sustainable Agriculture. **Greener Journal of Agricultural Sciences**, v. 3, n. 2, p. 73-84, 2013.

JENSEN, M. A.; WEBSTER, J. A.; STRAUS, N. Rapid Identification of Bacteria on the Basis of Polimerase Chain Reaction-Amplified Ribosomal DNA Spacer Polymorphisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 945-952, 1993.

KOBAYASHI, M.; IZUI, H.; NAGASAWAT, T.; YAMADA, H. Nitrilase in Biosynthesis of the Plant Hormone Indole-3-acetic acid from Indole-3-acetonitrile: Cloning of the *Alcaligenes* Gene and Site Directed Mutagenesis of Cysteine Residues. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, 247-251, 1993.

KUSS, A. V.; KUSS, V. V.; LOVATO, T.; FLÔRES, M. L.; Fixação de Nitrogênio e Produção de Ácido Indolacético *in vitro* por Bactérias Diazotróficas Endofíticas. **Pesquisa agropecuária brasileira.**, v.42, n.10, 1459-1465, 2007.

LAGUERRE, G.; MAVINGUI, P.; ALLARD, M. R.; CHARNAY, M. P.; LOUVRIER, P.; MAZURIER, S. I.; RIGOTTIER-GOIS, L.; AMARGER, N. Typing of rhizobia by PCR-DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: Application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 2029-2036, 1996.

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, p. 981-993, 2001.

LEMOS, E. G. M., ALVES, L. M. C. Short Communication: Resazurin Reducing Time as an Indicator of Bradyrhizobium Viable Cell Count. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 14, p. 139-141, 1998.

LONG, S. R. Rhizobium Symbiosis: Nod Factors in Perspective. **Plant Cell**, v. 8, p. 1885-1898, 1996.

MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M. DUNLAP, P. V. CLARK, D. P. Microbiologia de Brock. 10^o Ed. São Paulo, **Editora Pearson Education**. p. **725 – 729, 2010.**

MANO, Y.; NEMOTO, K. The Pathway of Auxin Biosynthesis in Plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 8, 2853–2872, 2012.

MARTINS, S. C. S.; MARTINS, C. M. Bactérias Diazotróficas: Potencial para Biorremediação de Ambientes Impactados. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, n. 17, p. 2708, 2013.

MARTINS, A. F.; OLIVEIRA, F. P.; VARGAS, L. K.; SCHLINDWEIN, G.; LISBOA, B. B.; DE SÁ, E. L. S. Influência da Inoculação de Rízobios Sobre a Germinação e o Vigor de Plântulas de Cornichão e Azevém. **Agropecuária Técnica**, v. 36, n. 1, p. 294-302, 2015.

MENDRYGAL, K. E.; GONZALEZ, J. E. Environmental Regulation of Exopolysaccharide Production in *Sinorhizobium meliloti*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 599–606, 2000.

MENESES, C. H. S. G., SERRATO, R. V., ROUWS, L. F. M., ARAÚJO, J. L. S., VIDAL, M. S., BALDANI, J. I. Produção, Extração e Quantificação de Exopolissacarídeos Sintetizados por *Gluconacetobacter Diazotrophicus* PAL5^T em Meio de Cultivo Líquido. **Comunicado Técnico Embrapa**, n. 122, 2009.

MERCANTE, F. M.; GOI, S. R.; FRANCO, A. A. Importância dos Compostos Fenólicos nas Interações entre Espécies Leguminosas e Rizóbio. **Revista Universidade Rural**, v. 22, n. 1, p. 65-81, 2002.

MISHRA, A., BRAYANATH, J. Microbial Exopolysaccharides. **The Prokaryotes**. 4 ed. Cap. 5 Springer, p. 179-192, 2013.

MONTEIRO, N. K.; ARANDA-SELVERIO, G.; EXPOSTI, D. T. D.; SILVA, M. L. C.; LEMOS, E. G. M.; CAMPANHARO, J. C.; SILVEIRA, J. L. M. Caracterização Química dos Géis Produzidos pelas Bactérias Diazotróficas *Rhizobium tropici* e *Mesorhizobium* sp. **Química Nova**, v. 35, n. 4, p. 705-708, 2012.

MOREIRA, F. M. S.; LANGE, A.; KLAUBERG-FILHO, O.; SIQUEIRA, J. O.; NÓBREGA, R. S. A.; LIMA, S. A. Associative Diazotrophic Bacteria in Grass Roots and Soils from Heavy Metal Contaminated Sites. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 80, n. 4, p. 749-761, 2008.

MOURE, V. R. **Controle da Atividade da Enzima Regulatória Dinitrogenase Redutase ADP-Ribosiltransferase (DraT) pela Proteína GlnB de *Azospirillum brasilense***. Curitiba, Tese de Doutorado, 2012. Universidade Estadual do Paraná, 113 p.

NAVES, P.; PRADO, G.; HUELVES, L.; GRACIA, M.; RUIZ, V.; BLANCO, J.; DHABI, G.; BLANCO, M.; PONTE, M. C.; SORIANO, F. Correlation Between Virulence Factors and *in vitro* Biofilm Formation by *Escherichia coli* Strains. **Microbial Pathogenesis**, v. 45, p. 86-91, 2008.

NEIVERTH, W. **Diversidade Morfológica e Genética de Rizobactérias Endofíticas Obtidas de Solos de Diferentes Classes e Manejos de Cultivo**. Paraná, Dissertação Mestrado, 2012. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 105 p.

NETO, D. D.; DARIO, G. J. A.; VIEIRA JÚNIOR, P. A.; MANFRON, P. A.; MARTIN, T. N.; BONNECARRÉRE, R. A. G.; CRESPO, P. E. N. Aplicação e

Influência do Fitorregulador no Crescimento das Plantas de Milho. **Revista Da FZVA**, v. 11, n. 1, 1-9, 2004.

OLIVEIRA, A. M. R.; BANGEL, E. V.; HUNGRIA, M.; SILVEIRA, J. R. P.; VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B. Caracterização da Região Espaçadora 16-23S rDNA para Diferenciação de estirpes de Rizóbios Utilizados na Produção de Inoculantes Comerciais no Brasil. **Ciência Rural**, n. 8, p. 1423-1429, 2012.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS-JUNIOR, A. F.; Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, 61-66, 2007.

ORRILLO, E. O.; GARCIDUENAS, L. E. S.; ROGEL, M. A.; GONZÁLES, V.; PERALTA, H.; MORA, J.; MARTÍNEZ-ROMERO, J.; MARTÍNÉZ-ROMERO, E. Taxonomy of Rhizobia and Agrobacteria from the Rhizobiaceae Family in Light of Genomics. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 38, p. 287-291, 2015.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm Formation as Microbial Development, **Annual Review Microbiology**, v. 54, p. 49-79, 2000.

PEETERS, E., HANS, J. N. COENYE, T. Comparison of Multiple Methods for Quantification of Microbial Biofilms Grown in Microtiter Plates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 72, p. 157-165, 2008.

PETTERS, J. W.; FISHER, K.; DEAN, D. R. Nitrogenase Structure and Function: A Biochemical-Genetic Perspective. **Annual Review Microbioly**, v. 49, p. 335-366, 1995.

PEREIRA, P. M. **Taxonomia e Diversidade Genética de Rizóbios Microssimbiontes de Distintas Leguminosas com Base na Análise Polifísica (Box-PCR e 16S rRNA) e na Metodologia de MLSA**. Londrina, Paraná, Tese de Doutorado, 2008. Universidade Estadual de Londrina, 104 p.

- PLYUTA, V., ZAITSEVA, j., LOBAKOVA, E., ZAGOSKINA, N., KUZNETSOV, A. KHMEL, I. Effect of Plant Phenolic Compounds on Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa*. **APMIS**, v. 121, p. 1073–1081 2013.
- PRINSEN, E.; CHAUVAUX, N.; SCHMIDT, J.; JHON M.; WIENEKE, U.; GREEF, J.; SCHELL, J.; ONCKELEN, H. V. Stimulation of Indol-3-acetic Production in *Rhizobium* by Flavonoids. **FEBS**, v. 282, 53-55, 1991.
- RADWAN, T. E. S. E. D.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Efeito da Inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na Produção de Compostos Indólicos em Plântulas de Milho e Arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 10, 987-994, 2004.
- RADWAN T. E. S. E. D.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M.; Aeração e Adição de Sais na Produção de Ácido Indol Acético por Bactérias Diazotróficas. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.40, n.10, 997-1004, 2005.
- RASHID, M. H., GONZALES, J. YOUNG J. P. W., JULY, M. W. *Rhizobium leguminosarum* is the Symbiont of Lentils in the Middle East and Europe but not in Bangladesh. **FEMS Microbiol Ecology** 87, p. 64-77, 2014.
- RECOUVREUX, D. O. S. **Produção de Celulose Bacteriana: Identificação do Operon bcs e Produção de Biofilme Celulósico por *Chromobacterium violaceum***. Florianópolis, Santa Catarina, Dissertação Mestrado em Engenharia Química, 2004. Universidade Federal de Santa Catarina, 124f.
- REIS JÚNIOR, F. B.; TEIXEIRA, K. R. S.; e REIS, V. M. Análises de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA) em Estudos de Diversidade Intra-Específica de *Azospirillum amazonense* Isolado de Diferentes Espécies de *Brachiaria*. **Embrapa**. Planaltina, Distrito Federal: Embrapa Cerrado, 2004.
- RINAUDI, L., FUJISHIGE, N. A., HIRSCH, A. M., BANCHIO, E., ZORREGUIETA, A.,GIORDANO, W. Effects of Nutritional and environmental

conditions on sinorhizobium meliloti biofil formation. **Research in Microbiology**, Vol. 157, p. 867–87, 2006.

RINAUDI, L. V., GIORDANO, W. An Integrated View of Biofilm Formation in Rhizobia. **FEMS Microbiology Letters**, v. 304, p. 1–11, 2010.

ROBLEDO, M., RIVERA, L., ZURDO J. I. J., RIVAS, R. DAZZO, F. VELÁZQUEZ, E., MOLINA. E. M., HIRSCH, A. M. MATEOS, P. M. Role of Rhizobium Endoglucanase CelC2 in Cellulose Biosynthesis and Biofilm Formation on Plant Roots and Abiotic Surfaces. **Microbial Cell Factories**, 11, p. 125, 2012.

ROCHA, G. P. **Bactérias Associativas e Simbiontes dos Nódulos de Arachis Pinto (Leguminosae)**. Feira de Santana, Bahia, Dissertação de Mestrado, 2007. Universidade Estadual de Feira de Santana, 112 p.

RUMJANEK, N. G.; FONSECA, M. C.; XAVIER, G. R. Quorum Sensing em Sistemas Agrícolas. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 3, p. 35-50, 2004.

SALA, V. M. R., SILVEIRA, A. P. D.; CARDOSO, E. J. B. N. Bactérias Diazotróficas Associadas a Plantas Não-Leguminosas. In: SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. (Ed.). Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental. **Instituto Agrônomo**, 2007. p. 97-115.

SANTI C.; BOGUSZ D.; FRANCHE C. Biological Nitrogen Fixation in Non-Legume Plants. **Annals of Botany**, v. 111, n. 5, p. 743-767, 2013.

SANTOS, L. A.; REIS, V. M.; A Formação do Nódulo em Leguminosas. Seropédica-RJ: **Embrapa Agrobiologia**, n. 251, p. 14, 2008.

SCHLINDWEIN, G.; VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B.; AZAMBUJA, A. C.; GRANADA, C. E.; GABIATTI, N. C.; PRATES, F.; STUMPF, R. Influência da Inoculação de Rizóbios Sobre a Germinação e o Vigor de Plântulas de Alface. **Ciência Rural**, v. 38, n. 3, 658-664, 2008.

- SHAMSELDIN, A. Molecular biodiversity and identification of free living Rhizobium strains from diverse Egyptian soils as assessed by direct isolation without trap hosts. **American Eurasian Journal of Agriculture & Environmental Science**, v. 4, n. 5, p. 541-549, 2008
- SILVA, F. V., SIMÕES, A. J. L., SILVA, J. J. P., XAVIER, G. R., RUMJANEK, N. G. Genetic Diversity of Rhizobia Isolates from Amazon Soils Using Cowpea (*Vigna unguiculata*) as Trap Plant. **Brazilian Journal of Microbiology**. p. 682-691, 2012.
- SILVA, M. L. R. B.; LIMA-FILHO, J. L. Produção e Comportamento Reológico de Biopolímeros Produzidos por Rizóbios e Caracterização Genética. **Revista Brasileira de Agraociência**, v. 17, n. 2, p. 221-227, 2011.
- SILVA, M. L. C., MARTINEZ, P. F., IZELI, N. L., SILVA, I. R. VASCONCELOS, A. F. D., CARDOSO, M. S. Caracterização Química de Glucanas Fúngicas e suas Aplicações Biotecnológicas. **Quimica Nova**, v. 29, n. 1, p. 85-92, 2006.
- SMIL, V. Global Population and the Nitrogen Cycle. **Scientific American**, p. 76-81, 1997.
- SOLANO, C.; ECHEVERZ, M.; LASA, I. Biofilm Dispersion and Quorum Sensing. **Current Opinion in Microbiology**, v. 18, p. 96-104, 2014.
- SOMERS, E.; PTACEK, D.; GYSEGOM, P.; SRINIVASAN, M.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum brasilense* Produces the Auxin-Like Phenylacetic Acid by Using the Key Enzyme for Indole-3-Acetic Acid Biosynthesis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 4, 1803-1810, 2005.
- SNEATH, P. H. A; SOKAL, R. R. **Numerical Taxonomy: The Principles and Practices of numerical classification**. San Francisco: W.A Freeman, 1973.

- SOUZA, D. M. CRUZ, C. H. G. **Produção Fermentativa de Polissacarídeos Extracelulares por Bactérias** Cien. Agr. Londrina. v. 25, n. 4, p. 331-340, 2004
- SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in Microbial and Microorganism-Plant Signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, 425–448, 2007.
- STAEHELIN, C.; SCHULTZE, M.; KONDOROSI, E.; KONDOROSI, A.; Lipo-Chitooligosaccharide Nodulation Signals from *Rhizobium meliloti* Induce their Rapid Degradation by the Host Plant Alfafa. **Plant Physiology**, v 108, p. 1607-1614, 1995.
- STANLEY, N. R.; LAZAZZERA, B. A. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. **Molecular Microbiology**, v. 54, n. 4, 917-924, 2004.
- STAUDT, A. K., LAWRENCE, G. W., SHROUT, J. D. Variations in Exopolysaccharide Production by *Rhizobium tropici*. **Archives of Microbiology**, v. 194, p. 197-206, 2012.
- STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N.G. Aplicação e Evolução dos Métodos Moleculares para o Estudo da Biodiversidade do Rizóbio. Seropédica: **Embrapa Agrobiologia** (Embrapa-CNPAB), n. 93, p. 58, 1999.
- STROSCHEIN, M. R. D.; SACCOL, E. L.; MACHADO, R. G.; CABRAL, T. L.; BRUXEL, M.; GIONGO, A.; FONTURA, R. C. Characterization and Influence of Alfafa Rhizobia on Germination and Early Growth of Rice Seedling. **Ciência Rural**, v. 41, n. 10, p. 1738-1743, 2011.
- SUGAWARA, S.; HISHIYAMAC, S.; JIKUMARUA, Y.; HANADAA, A. NISHIMURAB, T.; KOSHIBAB, T.; ZHAOD, Y.; KAMIYAA, Y.; KASAHARAA. H. Biochemical Analyses of Indole-3-acetaldoxime Dependent Auxin Biosynthesis in *Arabidopsis*. **PNAS**, v. 106, n. 13, 5430-5435, 2009.

SUGAWARA, S.; MASHIGUCHI, K.; TANAKA, K. HISHIYAMA, S.; SAKAI, T.; HANADA, K.; KINOSHITA-TSUJIMURA, K.; YU, H.; DAI, X.; TAKEBAYASHI, Y.; TAKEDA-KAMIYA, N.; KAKIMOTO, T.; KAWAIDE, H.; NATSUME, M.; ESTELLE, M.; ZHAO, Y.; HAYASHI, K. I.; KAMIYA, Y.; KASAHARA, H. Distinct Characteristics of Indole-3-Acetic Acid and Phenylacetic Acid, Two Common Auxins in Plants. **Plant Cell Physiology**, v. 0, 1-14, 2015.

TAN, Z.; HUREK, T.; VINUESA, P.; MULLER, P.; LADHA, J.; REINHOLD-HUREK, B. Specific Detection of Bradyrhizobium and Rhizobium Strains Colonizing Rice (*Oryza sativa*) Roots by 16S-23S Ribosomal DNA Intergenic Spacer-Targeted PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 3655-3664, 2001.

TOLEDO, B. F. B.; MARCONDES, J.; LEMOS, E. G. M. Caracterização de Rizóbios Indicados para Produção de Inoculantes por Meio de Sequenciamento Parcial do 16S rRNA. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 4, p. 384-391, 2009.

TORTORA G. J.; FUNKE, B. R., CASE, C. L. Microbiologia, 10^o Ed. Porto Alegre, **Artmed**, 2012. P. 30

TSAVKELOVA, E.; OESER, B.; OREN-YOUNG, L.; ISRAELI, M.; SASSON Y.; TUDZYNSKI, B.; SHARON, A. Identification and Functional Characterization of Indole-3-acetamide Mediated IAA Biosynthesis in Plant-Associated *Fusarium* Species. **Fungal Genetics and Biology**, n. 49, 48-57, 2012.

VAN-DEN-BOS, R. C.; ROELVINK, P. W. Symbiotic Nitrogen Fixation by Rhizobium; Regulation of NIF and FIX genes. **Applied Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 1-21, 1990.

VINUESA, P.; RADEMAKER, J. L. W.; BRUIJN, F. J.; WERNER, D. Genotypic Characterization of Bradyrhizobium Strains Nodulating Endemic

Woody Legumes of the Canary Islands by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Genes Encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA Intergenic Spacers, Repetitive Extragenic Palindromic PCR Genomic Fingerprinting, and Partial 16S rDNA Sequencing. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 2086-2104, 2014

WIEDMANN, D. D., MCLANDSBOROUGH, L. A. Microtiter Plate Assay for Assessment of *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 2950-2958, 2002.

YILDIZ, S. Y., ANZELMO, G., OZER, T. RADCHENKOVA, N., GENÇ, S., DONATO, P. D. NICOLAUS, B. *Brevibacillus themoruber*: a promising microbial cell factory for exopolysaccharide production. **Journal of Applied Microbiology**. v. 6, n. 2, p. 314-324, 2014.

YOUNG, J. P. W.; DOWNER, H. L.; EARDLY, B. D. Phylogeny of phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA segment. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 7, p. 2271-2277, 1991.