



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS  
CAMPUS ANÁPOLIS DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS - CCET  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS APLICADAS  
A PRODUTOS PARA SAÚDE (PPG-CAPS)

LUCAS LEONARDO DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE BACTÉRIAS  
ASSOCIADAS A *Oryza sativa* L. PRODUTORAS DE  
BIOCOMPOSTOS**

Anápolis-GO  
Agosto, 2017

LUCAS LEONARDO DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE BACTÉRIAS  
ASSOCIADAS A *Oryza sativa* L. PRODUTORAS DE  
BIOCOMPOSTOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação *Stricto Senso* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (nível mestrado) da Universidade Estadual de Goiás como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Cristina Garcia Martin Didonet

Co-orientador: Prof. Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves.

Anápolis-GO  
Agosto, 2017

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UEG com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

LL581c      Leonardo-Silva, Lucas  
Caracterização bioquímica e molecular de bactérias associadas a *Oryza sativa* L. produtoras de biocompostos / Lucas Leonardo da Silva; orientador Cláudia Cristina Garcia Martin Didonet; co-orientador Plínio Lázaro Faleiro Naves. -- Anápolis, 2017.  
106 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação Mestrado Acadêmico em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde) -- Câmpus-Anápolis CET, Universidade Estadual de Goiás, 2017.

1. Bactérias endofíticas. 2. Arroz. 3. Biotecnologia. 4. Enzimas. 5. Exopolissacarídeos. I. Martin-Didonet, Cláudia Cristina Garcia, orient. II. Naves, Plínio Lázaro Faleiro, co-orient. III. Título.

**Lucas Leonardo da Silva**

**“Caracterização bioquímica e molecular de bactérias associadas a *Oryza sativa* L. produtoras de biocompostos”**

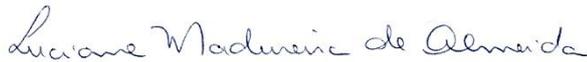
Dissertação defendida no Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde da Universidade Estadual de Goiás, para a obtenção do título de Mestre, aprovada em 30 de junho de 2017, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



Profa. Dra. Cláudia Cristina Garcia Martin Didonet  
Presidente da Banca  
UEG/CCET



Profa. Dra. Karina Freire d'Eça Nogueira Santos  
Membro Interno  
UEG



Profa. Dra. Luciane Madureira de Almeida  
Membro Externo  
UEG

## **DEDICO**

Aos meus pais, Eurico Fernandes da Silva (*in memoriam*) e  
Irene Pereira Leonardo da Silva.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado força para superar todas as dificuldades e ter me ajudado a chegar até aqui e não desistir.

Agradeço a minha família, pelo amor, carinho, compreensão e apoio. Principalmente a minha mãe Irene Pereira e a minha irmã Francielli Leonardo pelo incentivo nas horas difíceis e apoio incondicional.

À Profa. Dra. Cláudia Cristina Garcia Martin Didonet pela orientação, dedicação, ensino, paciência e inúmeras sugestões que foram decisivas e imprescindível na execução deste. À Profa. Dra. Karina Freire d'Eça Nogueira Santos e ao Prof. Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves pelo auxílio e sugestões em parte da pesquisa.

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) pelo apoio financeiro.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos.

À Profa. Dra. Solange Xavier dos Santos e à Profa. Dra. Andréia Juliana Leite Rodrigues pelo incentivo, suporte e contribuição na minha formação acadêmica.

Meus agradecimentos a todos meus amigos que fizeram parte da minha formação. Agradeço à Izabel Cristina, Camila Sabino, Jessica Pires, Kássia Roberta e Luana Maria pelo incentivo e apoio.

Agradeço especialmente à Larissa Batista por ser mais do que uma companheira, obrigado pelas inúmeras correções e sugestões que com certeza contribuíram de forma significativa para elaboração deste.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu obrigado!

*“A persistência é o menor caminho do êxito”*

**Charles Chaplin**

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIACÕES.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xiv</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xvi</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xvii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
2.1 Objetivo geral.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>21</b>
3.1 Bactérias do solo .....	21
3.2 A cultura de arroz.....	22
3.3 Fixação biológica do nitrogênio atmosférico em gramíneas...	24
3.4 Diversidade e taxonomia microbiana.....	25
3.5 Produção de biocompostos.....	26
3.5.1 Enzimas bacterianas.....	27
3.5.2 Exopolissacarídeos bacterianos.....	28
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
4.1 Material biológico.....	33
4.2 Manutenção dos isolados bacterianos.....	34
4.3 Caracterização das colônias bacterianas.....	34
4.4 Coloração de Gram.....	34
4.5 Caracterização bioquímica.....	35
4.5.1 Avaliação de tolerância a antibióticos.....	35
4.5.2 Teste de crescimento em fontes de carbono.....	35
4.5.3 Avaliação enzimática.....	36
4.5.4 Detecção de sideróforos.....	37
4.6 Caracterização genotípica.....	37
4.6.1 Extração do DNA.....	37

4.6.2 Amplificação da região espaçadora intergênica 16S-23S rRNA (IGS).....	38
4.7 Análise dos dados.....	39
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>40</b>
5.1 Caracterização morfológica.....	40
5.1.1 Coloração de Gram.....	45
5.2 Caracterização bioquímica.....	47
5.2.1 Avaliação de tolerância a antibióticos.....	47
5.2.2 Teste de crescimento em fontes de carbono.....	49
5.2.3 Avaliação enzimática.....	53
5.2.3.1 Teste de catalase.....	53
5.2.3.2 Enzimas hidrolíticas.....	53
5.2.3.3 Solubilização de fosfato inorgânico.....	59
5.2.3 Detecção de sideróforo pelo método de CAS.....	61
5.2.4 Análise de similaridade para as características bioquímicas.....	63
5.3 Caracterização genotípica.....	65
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>72</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>73</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>100</b>

## LISTA DE ABREVIações

C - carbono

CMC - carboximetilcelulose

EC - *enzyme commission*

EPS - exopolissacarídeo

FBN - fixação biológica do nitrogênio

FDA - *food and drug administration*

g - gramas

h - horas

IGS - região espaçadora intergênica 16S-23S rRNA

IE - índice enzimático

IS - índice de solubilização

J - coeficiente de Jaccard

L - litro

mL - mililitros

mm - milímetro

mM - milimolar

N - nitrogênio

NBRI-P - *national botanical research institute phosphate*

nm - nanômetro

$\varnothing_c$  - diâmetro médio da colônia

$\varnothing_h$  - diâmetro médio do halo de degradação

Pb - pares de bases

PGPR - *plant growth promoting rizobacteria*

PVK - Pikovskaya

RPCP - rizobactérias promotoras do crescimento de plantas

RPM - rotações por minuto

UPGMA - *unweighted pair group method with arithmetic mean*

YM - *yeast mannitol*

$\mu\text{g}$  - micrograma

$\mu\text{L}$  - microlitro

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Etapas realizadas para obtenção dos isolados bacterianos associados à planta de arroz..... **33**
- Figura 2:** Tipos de pigmentos observados em isolados associados à planta de arroz (*Oryza sativa* L.) cultivados em meio YMA por 48h A: creme (R130); B: amarelada (R59); C: rósea (R21B)..... **43**
- Figura 3:** Dendrograma de similaridade gerado pelo software NTSYS-pc® 2.10 com base nas características morfológicas de isolados bacterianos associados à planta de arroz e três estirpes de referência *R. tropici* (BR322 e BR520) e *A. brasilense* (FP2) utilizando o coeficiente de Jaccard, por intermédio do algoritmo UPGMA. Foi considerado 70% de similaridade como ponto de corte para o agrupamento dos isolados..... **45**
- Figura 4:** Coloração de Gram em objetiva de imersão (100 x). A: bacilos Gram-positivo (R20); B: bacilos Gram-negativo (R145); C: cocos Gram-positivo (R18); D: cocos Gram-negativo (R50)..... **46**
- Figura 5:** Percentual do uso de fontes de carbono utilizadas por 22 isolados bacterianos associados à planta de arroz..... **49**
- Figura 6:** Dendrograma de similaridade gerado pelo software NTSYS-pc® 2.10 com base no uso de fontes de carbono por isolados bacterianos associados à planta de arroz e três estirpes de referência *R. tropici* (BR322 e BR520) e *A. brasilense* (FP2) utilizando o coeficiente de Jaccard, por intermédio do algoritmo UPGMA. Foi considerado 70% de similaridade como ponto de corte para o agrupamento dos isolados..... **52**

- Figura 7:** Halo de degradação enzimática do substrato (fonte de carbono). A: amilase; B: celulase; C: lipase; D: protease..... 54
- Figura 8:** Percentagem dos testes de enzimas hidrolíticas dos 22 isolados bacterianos associado à planta de arroz a partir de métodos semi-quantitativos..... 54
- Figura 9:** Método colorimétrico para detecção de sideróforo para os isolados bacterianos associados à planta de arroz e três estirpes de referência *R. tropici* (BR322 e BR520) e *A. brasilense* (FP2). A, B e C: triplicatas..... 62
- Figura 10:** Dendrograma de similaridade gerado pelo software NTSYS-pc® 2.10 com base na caracterização bioquímica dos isolados bacterianos associados à planta de arroz e três estirpes de referência *R. tropici* (BR322 e BR520) e *A. brasilense* (FP2) utilizando o coeficiente de Jaccard, por intermédio do algoritmo UPGMA. Foi considerado 60% de similaridade como ponto de corte para o agrupamento dos isolados..... 63
- Figura 11:** Perfil eletroforético em gel de agarose (1,3%) obtido através da amplificação da região espaçadora intergênica 16S-23S rRNA por PCR de 22 isolados associados à planta de arroz e três estirpes de referência *R. tropici* (BR322 e BR520) e *A. brasilense* (FP2)..... 66
- Figura 12.** Dendrograma de similaridade gerado pelo software NTSYS-pc® 2.10 com base no perfil eletroforetico da região espaçadora intergênica (16S-23S rRNA) dos isolados bacterianos associados à planta de arroz e três estirpes de referência *R. tropici* (BR322 e BR520) e *A. brasilense* (FP2) definido pelo algoritmo UPGMA utilizando o coeficiente de Jaccard. Foi considerado 50% de similaridade como ponto de corte para o agrupamento dos isolados..... 67

**Figura 13.** Dendrograma de similaridade gerado pelo software NTSYS-pc® 2.10 com base na análise polifásica dos isolados bacterianos associados à planta de arroz e três estirpes de referência *R. tropici* (BR322 e BR520) e *A. brasilense* (FP2) definido pelo algoritmo UPGMA utilizando o coeficiente de Jaccard. Foi considerado 60 % de similaridade como ponto de corte para o agrupamento dos isolados..... **70**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Propriedades e aplicações de exopolissacarídeos produzidos por alguns gêneros bacterianos.....	<b>31</b>
<b>Tabela 2:</b> Condições utilizadas para detecção da atividade enzimática dos 22 isolados associados à planta de arroz e três estirpes de referência <i>R. tropici</i> (BR322 e BR520) e <i>A. brasilense</i> (FP2).....	<b>36</b>
<b>Tabela 3:</b> Condições de termociclagem estabelecidas para amplificação da região espaçadora intergência 16S-23S rRNA para os isolados associados à planta de arroz e três estirpes de referência <i>R. tropici</i> (BR322 e BR520) e <i>A. brasilense</i> (FP2).....	<b>38</b>
<b>Tabela 4:</b> Características morfológicas observadas em 22 isolados bacterianos associados à planta de arroz ( <i>Oryza sativa</i> L.) e três estirpes de referência <i>R. tropici</i> (BR322 e BR520) e <i>A. brasilense</i> (FP2), cultivadas em meio YMA por 48h.....	<b>40</b>
<b>Tabela 5:</b> Avaliação da resistência dos 22 isolados associados à planta de arroz e três estirpes de referência <i>R. tropici</i> (BR322 e BR520) e <i>A. brasilense</i> (FP2) para concentração de 200 µg mL <sup>-1</sup> dos antibióticos ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, tetraciclina e ácido nalidixico.....	<b>48</b>
<b>Tabela 6:</b> Avaliação da resistência dos 22 isolados associados à planta de arroz e três estirpes de referência <i>R. tropici</i> (BR322 e BR520) e <i>A. brasilense</i> (FP2) para diferentes concentrações (30 µg mL <sup>-1</sup> , 50 µg mL <sup>-1</sup> , 100 µg mL <sup>-1</sup> e 200 µg mL <sup>-1</sup> ) dos antimicrobianos Ampicilina, Cloranfenicol, Estreptomicina, Tetraciclina e Ácido nalidixico.....	<b>105</b>

<b>Tabela 7:</b> Uso de diferentes fontes de carbono, atividade enzimática e produção de sideróforo para 22 isolados bacterianos associados à planta de arroz e três estirpes de referência <i>R. tropici</i> (BR322 e BR520) e <i>A. brasilense</i> (FP2).....	<b>106</b>
<b>Tabela 8:</b> Índice enzimático para os 22 isolados bacterianos associados à planta de arroz e três estirpes de referência <i>R. tropici</i> (BR322 e BR520) e <i>A. brasilense</i> (FP2).....	<b>56</b>
<b>Tabela 9:</b> Índice de solubilização de fosfato dos 22 isolados bacterianos associados à planta de arroz e três estirpes de referência <i>R. tropici</i> (BR322 e BR520) e <i>A. brasilense</i> (FP2).....	<b>60</b>

## RESUMO

As bactérias associadas ao arroz e a outras culturas de interesse agrícola são comumente conhecidas como rizobactérias promotoras do crescimento de plantas. Essas constituem um diversificado e numeroso grupo de bactérias do solo, que quando associados a essas plantas, atuam direta e indiretamente no seu crescimento, além de possuírem grande potencial biotecnológico. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização morfológica, bioquímica e genética de isolados bacterianos associadas à planta de arroz (*Oryza sativa* L.) quanto à produção de biocompostos. Um total de 22 isolados foram selecionados usando o meio semisseletivo extrato de levedura-manitol (YMA). A caracterização dos isolados foi realizada: 1) quanto aos aspectos macroscópicos observados nas colônias; 2) quanto as características bioquímicas (resistência a antibióticos, capacidade de crescimento em diferentes fontes de carbono, produção de enzimas hidrolíticas, solubilização de fosfato inorgânico e detecção de sideróforos); 3: quanto a caracterização molecular (análise da região intergênica 16S-23S rRNA). Entre as características das colônias houve uma dominância de isolados de crescimento rápido (68%), consistência gomosa (68%) e com produção de muco (73%). Os testes bioquímicos mostraram que 90% dos isolados de arroz são capazes de metabolizarem monossacarídeos e dissacarídeos. Todos os isolados apresentaram crescimento em meio com ácido nalidíxico e 91% demonstram sensibilidade a estreptomicina. Para os ensaios enzimáticos 95% dos isolados foram positivos para catalase, 41% foram positivos para atividade proteolítica, 36% celulolítica, 32% amilolítica, 23% lipolítica e 59% apresentam capacidade de solubilização de fosfato inorgânico. Apenas 27% dos isolados foram capazes de produzir sideróforos. Dentre os testes bioquímicos realizados foi possível observar que 86,3% dos isolados são potenciais promotores do crescimento de plantas, com destaque para os isolados R59, R68 e R141. Na análise da região intergênica 16S-23S rRNA foi observada uma diversidade genética com a presença de mais de um fragmento de tamanhos diferentes indicando variabilidade da região entre os isolados avaliados. Assim, os resultados sugerem alta diversidades metabólica e genética dos isolados associados a planta de arroz, sendo alguns candidatos em potencial para estudos de prospecção para produção de bioprodutos e como promotores do crescimento de plantas.

**Palavras-chaves:** Arroz, Microrganismo, Enzimas, Exopolissacarídeos, Biotecnologia, Bactérias endofíticas.

## ABSTRACT

Bacteria associated with rice and crops of agricultural interest are common known as plant growth promoting rhizobacteria. These constitute a diverse and numerous group of soil bacteria, which, when associated with these plants, act directly and indirectly in their growth, besides possessing great biotechnological potential. Thus, the goal of this work was to perform the morphological, biochemical and genetic characterization of bacterial isolates associated with the rice plant (*Oryza sativa* L.) that produce biocompounds. A total of 22 isolates were selected using the yeast-extract mannitol (YMA) semi-selective medium. The characterization of the isolates was performed: 1) by macroscopic aspects observed on the colonies; 2) biochemical characterization (resistance to antibiotics, use of carbon sources, hydrolytic enzymes production, inorganic phosphate solubilization and detection of siderophores) and 3) molecular characterization (16S-23S rRNA intergenic analysis). Among the characteristics of the colonies there was a dominance of isolates fast-growing (68%), with mucus production (73%) and had viscous colony (68%). For biochemical assays 90% of the rice isolates used the monosaccharides and disaccharides. All the isolates showed growth in medium with nalidixic acid and 91% were more sensitive to the streptomycin. For Enzymatic assays 95 % of the isolates were positive for catalase, 41% were positive for proteases, 36% cellulose, 32% amylases, 23% lipases and 59 % for P solubilization ability. 27% of the isolates were able to produce siderophores. From the biochemical assays, it was possible to observe that 86.3% of the isolates are potential plant growth promoting, with three promising isolates R59, R68 and R141. Intergenic analysis (16-23S rRNA) revealed a genetic diversity, more than one fragment of different sizes indicating variability of the region among the evaluated isolates. Thus, the results suggest high metabolic and genetic diversity of the isolates associated with the rice plant, and some at them are potential candidates for prospecting studies for the production of bioproducts and plant growth promoting.

**Key words:** Rice, Microorganism, Enzymes, Exopolysaccharides, Biotechnology, Endophytic bacteria.

## 1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é o segundo cereal mais cultivado no mundo e um dos principais alimentos para grande parte da população. O Brasil é o nono maior produtor mundial deste cereal, e na safra de 2016/2017, a produção está estimada em torno de 12 milhões de toneladas (FERREIRA et al. 2014; CONAB, 2017).

A produção de arroz em grande escala está diretamente relacionada ao uso de doses elevadas de fertilizantes químicos que apresentam elevado custo de produção, e ainda podem ser poluentes ambientais em potencial (SILVA et al. 2004). No Brasil, o custo dos fertilizantes correspondem em média a 23,2% dos gastos gerados pela produção do arroz (CONAB, 2016). Nesse contexto, práticas alternativas que visam à sustentabilidade da atividade agrícola vêm sendo estudadas buscando reduzir o custo de produção e a emissão de poluentes ambientais (GUIMARÃES e BALDANI, 2013). Entre as alternativas, o uso de inoculantes produzidos a partir de bactérias endofíticas capazes de realizar a fixação biológica do nitrogênio (FBN), têm sido empregados na agricultura, sendo uma opção eficiente ao uso de fertilizantes derivados de fontes não renováveis (FERREIRA et al. 2014).

As bactérias endofíticas podem colonizar o interior dos tecidos de alguns vegetais sem causar danos por sua presença, e têm sido mencionadas em vários estudos como rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP) ou *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) (SOUZA, 2001; PEIXOTO-NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002; ESPOSITO-POLESI, 2011). Alguns grupos dessas bactérias RPCP atuam diretamente no crescimento vegetal, seja na obtenção de nutrientes como fósforo e nitrogênio ou na produção de fitohormônios (ácido indolacético, citocinina, etileno e giberelina). Indiretamente, podem diminuir os efeitos adversos causados por agentes patogênicos as plantas, atuando no controle biológico devido a produção de compostos como antibióticos, enzimas líticas e sideróforos (GLICK, 2012).

Os estudos de diversidade metabólica de bactérias também possuem grande interesse do ponto de vista biotecnológico e podem levar ao desenvolvimento de produtos de reconhecido valor econômico (CASTELLANE e LEMOS, 2007; SZILAGYI-ZECCHIN et al. 2014). Seus metabólitos primários e secundários de interesse biotecnológico apresentam atividade enzimática, como a produção de

proteases, amilases, lipases, esterases e outros biopolímeros como exopolissacarídeos (EPS's) (STROBEL e DAISY, 2003; CARRIM; BARBOSA e VIEIRA, 2006; TEJESVI et al. 2007).

Há um interesse crescente em caracterizar a diversidade bacteriana para que seu potencial industrial e comercial seja explorado, visto que, tanto as enzimas como os EPS produzidos por bactérias endofíticas já foram amplamente estudados do ponto de vista da interação planta/bactéria. Neste contexto, a caracterização de bactérias associadas à plantas de arroz pode contribuir para a seleção e identificação de isolados promissores para utilização na formulação de bioprodutos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 *Objetivo geral*

Realizar a caracterização morfológica, bioquímica e genética de isolados bacterianos associadas à planta de arroz (*Oryza sativa* L.) quanto à produção de biocompostos.

### 2.2 *Objetivos específicos*

- I. Selecionar, de 200 isolados obtidos de arroz, bactérias que apresentarem melhor crescimento em meio de cultivo YMA;
- II. Caracterizar a resistência e tolerância dos isolados selecionados a cinco antibióticos: ácido nalidíxico, ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina e tetraciclina;
- III. Caracterizar o crescimento bacteriano dos isolados selecionados quanto à utilização de 14 fontes de carbono distintas;
- IV. Determinar a presença das enzimas extracelulares (amilase, celulase, lipase e protease) e capacidade de solubilização de fosfato inorgânico para os isolados bacterianos selecionados;
- V. Caracterizar genotipicamente os isolados selecionados pela análise da região espaçadora intergênica (16S-23S rRNA);
- VI. Determinar a similaridade dos 22 isolados associados a planta de arroz por meio da análise de agrupamento.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Bactérias do solo

Os microrganismos como fungos, leveduras e bactérias podem ser encontrados em diversos *habitats* e o solo, devido sua heterogeneidade física, química e biológica, representa um dos maiores reservatórios de diversidade microbiana, constituindo um importante recurso para a exploração biotecnológica (MARON; MOUGEL e RANJARD, 2011). Diversas funções de importância ecológica, como: decomposição da matéria orgânica, degradação de substâncias xenobióticas, controle biológico de patógenos e solubilização de minerais, são realizadas por esses microrganismos, contribuindo assim para a estruturação e agregação do solo (TORSVIK e ØVREAS, 2002; SCHLOTTER; DILLY e MUNCH, 2003; ARAÚJO, 2011; KUJUR; GARTIA e PATEL, 2012).

No solo existe uma infinidade de espécies de bactérias, as quais podem viver livremente ou estarem associadas à plantas, estabelecendo uma importante relação planta-solo-bactéria fundamental à sustentabilidade agrícola. A rizosfera é definida como região do solo que recebe influência direta das raízes e possibilita a proliferação microbiana, onde se encontra o maior número de rizobactérias (CARDOSO e NOGUEIRA, 2007). Estas podem ser agrupadas de acordo com o grau de proximidade com a raiz e a intimidade da associação. Assim são classificadas como: 1) rizobactérias epifíticas, quando vivem na rizosfera (superfície entre raiz e o solo); 2) endofíticas, quando vivem entre os espaços intercelulares do córtex radicular; e 3) rizobactérias intracelulares, quando existem dentro das células da raiz, geralmente em estruturas especializadas como os nódulos (CARDOSO e NOGUEIRA, 2007).

Dentro dessa classificação, as bactérias endofíticas estão presentes no interior dos tecidos de suas plantas hospedeiras e tem sido amplamente estudadas (HALLMANN et al. 1997; ZINNIEL et al. 2002). Segundo Hallmann et al. (1997), esses microrganismos penetram ativamente nos tecidos de plantas utilizando enzimas hidrolíticas como celulasas e pectinases, sendo agrupados em dois tipos: tipo I, os microrganismos que não produzem estruturas externas à planta, como os nódulos; e o tipo II, os que produzem estruturas externas, onde há inserção dos rizóbios e micorrizas (MENDES e AZEVEDO, 2007).

As bactérias endofíticas têm sido mencionadas em diversos estudos como rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP), pois são capazes de fixar biologicamente o nitrogênio (FBN) atmosférico (VARGAS e HUNGRIA, 1997). Essas tem demonstrado grande capacidade em colonizar diversas espécies de gramíneas de importância econômica, sendo estudadas principalmente para o desenvolvimento de práticas agrícolas sustentável (MBAI et al. 2013; GUIMARÃES e BALDANI, 2013).

### **3.2 A cultura de arroz**

O arroz é uma gramínea monocotiledônea do gênero *Oryza*, que possui aproximadamente 20 espécies, sendo a mais cultivada a *Oryza sativa* L. (JULIANO, 1993). Considerado alimento básico de grande parte da população mundial, o arroz é um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo. Cerca de 70% do consumo calórico dos países asiáticos é proveniente do arroz e seus subprodutos (FAO, 2004). Atualmente, no Brasil, o cereal ocupa o terceiro lugar em área cultivada com culturas anuais (CONAB, 2015).

Segundo Vieira e Carvalho (1999), o cultivo de arroz no país, representa uma das principais fontes de renda agrícola de alguns estados. A região Sul é a principal produtora de arroz no país, com 77% da produção nacional da safra 2014/2015, sendo o estado do Rio Grande do Sul (RS) contribuindo com 68% dessa produção. A região Centro-Oeste, onde está localizado o estado de Goiás, é a penúltima colocada no ranking das regiões, com 6,5% do total produzido (CONAB, 2015).

Grande parte da produção de arroz é destinada ao consumo humano devido sua importante contribuição nutricional, fornecendo 20% da energia e 15% das proteínas necessárias ao ser humano, além de conter vitaminas, sais minerais, fósforo, cálcio e ferro (FAO, 2004). Por ser uma cultura que apresenta adaptabilidade às mais variadas condições ambientais, é considerada uma espécie de grande potencial de aumento de produtividade e combate a fome no mundo (AZAMBUJA; VERNETTI-JUNIOR e MAGALHÃES-JUNIOR, 2004; SANTOS; STONE e VIEIRA, 2006). Entretanto, o aumento na produção de arroz requer a interação de vários fatores e disponibilidade de nutrientes que sejam suficientes para suprir suas necessidades (PACHECO, 2008).

Juntamente com a água, as plantas absorvem os nutrientes na forma de íons inorgânicos através das raízes. Dentre esses, há a necessidade das plantas em absorver em quantidades superiores o nitrogênio (N), fósforo (P), enxofre (S), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg), que são chamados de macronutrientes. Já o ferro (Fe), manganês (Mn), zinco (Zn), cobre (Cu), boro (B) molibdênio (Mo) e cloro (Cl), requeridos em menores quantidades, são denominados de micronutrientes (VELOSO et al. 2009). Mesmo em concentrações distintas, todos os nutrientes são essenciais e desempenham funções específicas no vegetal, sendo a concentração ideal de cada diferente na produção das culturas (VELOSO et al. 2009). No caso do arroz, Fageria e Barbosa-filho (2006), revelam os valores adequados para presença de macro e micronutrientes, o qual varia entre os estágios de crescimento e partes da planta.

O nitrogênio é o nutriente que mais influencia a produtividade do arroz, sendo responsável pelo aumento da área foliar da planta, elevando à taxa de fotossíntese e conseqüentemente sua produção. Também participa na formação da panícula e dos grãos de arroz, além de compor as moléculas de clorofila, citocromos, enzimas e coenzimas (BARBOSA-FILHO, 1987; VELOSO et al. 2009). Devido sua importância e mobilidade no solo, muitos estudos têm buscado aperfeiçoar o uso do nitrogênio, a fim de melhorar o processo de absorção e metabolização do elemento no interior do vegetal (BREDEMEIER e MUNDSTOCK, 2000). Como conseqüência, a adubação nitrogenada está entre as práticas agrícolas mais empregadas para o aumento na produção de culturas (RAIJ, 1991).

Segundo Bhattacharjee et al. (2008), a adubação nitrogenada é uma prática onerosa e requer quantidade elevada de N mineral, pois em média são perdidos 65% de sua totalidade, ocasionado principalmente pela lixiviação, erosão, emissões gasosas e desnitrificação. Esta perda de N pode levar a eutrofização de lagoas, acidificação do solo, acúmulo de metais pesados no solo, contaminação dos sistemas aquíferos, aumento do efeito estufa e mudanças no ciclo global de nitrogênio (NEIVERTH, 2012).

Nesse contexto, práticas alternativas ao uso de fertilizantes nitrogenados na cultura do arroz vêm sendo estudadas buscando reduzir o custo de produção e a emissão de poluentes ambientais (GUIMARÃES e BALDANI, 2013). Dentre essas, o uso de inoculantes, produzidos a partir de microrganismos do solo capazes de

realizar a FBN, têm sido empregados na agricultura, sendo uma opção eficiente ao uso de fertilizantes derivados de fontes não renováveis. Estudos têm relatado o uso desses microrganismos no desenvolvimento de uma agricultura sustentável e eficiente, tornando-os foco de grande interesse (GUIMARÃES; BALDANI e BALDANI, 2003; MARIANO et al. 2004; HARA e OLIVEIRA, 2005; GUIMARÃES e BALDANI, 2013; FREITAS et al. 2015; OLIVEIRA, 2015; OLIVEIRA et al. 2016).

### **3.3 Fixação biológica do nitrogênio atmosférico em gramíneas**

Estudos sobre a relação de bactérias RPCP e gramíneas no Brasil teve início na década de 70 pela pesquisadora Johanna Döbereiner (MARQUES, 2014). Desde então, vários gêneros bacterianos tem sido relatados e estudados em associação com gramíneas, tais como: *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Pseudomonas* e *Rhizobium* (MBAI et al. 2013; GUIMARÃES e BALDANI, 2013; FERREIRA et al. 2014).

Diferente do que se observa na interação entre RPCP's e leguminosas, nas gramíneas, não são observadas as estruturas simbióticas especializadas nas raízes denominadas de nódulos. As RPCP's associadas a gramíneas são encontradas principalmente na rizosfera e no interior dos tecidos vegetais como a raiz, o caule e as folhas (YANNI e DAZZO, 2010; OSORIO-FILHO et al. 2014; HAHN et al. 2014).

Devido a essa interação, as RPCP's podem estimular o crescimento das plantas, através da produção e liberação de hormônios reguladores do crescimento vegetal, na solubilização de fosfatos, na retenção de nutrientes na rizosfera, na FBN e no controle biológico de pragas e de algumas doenças (WANG et al. 2008; CASSÁN et al. 2009; YADAV et al. 2009; LIU et al. 2014).

O grande interesse em utilizar as RPCP's em gramíneas está relacionado as características fisiológicas apresentadas por esse grupo de planta, quanto ao aproveitamento de água e maior eficácia na atividade fotossintética, devido principalmente, a presença de um sistema radicular fasciculado. Além disso, devido a vasta utilização dessas bactérias em associação com leguminosas, sabe-se que este é um método seguro sem qualquer potencial de risco (DÖBEREINER, 1992; CHABOT et al. 1996).

### 3.4 Diversidade e taxonomia microbiana

Os microrganismos apresentam uma grande diversidade genética e desempenham funções cruciais na manutenção dos ecossistemas. Apesar de sua importância, o número de espécies e grupos microbianos estudados e descritos representam apenas uma pequena porção da diversidade microbiana encontrada na natureza (PACE, 1997; REIS-JUNIOR et al. 2002; OLIVEIRA et al. 2009).

A partir dos anos 80 e 90 estudos para determinar a diversidade de bactérias endofíticas tornaram frequentes. Sturz et al. (1997), demonstraram em sua pesquisa a colonização por bactérias endofíticas em colmo, folhas e nódulos de trevo vermelho (*Trifolium pratense*), e verificaram a presença de *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter agglomerans*, *Rhizobium* spp., *Agrobacterium* spp., *Curtobacterium* spp., *Bacillus* spp., *Bordetella* spp., *Escherichia coli*, *Pasteurella* spp., *Pseudomonas* spp., e *Xanthomonas*.

Mesmo com o crescente interesse na determinação da diversidade bacteriana, há várias lacunas quando se trata do conhecimento das bactérias RPCP's associadas às plantas agrícolas no Brasil (OLIVEIRA et al. 2009; FERREIRA et al. 2014). Segundo Oliveira et al. (2009), essa limitação está relacionada principalmente as dificuldades no processo de amostragem da população microbiana, bem como na identificação taxonômica desses.

Atualmente, o sistema de taxonomia microbiana adota uma análise polifásica usando dados morfológicos, bioquímicos e moleculares, além de análises capaz de avaliar as semelhanças e diferenças entre os microrganismos e os diferentes graus de similaridade entre os mesmo (IKEDA et al. 2013). Dentre os parâmetros fisiológicos e bioquímicos mais utilizados estão as características morfológicas da colônia (NAVROSKI et al. 2015), a tolerância a condições extremas de pH e temperatura (ARAÚJO e GUALTER, 2017), resistência a antibióticos (HERNÁNDEZ-FORTE et al. 2012; TONIUTTI et al. 2015), capacidade de metabolizar diferentes fontes de carbono (CASTELLANE e LEMOS, 2007; LEONEL et al. 2014), análise de produção de enzimas (MBAI et al. 2013), produção de sideróforos (HERNÁNDEZ-FORTE et al. 2015), solubilização de fosfato e fixação biológica de nitrogênio (GUJRAL et al. 2013).

De acordo com Figueiredo et al. (2001) esses parâmetros de avaliação além de permitir determinar a diversidade microbiana, possibilita a obtenção e seleção de

estirpes RPCP. A resistência intrínseca a antimicrobianos produzidos por microrganismo permitem maiores taxas de sucesso na colonização do solo e da planta (SILVA et al. 2007). A produção de enzimas hidrolíticas como amilases, celulasas, quitinases, proteases e pectinases estão envolvidas no processo de combate e controle de patógenos, auxiliam na penetração das bactérias na planta hospedeira e obtenção de fontes de energia (SZILAGYI-ZECCHIN et al. 2014; SILVA et al. 2015a). A capacidade de solubilização de fosfato também auxilia no controle biológico de algumas espécies fúngicas (BANO e MUSARRAT, 2004). Ainda, a produção desses compostos estão relacionados a sobrevivência e competição bacteriana em seu nicho ecológico.

Entretanto, o perfil fenotípico é comumente utilizado como complemento para os estudos moleculares (BONATELLI, 2012), pois as características apresentadas por essas análises podem sofrer alterações dependendo das condições estabelecidas em cada ambiente (HUNGRIA e SILVA, 2011).

Segundo Guarro et al. (1999), estudos que tem por finalidade estabelecer relações filogenéticas entre microrganismos, utilizam frequentemente o gene codificador do RNA ribossômico, por ser muito conservado e estar presentes em todos os organismos. Através dessa sequência e comparação dos nucleotídeos do gene 16S rRNA é possível determinar a posição taxonômica dos procariotos a nível de gênero e espécie (GARRITY e HOLL, 2001; REIS-JUNIOR et al. 2006; IKEDA, 2010). Porém, às vezes a variabilidade do gene não é suficiente, dificultando a classificação em nível específico (YUE et al. 2011). Como método alternativo, outros genes com sequências conservadas tornou-se útil em conjunto a análise do gene 16S rRNA, como o gene 23S rRNA e o espaço intergênico 16S-23S rRNA (IGS) ou do inglês *intergenic transcribed spacer* (ITS). Além dos genes ribossomais, outros genes como os *housekeeping* também são utilizados (COENYE e VANDAMME, 2003; MARTENS et al. 2008; MOUSAVI et al. 2015).

### **3.5 Produção de biocompostos**

Nas últimas décadas, bactérias RPCP têm atraído muita atenção de pesquisadores, pois apresentam potencial utilização em diversos setores de interesse comercial (BISWAS et al. 2000; VARGAS et al. 2009; STROSCHEIN et al. 2011). Contudo, o aumento no uso dessas bactérias e de seus produtos derivados,

levanta questões relacionada a sua segurança quando direcionados a indústria alimentícia, farmacêutica e demais áreas que possam ser destinados a utilização humana de forma direta ou indireta (MAGNÚSSON et al. 2012).

Nesse contexto, são estabelecidos pelo Ministério da Saúde critérios de classificação de risco dos agentes biológicos, os quais utilizam como base diversos aspectos, tais como: virulência, modo de transmissão, estabilidade do agente, concentração e volume, origem do material potencialmente infeccioso, disponibilidade de medidas profiláticas eficazes, disponibilidade de tratamento eficaz, dose infectante, tipo de ensaio e fatores referentes ao trabalhador (BRASIL, 2006).

Os agentes biológicos que afetam o homem, os animais e as plantas são ainda distribuídos em classes de riscos. As bactérias endofíticas são classificadas como baixo risco individual e para coletividade (classe de risco 1), onde estão inclusos todos os agentes biológicos que não provocam danos em pessoas ou animais (BRASIL, 2006).

Os estudos de diversidade metabólica de bactérias possuem grande interesse do ponto de vista biotecnológico e podem levar ao desenvolvimento de produtos de reconhecido valor econômico (CASTELLANE e LEMOS, 2007; SZILAGYI-ZECCHIN et al. 2014). Muitos estudos já comprovam sua ampla utilização na produção de substâncias como: antibióticos, ácidos orgânicos, solventes, enzimas e biocombustíveis por processos fermentativos. Sendo também utilizadas como agentes biorremediadores em processos de recuperação e tratamento de solos contaminados (PEREIRA-JUNIOR et al. 2008).

### **3.5.1 Enzimas bacterianas**

As enzimas são consideradas o grupo de derivados biológico mais importante de uso humano (OLIVEIRA et al. 2006). São compostos essenciais nos processos relacionados à qualidade do solo (textura e fertilização) e apresentam ampla aplicabilidade em processos industriais de âmbito ambiental, farmacêutico e alimentício (CENCIANI et al. 2008). As enzimas podem ser obtidas de fontes animais, vegetais ou produzidas por microrganismos, sendo estas últimas comumente empregadas para fins biotecnológicos. A produção de enzimas

bacterianas são preteridas para esse fim, por oferecer menor custo e possibilidade de produção em larga escala em fermentadores industriais (SILVA, 2009).

De acordo com Jesus (2013), aproximadamente 3.000 enzimas identificadas estão descritas na *Enzyme Commission* (EC). Dentre essas, apenas uma pequena parcela é utilizada para fins biotecnológicos, sendo em sua maioria são enzimas hidrolíticas (COELHO, 2008). Há poucos estudos que utilizam bactérias RPCP e sua capacidade de produzirem enzimas hidrolíticas. Em geral, a vertente mais abordada corresponde a produção e importância da nitrogenase, enzima associada a utilização na produção agrícola essencial na fixação biológica do nitrogênio atmosférico (OLIVEIRA et al. 2006).

Atualmente há um maior interesse no desenvolvimento de estudos que busquem identificar fontes enzimáticas microbianas, visto o grande potencial de uso dessas bactérias como produtoras de amilases, lipases, pectinases e proteases (KIRK et al. 2002; VAN-BEILEN, 2002; OLIVEIRA, OLIVEIRA e ANDRADE, 2010). Entre os gêneros bacterianos citados para obtenção de enzimas em processos industriais estão *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Thermomonospora* (QUAX, 2013). Dentre esses, o *Bacillus* apresenta várias espécies reconhecidas pela elevada produção de proteases, como a serina endopeptidase subtilisina, produzida pelas espécies *B. subtilis* e *B. licheniformis* (SUGANTHI et al. 2013; QUAX, 2013).

### **3.5.2 Exopolissacarídeos bacterianos**

Os polissacarídeos são polímeros naturais formados por unidades monossacarídica encontrados em diversos seres vivos como vegetais, algas, animais e microrganismos (fungos e bactérias). Devido à grande diversidade física e química observado em polissacarídeos de origem microbiana, este tem gerado grande interesse industrial, sendo foco de muitos estudos (LUVIELMO e SCAMPARINI, 2009; MACIEL et al. 2012).

Estes podem ser classificados de acordo com sua localização morfológica sendo: intracelulares, os polissacarídeos capsulares presentes dentro das células; os polissacarídeos de parede, associados à superfície das células, e os extracelulares, quando secretados para o meio externo, sendo denominados de exopolissacarídeos (EPS) (MISHRA e JHA, 2013).

Os EPS's são macromoléculas de polissacarídeos, comumente caracterizados como goma hidrossolúvel com propriedades físicas, estruturais e químicas diferentes (SUTHERLAND, 2001). Estes conferem à bactéria aderência e colonização de superfícies sólidas, onde os nutrientes se acumulam, e proteção as células por envolver a membrana plasmática, evitando o dessecamento e outros estresses ambientais (BARRETO et al. 2011).

Os EPS's podem ser classificados em homopolissacarídeos, heteropolissacarídeos e polissacarídeos de estrutura irregular (MISHRA e JHA, 2013). Os homopolissacarídeos são constituídos por um único tipo de monossacarídeo, como exemplo a dextrana, constituído apenas por moléculas de D-glicose. Já os heteropolissacarídeos são constituídos por duas ou mais moléculas de monossacarídeo em uma estrutura regular, como exemplo a gelana, formada por dois resíduos de  $\beta$ -D-glicose, um de  $\alpha$ -L-ramnose e um de ácido  $\beta$ -D-glucurônico (ARANDA-SELVERIO et al. 2010; DONOT et al. 2012). Os EPS de estrutura irregular são assim denominados por apresentarem sequências variadas de monossacarídeos, como exemplo o alginato, constituído de ácidos  $\alpha$ -L-gulurônicos e  $\beta$ -D-manurônicos em proporções distintas (MISHRA e JHA, 2013).

Os processos de biossíntese dos diferentes tipos de polissacarídeos são bem complexos envolvendo vários grupos de enzimas e proteínas. De forma geral podem ser observados quatro grupos destas macromoléculas envolvidas na absorção do substrato, fosforilação do substrato, polimerização, nos passos de modificações pós-síntese e proteínas de transporte para a exsudação (KUMAR; MODY e JHA, 2007). A síntese do EPS é controlada por genes localizados nos cromossomos ou elementos extracromossomais das bactérias, variando da espécie e/ou do polímero sintetizado (MISHRA e JHA, 2013).

Na natureza vários grupos de bactérias são conhecidos como produtores de EPS, sendo na sua maioria pertencentes à classe Proteobacteria. Muitos estudos têm demonstrado que as bactérias RPCP pertencentes aos gêneros *Rhizobium*, *Beijerinckia*, *Azotobacter*, *Xanthomonas* e *Erwinia* entre outros, são capazes de produzir grandes quantidades de EPS (VERMANI; KELKAR e KAMAT, 1995; SUTHERLAND, 2001; CASTELLANE, 2007).

O EPS bacteriano mais bem estudado e caracterizado é a goma xantana, produzida por bactérias do gênero *Xanthomonas*, a qual teve seu uso em alimentos

permitido pela *Food and Drug Administration* (FDA) em julho de 1969, porém muitas espécies do gênero são consideradas fitopatogênicas (RINAUDO, 2008; ROTTAVA et al. 2009). Sua aplicabilidade é ampla, sendo adicionado a inúmeros produtos em diferentes segmentos industriais, o que se deve principalmente a suas propriedades reológicas (FONTANIELLA et al. 2002; LUVIELMO e SCAMPARINI, 2009). Entre outros biopolímeros bastante estudados estão os alginatos bacterianos produzidos por *Pseudomonas* sp., a dextrana de *Leuconostoc mesenteroides*, a celulose de *Acetobacter xylinum*, o ácido hialurônico de *Streptococcus equii*, a succinoglucana de *Rhizobium* sp. e a gelana de *Sphingomonas paucimobilis* e *Pseudomonas elodea* (DIAZ; VENDRUSCOLO e VENDRUSCOLO, 2004).

Dentre as bactérias RPCP, as espécies pertencentes às famílias *Rhizobiaceae* e *Phyllobacteriaceae* são conhecidas por sintetizarem grandes quantidades de EPS. Assim, estes organismos podem ser utilizados em estudos para prospecção do polímero, representando uma alternativa para obtenção de EPS com baixo custo de produção (DUTA; FRANÇA e LOPES, 2006; CASTELLANE, 2007; CASTELLANE e LEMOS, 2007).

As bactérias da classe Firmicutes que englobam os gêneros *Lactobacillus* e *Bacillus*, também produzem EPS com propriedades importantes para a elaboração de alguns produtos alimentícios. Sua utilização na composição de produtos lácteos resulta em uma melhora das características sensoriais e do valor nutritivo destes produtos, além de elevar sua viscosidade (GRANDI, 2010). Alguns estudos também têm revelado a produção de levana por algumas espécies do gênero *Bacillus* quando cultivadas em meio contendo sacarose (SHIN; SHIEH e HSIEH, 2005). Estes gêneros abrangem bactérias reconhecidas como seguras pela designação da FDA (*Food and Drug Administration*), instituição responsável pelos critérios de classificação de risco dos agentes biológicos (FDA, 2017), o que facilita o uso de seus biopolímeros na constituição de alimentos e na produção de agentes biologicamente ativos (BADEL; BERNARDI; MICHAUD, 2011).

Várias bactérias produtoras de EPS, já foram estudadas e determinadas a composição química e estrutural dos EPS, assim como as propriedades e aplicações destes biopolímeros (Tabela 1).

**Tabela 1:** Propriedades e aplicações de exopolissacarídeos produzidos por alguns gêneros bacterianos

<b>Exopolissacarídeos</b>	<b>Gênero/espécie</b>	<b>Aplicações</b>
<b>Alginato</b> Composição: Ácidos $\alpha$ -L-gulurônicos e $\beta$ -D-manurônicos	<i>Azotobacter vinelandii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. mendocina</i> , <i>P. putida</i>	Agente espessante, estabilizante, encapsulação e geleificação
<b>Celulose</b> Composição: $\beta$ -glicose	<i>Acetobacter xylinum</i> , <i>Agrobacterium</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Rhizobium</i> sp.	Agente dispersante, geleificante, emulsificador e tratamento de queimaduras
<b>Curdlana</b> Composição: D-glicose	<i>Agrobacterium radiobacter</i> , <i>Alcaligenes faecalis</i> var. <i>mixogenes</i>	Agente dispersante, geleificante e retenção de água em alimentos processados
<b>Dextrana</b> Composição: D-glicose	<i>Lactobacillus hilgardii</i> , <i>Leuconostoc dextranicum</i> , <i>L. mesenteroides</i> , <i>Streptococcus mutans</i>	Agente geleificante, espessante e matéria prima para fabricação de medicamento
<b>Gelana</b> Composição: $\beta$ -D-glicose, $\alpha$ -L-ramnose e ácido $\beta$ -D-glucurônico	<i>Aureomonas elodea</i> , <i>Sphingomonas elodea</i> , <i>S. paucimobilis</i>	Agente geleificante
<b>Levana</b> Composição: Frutose	<i>Acetobacter suboxydans</i> , <i>Actinomyces viscous</i> , <i>Aerobacter levanicum</i> , <i>Bacillus polymyia</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Corynebacterium laevaniformans</i> , <i>Erwinia amylovora</i> , <i>E. herbicola</i> , <i>Gluconobacter oxydans</i> , <i>Rhanella aquatilis</i> , <i>Streptococcus</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Zymomonas mobilis</i>	Agente espessante, estabilizante e aditivo de alimentos funcionais
<b>Succinoglucana</b> Composição: Galactose e glicose	<i>Agrobacterium</i> sp., <i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Rhizobium</i> sp., <i>Sinorhizobium meliloti</i>	Agente geleificante e matriz imobilizadora de drogas
<b>Xantana</b> Composição: Glicose, manose e ácido glucurônico	<i>Xanthomonas campestris</i>	Agente espessante, estabilizante e emulsificante

A produção de EPS ainda proporciona a algumas populações bacterianas a formação de uma matriz que mantêm unidos microrganismos no processo de formação do biofilme. Biofilmes são definidos como complexos ecossistemas microbianos, os quais são formados por populações desenvolvidas a partir de uma única, ou de múltiplas espécies, sendo encontrados em uma variedade de superfícies bióticas e/ou abióticas. Além disso, a formação de biofilmes está associada à proteção fornecida pela matriz de exopolissacarídeos contra estresses do ambiente (COSTERTON, 1999; PLYUTA et al. 2013).

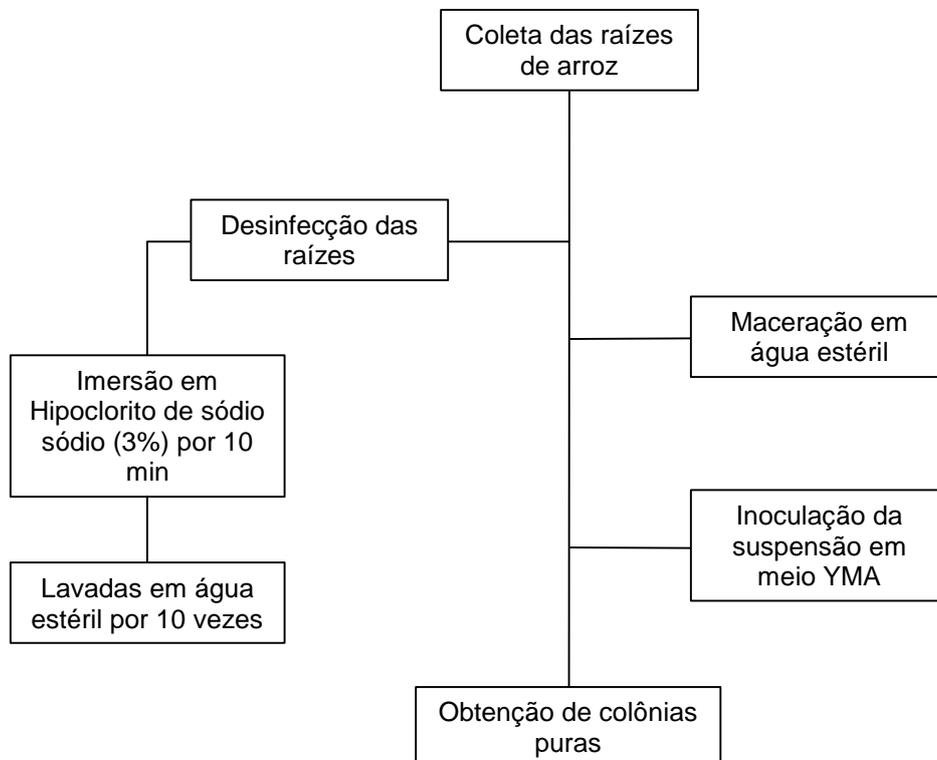
Desse modo, o levantamento de isolados bacterianos associadas à planta de arroz pode contribuir com a identificação de bactérias com potencial para produção de bioprodutos como os biopolímero e as enzimas. Através da caracterização polifásica, foi possível avaliar a diversidade metabólica e genética ampliando o conhecimento da diversidade taxonômica do grupo das bactérias endofíticas de arroz. Assim, estas informações poderão ser utilizadas tanto para facilitar a seleção de isolados para testes de inoculação *in vivo*, no entendimento de relações ecológicas, como também do ponto de vista de aplicação para a produção de bioprodutos.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Material biológico

Os isolados bacterianos utilizados neste estudo foram isolados de raízes de plantas de arroz coletadas na Estação Experimental em Agroecologia da Embrapa Arroz e Feijão, segundo o método adotado por Ferreira e colaboradores (2014) (Figura 1). Posteriormente, os isolados obtidos foram mantidos no Banco de Microrganismos do Laboratório de Bioquímica da Universidade Estadual de Goiás (UEG), Campus de Ciências Exatas e Tecnológicas (CCET).

**Figura 1:** Etapas realizadas para obtenção dos isolados bacterianos associados à planta de arroz.



Foram utilizados 200 isolados para avaliação de crescimento em caldo semisseletivo extrato de levedura-manitol (YM) (Anexo I) (VINCENT, 1970) utilizado para bactérias da família *Rhizobiaceae* por 24 h sob agitação (140 rpm) a 28 °C. Dentre os 200 isolados, foram selecionados 22 que apresentaram melhor crescimento em meio de cultivo, sendo posteriormente catalogados e estocados.

Como controle e referência para as análises foram utilizadas duas bactérias, *Rhizobium tropici* (BR322 e BR520), fornecidas pela Embrapa Arroz e Feijão, Santo

Antônio de Goiás – GO e uma, *Azospirillum brasilense* (FP2), fornecida pelo núcleo de fixação biológica de nitrogênio da Universidade Federal do Paraná.

#### **4.2 Manutenção dos isolados bacterianos**

O preparo do estoque e manutenção das linhagens bacterianas foi realizado conforme o método utilizado por Oliveira (2016). Os isolados bacterianos foram inoculados em meio sólido YMA através da técnica de esgotamento (riscagem em placa) para obtenção de colônias isoladas (HUNGRIA et al. 1994) e incubadas a 30 °C por 24 h. Posteriormente, as colônias isoladas foram cultivadas em caldo YM sob agitação (140 rpm) a 28 °C por 24 h. As bactérias isoladas foram armazenadas em glicerol estéril 30% a -20°, sendo os estoques renovados a cada seis meses e utilizados para os ensaios posteriores.

#### **4.3 Caracterização das colônias bacterianas**

A caracterização morfológica foi realizada quanto aos aspectos macroscópicos observados nas colônias bacterianas crescidas em meio sólido YMA. Os parâmetros adotados para essa análise foram segundo Hungria e Silva (2011). Os critérios analisados foram: tempo de crescimento muito rápido (<24 horas) ou rápido (entre 1 a 3 dias); tamanho (mm); forma apresentada pela colônia (circular, irregular ou rizoide); borda (lisa ou ondulada); elevação (plana, convexa ou umbilicada); superfície (lisa, granulosa ou rugosa); produção de muco (escassa, moderada ou abundante); consistência (seca, aquosa ou gomosa); variação de transparência (translúcida ou opaca) e pigmentação (amarela, rosada ou creme).

#### **4.4 Coloração de Gram**

Os isolados bacterianos foram cultivados em caldo YM e alíquotas foram utilizadas para o esfregaço em lâmina de microscopia, sendo a fixação realizada em chama (bico de Bunsen). Posteriormente, o esfregaço já fixado, foi submetido à técnica de coloração de Gram empregando o método determinado por Cappuccino e Sherman (2014), na seguinte sequência: 1) cristal violeta por 1 minuto; 2) lavagem com água; 3) solução de lugol por 1 minuto; 4) lavagem com água; 5) lavagem com etanol-acetona 1:1 (v:v) por 20 segundos; 6) lavagem com água; 7) solução de

safranina por 30 segundos e 8) lavagem com água. O preparo das soluções estão descritos no Anexo I.

Após a coloração, a lâmina foi seca em temperatura ambiente e o resultado observado em microscópio óptico em objetiva de imersão (100 x) com óleo. Foram observadas as características apresentadas pelos isolados como: forma das células bacterianas (cocos ou bastonetes) e coloração (tons rosa a avermelhado para as bactérias Gram-negativas e violeta para as Gram-positivas).

## **4.5 Caracterização bioquímica**

### **4.5.1 Avaliação de tolerância a antibióticos**

Os isolados bacterianos foram avaliados quanto à susceptibilidade e tolerância a antibiótico pelo método de diluição em placa (HUNGRIA et al. 1994), que tem por finalidade determinar uma faixa de concentração de antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano. As amostras submetidas ao teste foram cultivadas em caldo YM por 24 h sob agitação (140 rpm) a 28 °C, e alíquotas foram utilizadas para avaliar a capacidade de crescimento em meio YM sólido contendo cinco antibióticos (ácido nalidíxico, ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina e tetraciclina) em diferentes concentrações: 30, 50, 100 e 200 µg mL<sup>-1</sup>. A determinação da tolerância ou sensibilidade foi realizada através do crescimento das colônias em meio sólido após 72 h, no escuro, utilizando como controle as estirpes padrão *R. tropici* (BR322 e BR520) e *A. brasilense* (FP2) (HUNGRIA et al. 1994).

### **4.5.2 Teste de crescimento em fontes de carbono**

As bactérias foram cultivadas em caldo YM, por 24 h, sob agitação (140 rpm) a 28 °C e foram utilizados 50 µL como pré-inóculo nos testes de fontes de carbono (ácido maléico, ácido málico, ácido nicotínico, ácido succínico, arabinose, frutose, glicerina, glicose, inositol, manitol, manose, sacarose, sorbitol e trealose) (VARGAS e HUNGRIA, 1997). Para o teste foi utilizado o meio mínimo líquido (Anexo I) (HUNGRIA et al. 1994) e as fontes de C foram adicionadas por filtração (membrana 0,22 µm) na concentração de 10 mM e distribuídos (1 mL) em micro placas de 96 poços (*deep well plate*) para crescimento. Estas foram incubadas sob agitação (140 rpm) a 28 °C por 72 h. O crescimento celular foi avaliado por densidade óptica (espectrofotometria) (Epoch®) a 600nm.

O crescimento bacteriano foi avaliado seguindo os seguintes parâmetros de leitura:  $0 \geq 0,10$  (+),  $0,11 \geq 0,30$  (++) ,  $0,31 \geq 0,50$  (+++) e  $\geq 0,51$  (++++). Através das médias de leitura de cada isolado, os resultados foram convertidos em dados binários e utilizados para construção de uma matriz, adotando os critérios de faixas de leituras (+) e (++) para ausência (zero); (+++) e (++++) para presença de crescimento (1).

#### 4.5.3 Avaliação enzimática

O teste de catalase foi realizado a fim de verificar a presença da enzima nos isolados bacterianos estudados, adotando o método utilizado por Cappuccino e Sherman (2014). Os isolados foram previamente crescidos em meio sólido YMA, incubados a 28 °C por 48 h. Posteriormente, foi adicionado 50 µL de solução aquosa de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 3 %. A reação foi considerada positiva através da formação de bolhas de oxigênio em até 2 minutos após a adição da solução.

Os isolados também foram testados quanto à produção de amilase, carboximetilcelulase, lipase, protease e solubilização de fosfato inorgânico em meios de cultura sólidos. As linhagens bacterianas foram cultivadas sob agitação (140 rpm) a 25 °C por 24h sendo utilizado 10 µL como inóculo de cada teste em placa para cada enzima (Tabela 2). Para detecção de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico foram utilizados os meios sólidos Pikovskaya's (PIKOVSKAYA, 1948) e NBRI-P (Anexo I) (NAUTIYAL, 1999), ambos ajustados para pH 7,0 e incubados por 168 h. Para os demais ensaios foi utilizado o meio mínimo, alternando somente o substrato (fonte de carbono) (Anexo I) requerido para detecção da atividade enzimática, conforme Dingle; Reid e Salomons (1953) adaptado (Tabela 2).

**Tabela 2:** Condições utilizadas para detecção da atividade enzimática dos 22 isolados associados à planta de arroz e três estirpes de referência *R. tropici* (BR322 e BR520) e *A. brasilense* (FP2).

Atividade enzimática	Substrato	Período de incubação
<b>Amilolítica</b>	Amido de milho (10%)	120 h
<b>Celulolítica</b>	Carboximetilcelulose (1%)	120 h
<b>Lipolítica</b>	Tween 80 (1%)	168 h
<b>Proteolítica</b>	Leite em pó (20%)	72 h*

\* Para os isolados R59 e R141 o período de incubação foi de 120 h

Após o período de crescimento as avaliações foram realizadas através da análise do diâmetro da colônia e do halo medidos com paquímetro em milímetros

(Vernier Caliper® 150 x 0,05 mm). A determinação da atividade enzimática dos isolados foi estimada mediante o cálculo do índice enzimático (IE) e índice de solubilização de fosfato (IS), expressos pela relação do diâmetro médio do halo de degradação ( $\varnothing_h$ ) e o diâmetro médio da colônia ( $\varnothing_c$ ) (HANKIN e ANAGNOSTAKIS, 1975):

$$IE = \frac{\varnothing_h}{\varnothing_c}$$

Para facilitar a visualização do halo de degradação enzimático para atividade celulolítica, foi utilizada a técnica de revelação empregada por Dinesh et al. (2015). Dessa forma, as placas foram coradas com solução de vermelho congo 0,1 % durante 15 minutos. Posteriormente, a solução foi descartada e as placas lavadas com NaCl 1 mol L<sup>-1</sup>, relevando o halo originado pela degradação da carboximetilcelulose (CMC). Já para lipase a visualização foi otimizada após armazenar as placas por 96 h a 4 °C evidenciando os cristais de sais de cálcio do ácido láurico ao redor das colônias (STAMFORD; ARAÚJO e STAMFORD, 1998).

#### **4.5.4 Detecção de sideróforos**

Para determinar a presença de compostos com atividade quelante de Fe<sup>3+</sup>, foi utilizado o método de CAS - Cromo Azul S (SCHWYN e NEILAND, 1987). Os isolados e as estirpes de referência foram previamente cultivados em caldo batata, por 24 h, sob agitação (140 rpm) a 28 °C. O ensaio foi realizado em placa de Elisa, onde foram adicionados 100 µL do pré-inóculo e 100 µL do reativo de CAS (Anexo I). A reação foi avaliada após 30 minutos de incubação no escuro, sendo o resultado positivo pela mudança na coloração, utilizando como controle o caldo batata com adição do reativo de CAS.

## **4.6 Caracterização genotípica**

### **4.6.1 Extração do DNA**

A extração do DNA genômico dos isolados de arroz e das estirpes de referência foi realizada seguindo o método de Ausubel et al. (1999) adaptado. As bactérias foram cultivadas em caldo YM, por 24 h, sob agitação (140 rpm) a 28 °C. Posteriormente, 5,0 mL da suspensão bacteriana foram centrifugadas por 3 minutos

a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o aglomerado de células lavadas duas vezes com solução salina (NaCl 0,9%), ressuspendido em 800 µL de solução de lise (Anexo I) e incubados em banho termostatizado por 10 minutos a 80 °C.

Posteriormente, as amostras foram transferidas para o banho de gelo por 5 minutos e 6 µL de solução de RNase (25 mg mL<sup>-1</sup>) foram adicionados à reação e incubados por 60 minutos a 37 °C. Em seguida foi adicionado 200 µL de NaCl 0,5 M no meio reacional e incubados por 20 minutos em banho de gelo para aglomeração do DNA. A mistura foi então centrifugada a 13.000 rpm por 30 minutos e o sobrenadante transferido para um novo tubo contendo 600 µL de isopropanol (P.A.), e transferido para o banho de gelo por 20 minutos. Os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm, por 20 minutos e o sobrenadante descartado, sendo adicionado em seguida 600 µL de solução de etanol 70% e centrifugado novamente por 15 minutos.

O sobrenadante foi descartado e o DNA extraído foi seco em temperatura ambiente por um período aproximado de 24 h, e em seguida, ressuspendido em 30 µL de T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> (Anexo I) para sua dissolução e prevenção contra exonucleases. A suspensão foi armazenada a - 20 °C para utilização em análises posteriores.

#### 4.6.2 Amplificação da região espaçadora intergênica 16S-23S (IGS) rRNA

Após a extração do DNA genômico dos isolados de arroz e das estirpes de referência foi realizada a quantificação e ajuste da concentração do DNA seguindo o procedimento descrito por Cardoso et al. (2017). A região espaçadora intergênica (16S-23S rRNA) foi amplificada por reação de PCR utilizando os oligonucleotídeos pHRf e p23r (MASSOL-DEYA et al. 1995) e as condições de termociclagem foram estabelecidas de acordo com Reis-Junior et al. (2006), adaptado (Tabela 3).

**Tabela 3:** Condições de termociclagem estabelecidas para amplificação da região espaçadora intergênica 16S-23S rRNA para os isolados associados à planta de arroz e três estirpes de referência *R. tropici* (BR322 e BR520) e *A. brasilense* (FP2).

	Oligonucleotídeos (5' – 3')	Condições de termociclagem
Região 16S-23S rRNA	pHRf TGC GGC TGG ATC ACC TCC TT	Desnaturação inicial (1x) 94 °C por 4 min
	p23r CCG GGT TTC CCC ATT CGG	Ciclos intermediários (30x) Desnaturação: 94 °C por 1 min Anelamento: 62 °C por 45s Extensão: 72 °C por 45s Extensão terminal (1x) 75 °C por 5 min

Posteriormente, os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese, em gel de agarose 1,2%, em tampão TBE 1x, a 90V, por 60 min. Os géis foram corados em brometo de etídio e os perfis de bandas formados comparados com o marcador de peso molecular 1Kb-DNA-Ladder.

#### **4.7 Análise dos dados**

Todos os ensaios foram realizados em triplicatas e os resultados expressos a partir da média das repetições. Posteriormente, os valores obtidos foram submetidos à análise estatística descritiva, sendo os valores expressos em percentual utilizando o software Microsoft Excel® pacote Office 2012.

Os dados obtidos através das análises morfológicas, bioquímicas e moleculares foram transformados em uma matriz binária e submetidos a análise de agrupamento utilizando o coeficiente de Jaccard (J) para a construção do dendrograma, por intermédio do algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group with Arithmetic Means*), através do software NTSYS-pc® 2.10.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização morfológica

Entre os 22 isolados (R18, R20, R21A, R21B, R23, R50, R59, R62A, R62B, R64, R68, R130, R136A, R136B, R139, R141, R145, R147A, R147B, R148, R158 e R161) de raízes de arroz, 68% exibiram crescimento rápido (entre 1 a 3 dias) e 32% mostraram crescimento muito rápido (<24h). Quanto o tamanho da colônia, 50% apresentaram tamanho  $\leq 1$  e 50%  $>1$  mm. Em geral, a maioria dos isolados demonstraram colônia com pigmentação creme, forma circular, borda lisa, elevação convexa, gomosa e com produção de muco abundante (Tabela 4).

**Tabela 4:** Características morfológicas observadas em 22 isolados bacterianos associados à planta de arroz (*Oryza sativa* L.) e três estirpes de referência *R. tropici* (BR322 e BR520) e *A. brasilense* (FP2), cultivadas em meio YMA por 48h.

Isolados	Características morfológicas									
	TC	DC	FC	EC	BC	SC	CC	PM	Tr	P
R18	R	$\leq 1$	R	P	O	R	S	E	T	C
R20	R	$\leq 1$	R	P	O	R	S	E	T	C
R21A	R	$\leq 1$	R	P	O	G	S	E	T	R
R21B	R	$\leq 1$	C	C	L	L	A	M	O	R
R23	R	$\leq 1$	C	U	L	L	G	M	O	A
R50	R	$>1$	C	U	L	L	G	M	O	A
R59	R	$\leq 1$	C	U	L	L	G	M	O	A
R62A	R	$\leq 1$	R	P	O	G	S	E	T	C
R62B	R	$>1$	P	P	L	G	S	E	O	C
R64	R	$\leq 1$	R	P	O	G	S	E	T	C
R68	R	$\leq 1$	C	U	L	G	G	M	O	A
R130	R	$\leq 1$	C	C	L	L	G	A	T	C
R136A	MR	$>1$	C	C	L	L	G	A	T	C
R136B	MR	$>1$	C	C	L	L	G	A	T	C
R139	R	$>1$	C	C	L	L	G	M	T	C
R141	R	$\leq 1$	C	U	L	L	G	A	O	A
R145	R	$>1$	C	U	L	L	G	A	T	C
R147A	MR	$>1$	C	U	L	L	G	A	T	C
R147B	MR	$>1$	C	C	L	L	G	A	T	C
R148	MR	$>1$	C	U	L	L	G	A	T	C
R158	MR	$>1$	C	C	L	L	G	A	T	C
R161	MR	$>1$	C	U	L	L	G	A	O	A
BR322	R	$>1$	C	C	L	L	G	M	T	C
BR520	R	$>1$	C	C	L	L	G	M	T	C
FP2	R	$>1$	C	C	L	L	A	E	T	C

TC – tempo de crescimento (MR: muito rápido, R: rápido); DC – diâmetro da colônia em mm; FC – forma da colônia (C: circular, I: irregular, R: rizoide); EC – elevação da colônia (P: plana, C: convexa, U: umbilicada); BC – borda da colônia (L: lisa, O: ondulada); SC – superfície da colônia (L: lisa, G: granulosa, R: rugosa); CC – consistência da colônia (S: seca, A: aquosa, G: gomosa); Produção de muco – PM (E: escassa, M: moderada, A: abundante); Tr – transparência (T: translúcida, O: opaca); P - pigmentação – (C: creme, R: rósea, A: amarela).

Apenas o isolado R139 apresentou morfologia idêntica às estirpes de referência BR322 e BR520. Em contrapartida, os demais isolados avaliados apresentaram divergência em alguns dos parâmetros analisados, principalmente, entre o tempo de crescimento, produção de muco e pigmentação (Tabela 4).

Entre as características das colônias houve uma dominância de isolados com produção de muco (73%) e consistência gomosa (68%). Segundo Liu e colaboradores (2013) estas características podem indicar alto teor de exopolissacarídeos (EPS's). A alta produção de muco em bactérias associadas ao arroz já foi previamente relatada por Hernández-Forte e García (2017). Os autores observaram a presença desse composto em 100% das bactérias avaliadas, resultado semelhante ao do presente estudo. Outros trabalhos realizados com bactérias associadas ao arroz e outras espécies de gramíneas de interesse agrícola também tem observado a predominância de isolados com produção de muco (PÉREZ et al. 2010; OLIVEIRA, 2016; HÉRNANDEZ-FORTE e GÁRCIA, 2017), sendo essa característica comumente observada em bactérias RPCP (AHEMAD e KIBRET, 2014).

Os EPS's são biomoléculas comumente conhecidas como gomas por apresentarem consistência viscosa em meio aquoso e são produzidos por diversos gêneros bacterianos (SUTHERLAND, 2001; CASTELLANE, 2007; FERNANDES-JUNIOR; RUMJANEK e XAVIER, 2011). Para a bactéria a produção dos EPS's estão associados a diversas funções como: virulência, adesão e colonização a superfícies sólidas; proteção da célula microbiana contra ressecamento e outros estresses ambientais. Ainda foram identificados a participação destes biopolímeros na sinalização e interação entre planta-bactéria, além de fornecer proteção contra patógenos (BARRETO et al. 2011; LIU et al. 2013). Assim, pela presença de EPS's nos isolados de arroz avaliados é possível supor que estes podem ter ação na promoção de crescimento de plantas.

Dentre os grupos de polissacarídeos produzidos por bactérias, os EPS's são os mais estudados, pois diminuem as etapas de purificação por serem exsudados das células, colaborando para um polissacarídeo em quantidade e qualidade com menor custo de obtenção. Ainda, tem sido preterido quando comparados com EPS de outras fontes, pois apresentam menor susceptibilidade às alterações climáticas e oferecem menor custo e tempo de produção (SHAH et al. 2000; SELBMANN;

CROGNALE e PETRUCCIOLI, 2002; ERNANDES e GARCIA-CRUZ, 2005). Seu potencial biotecnológico tem sido demonstrado em diversos estudos, principalmente em indústrias de alimento, farmacêutica, cosméticos, têxtil, petróleo, construção civil e na produção de emulsionantes, flocculantes dentre outros (MORENO et al. 2000; OTERO; VINCENZINI, 2003; DONOT et al. 2012; XIE et al. 2013; SATHIYANARAYANAN; KIRAN e SELVIN, 2013). Assim, pela detecção de isolados de arroz com produção de polissacarídeos será possível identificar isolados promissores para estudos futuros da exploração biotecnológica destes compostos.

Os processos de biossíntese dos EPS's são bem complexos envolvendo vários grupos de enzimas e proteínas. Entretanto, muitos autores têm demonstrado que alguns fatores externos podem contribuir de forma significativa para produção de EPS. Para algumas espécies bacterianas, a fonte de carbono é determinante no processo de biossíntese do composto afetando a quantidade e qualidade do produto sintetizado (RUAS-MADIEDO e DE LOS REYES, 2005; GHARZOULI et al. 2012). Para as bactérias de arroz avaliadas é proposto também pela grande quantidade de isolados produtores de goma e muco que possam ter uma gama de genes associados a produção de polissacarídeos que devem ser alvo de estudos.

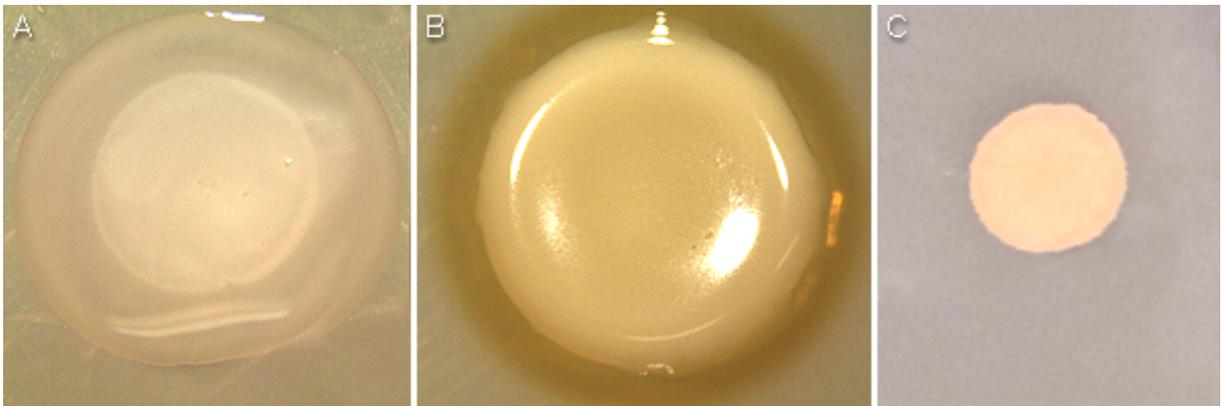
Já para Martins e colaboradores (1997) o tamanho da colônia pode estar relacionado a produção de muco em meio de cultivo, onde colônias <1 mm de diâmetro em geral produzem pequenas quantidades de muco. No entanto, essa relação não foi observada para os 22 isolados de raízes de arroz avaliados, uma vez que algumas linhagens apresentaram tamanho <1 mm com produção de muco variando entre moderada a abundante (Tabela 4), indicando que estas bactérias podem ter estratégias metabólicas diferentes no ambiente do Cerrado de onde foram isoladas.

Segundo Jordan (1982) algumas linhagens bacterianas podem apresentar colônias de pigmentação creme, amarela a rósea. As análises realizadas no presente estudo também identificaram isolados bacterianos com pigmentação semelhante quando cultivadas em meio YMA sem adição de corante, sendo 64% com pigmentação creme, 27% amarelada e 9% rósea (Tabela 4 e Figura 2).

Alguns fatores como a composição do meio de cultivo, a adição de corantes e a produção de muco pode influenciar na pigmentação apresentada por algumas colônias bacterianas (MARTINS et al. 1997). Pérez e colaboradores (2011),

caracterizaram morfológicamente isolados de sorgo e observaram que 86% dos isolados apresentaram coloração creme, 8% laranja e 6% amarela. No presente estudo, não foram observadas colônias de cor laranja, entretanto, a pigmentação amarelada foi observada em maior frequência nos isolados de arroz quando comparados ao de Pérez e colaboradores (2011). Outros estudos de caracterização morfológica de bactérias associadas a gramíneas observaram resultados semelhantes quanto a pigmentação de bactérias RPCP (GANGWAR e KAUR 2008; PÉREZ et al. 2010; LIMA, 2013; HERNÁNDEZ-FORTE e GARCIA, 2017).

**Figura 2:** Tipos de pigmentos observados em isolados associados à planta de arroz (*Oryza sativa* L.) cultivados em meio YMA por 48h A: creme (R130); B: amarelada (R59); C: rósea (R21B).



Apenas os isolados R21A e R21B apresentaram pigmentação rósea (Tabela 4 e Figura 2). Para Madhaiyan e colaboradores (2004) bactérias que apresentam esse tipo de pigmentação, se caracterizam pela capacidade de crescer metabolizando compostos com apenas um carbono, como o metanol, sendo denominadas de bactérias metilotróficas facultativas. A pigmentação rosa é comum ao gênero *Methylobacterium* pertencente a ordem Rhizobiales, a qual apresenta uma relação taxonômica com as bactérias do gênero *Rhizobium* (GOURION et al. 2006). Assim, essa característica pode indicar que esses isolados pertençam a grupo de bactérias que podem estar relacionadas taxonômicamente a esta ordem.

Pela análise dos caracteres morfológicos dos isolados e das estirpes de referência foi elaborada uma matriz de dados para a construção do dendrograma, sendo definidos cinco grupos com índice de similaridade em torno de 70% (Figura 3). O grupo G1 foi formado por dois subgrupos, sendo o primeiro constituído por

isolados (R18, R20, R62A e R64) 100% similar entre si. O segundo foi formado apenas pelo o isolado R21A. Ambos os subgrupos e o grupo G2 (R62B) apresentaram baixa similaridade (10%) com as estirpes de referência em G4 e G5 (Figura 3).

O grupo G3 foi formado por sete isolados e quatro subgrupos. O primeiro foi formado pelos isolados R21B, R23, R59 e R141 com similaridade de 100% entre si. Os demais subgrupos foram constituídos por apenas um isolado cada. As bactérias agrupadas em G3 apresentaram similaridade com as estirpes de referência BR322 e BR520 em homologia próxima a 50% (Figura 3).

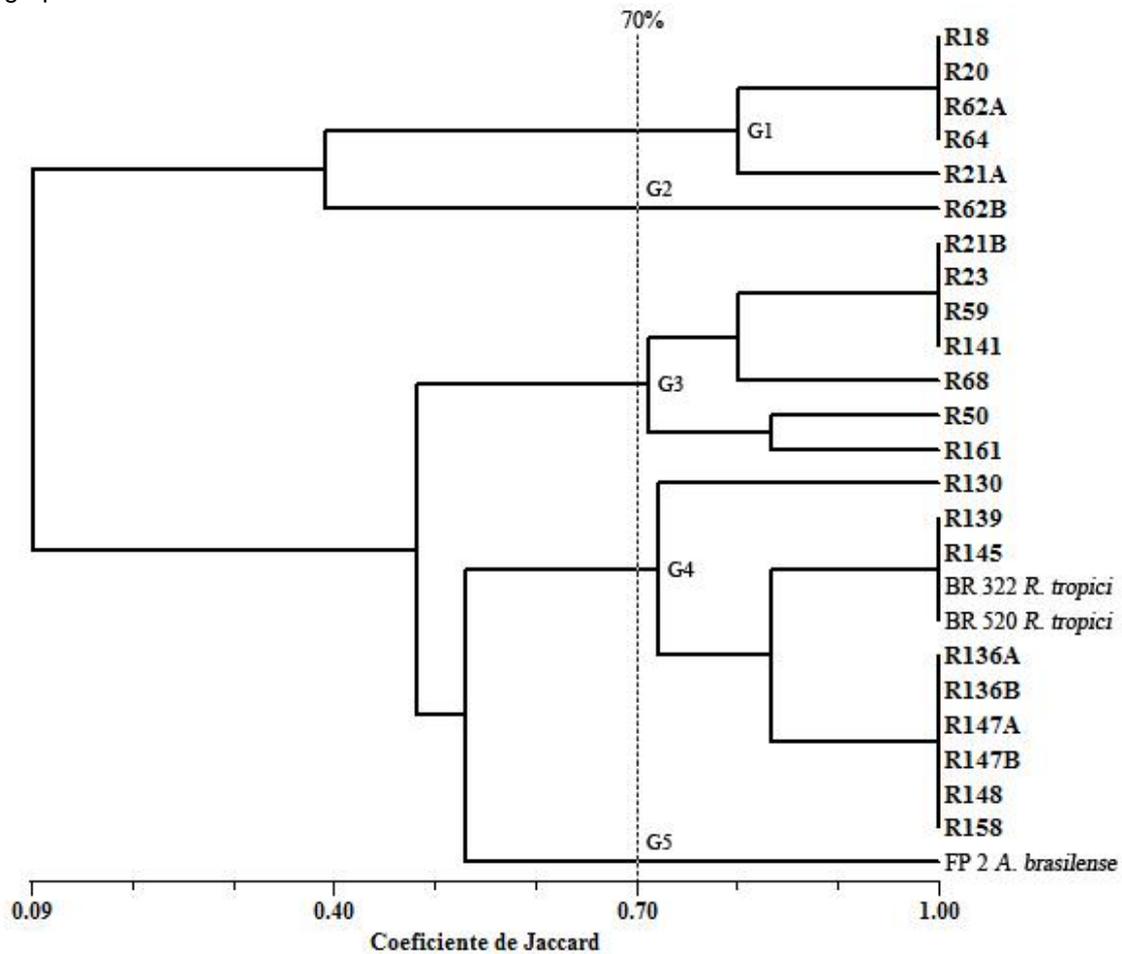
Em G4 foi observado a formação de três subgrupos. Desses, dois foram formados por isolados com 100% de homologia entre si, sendo os isolados R139 e R145 agrupados no mesmo subgrupo com as estirpes padrão para *R. tropici* (BR322 e BR520) (Figura 3). O grupo G5 foi formado por apenas a estirpe de referência FP2 com homologia próxima a 55% com G4.

Desse modo, os dados evidenciam a existência de variabilidade quanto a morfologia da colônia entre as bactérias em estudo, e ainda, revelaram aquelas que compartilham caracteres morfológicos alguns semelhantes e outros divergentes às estirpes de referência (Figura 3).

Quanto a morfologia da colônia, Lima (2013) observou a formação de seis grupos com índice de similaridade em torno de 70% para 20 bactérias endofíticas de milho. Segundo o autor, apenas um agrupamento formado por três isolados apresentou semelhança morfológica considerável com as estirpes do gênero *Rhizobium* utilizadas como controle. Comparativamente, no presente estudo foi observado que os isolados associados ao arroz apresentaram pelo menos 50% de similaridade com as bactérias do gênero *Rhizobium*.

Medeiros e colaboradores (2009) ao caracterizar morfológicamente rizóbios nativos isolados de nódulos radiculares de feijão-caupi cultivado na região semi-árida do Rio Grande do Norte, observaram elevada diversidade entre as linhagens bacterianas, sendo identificado 18 grupos em nível de 80% de similaridade. Resultado similar quanto a caracterização da colônia foi observado por Fernandes; Fernandes e Hungria (2003), com estirpes nativas dos tabuleiros costeiros de Sergipe. Porém, os autores observaram alta similaridade entre os isolados e os gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*.

**Figura 3:** Dendrograma de similaridade gerado pelo software NTSYS-pc® 2.10 com base nas características morfológicas de isolados bacterianos associados à planta de arroz e três estirpes de referência *R. tropici* (BR322 e BR520) e *A. brasilense* (FP2) utilizando o coeficiente de Jaccard, por intermédio do algoritmo UPGMA. Foi considerado 70% de similaridade como ponto de corte para o agrupamento dos isolados.



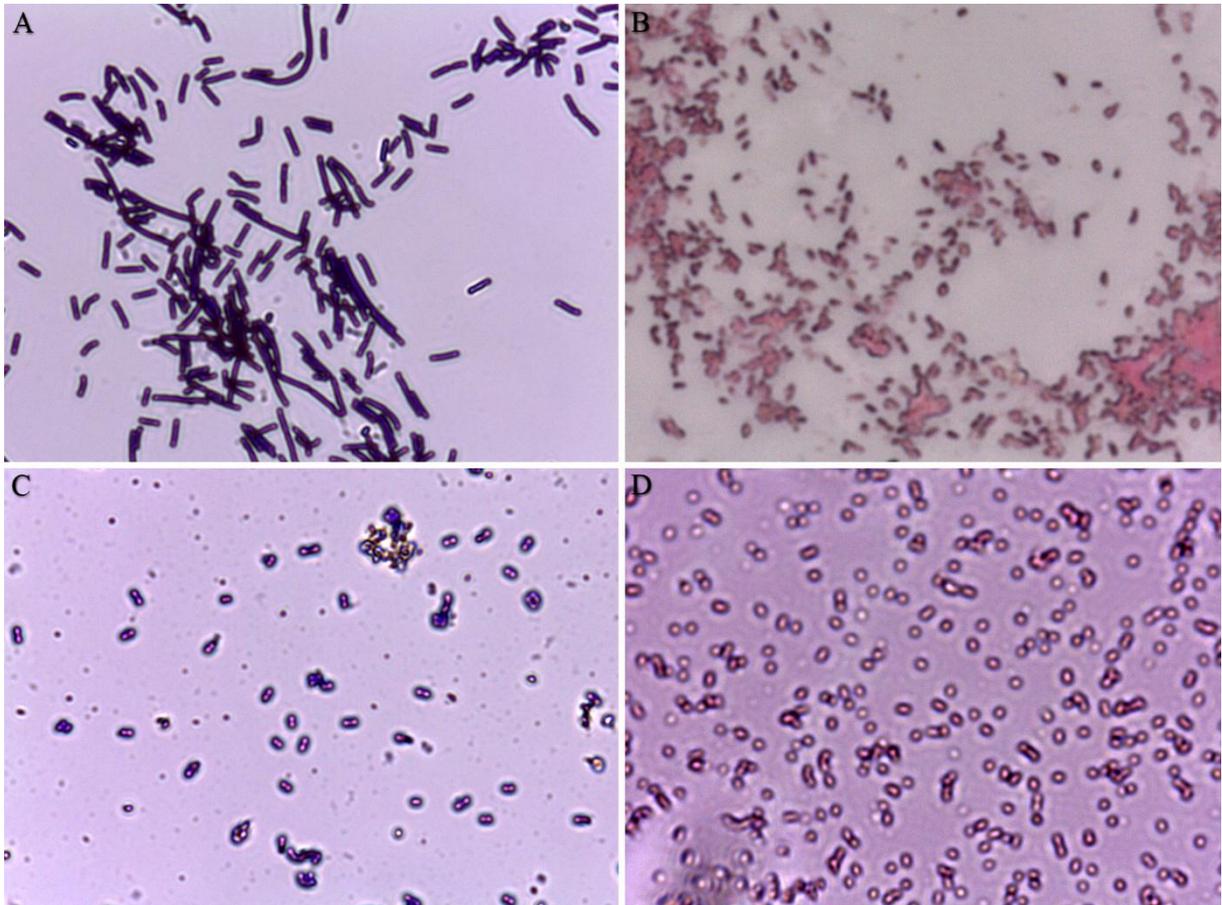
Com base nos resultados apresentados e os dados da literatura, foi possível observar as diferenças e diversidade morfológicas entre os isolados de raiz de plantas de arroz cultivado no Cerrado. Assim, essa etapa de caracterização morfológica se mostrou como uma avaliação inicial importante na identificação de novos táxons e mensuração de diversidade, além de permitir o agrupamento de isolados com fenótipos de interesse para posterior caracterização genotípica (JESUS et al. 2005).

### 5.1.1 Coloração de Gram

A coloração de Gram revelou predominância de formas celulares do tipo cocos em 77% dos isolados. Destes, 12 (R23, R50, R59, R68, R130, R136A, R136B, R141, R147A, R147B, R158 e R161) apresentaram coloração avermelhada

característico de bactérias Gram-negativas. Já os isolados R18, R21A, R21B, R62A e R64 foram classificadas como Gram-positivas pela coloração violeta (Figura 4).

**Figura 4:** Coloração de Gram em objetiva de imersão (100 x). A: bacilos Gram-positivo (R20); B: bacilos Gram-negativo (R145); C: cocos Gram-positivo (R18); D: cocos Gram-negativo (R50).



A forma celular bacilar foi observada em 18% dos isolados, sendo o isolado R20 considerado Gram-positivo e os isolados R139, R145 e R148 Gram-negativo, aspecto morfológico semelhante às estirpes de referência (Figura 4). Segundo Somasegaran e Hoben (1985); Young e Haukka (1996) e Garrity e Holt (2001), as bactérias do gênero *Rhizobium* e *Azospirillum* são descritas como aeróbicas, gram-negativas e forma celular bacilar. Assim, os resultados para as estirpes de referência estão em acordo com a literatura.

Foi observado morfologia distinta das demais bactérias, apenas para o isolado R62B que apresentou forma filamentosa com intensa coloração violeta. Essa característica é comum aos actinomicetos, grupo de bactérias gram-positivas que

apresentam forma filamentosa, semelhantes as hifas presentes em fungos (YOSHIDA et al. 2008).

## 5.2 Caracterização bioquímica

### 5.2.1 Avaliação de tolerância a antibióticos

Em relação à resistência intrínseca aos antimicrobianos testados, foi observado que apenas dois isolados (R21B e R59) foram resistentes a todos os antibióticos testados na concentração referencia utilizada para as avaliações ( $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Todos os isolados apresentaram crescimento em ácido nalidíxico e 91% demonstram sensibilidade a estreptomicina (Tabela 5).

Resultados semelhantes foram observados por Hernández-Fortes et al. (2012) em isolados de rizóbios provenientes de nódulos de *Canavalia ensiformis*, onde 100% dos isolados foram resistente ao ácido nalidíxico. Já para a estreptomicina os resultados indicaram uma variação individual dos isolados, como observado no presente estudo (Tabela 5).

Foram observados comportamento similar para os isolados R18, R20 e R62B com sensibilidade para cloranfenicol, estreptomicina e tetraciclina em baixa concentração ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Os isolados R21B, R23, R50, R59, R68, R141, R145, R158 e R161 apresentaram resultados semelhantes às estirpes de referência *R. tropici* (BR322 e BR520), sendo resistente a ampicilina, cloranfenicol e estreptomicina na concentração de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Tabela 5 e Anexo II).

Diversos estudos têm sido realizados quanto à resistência a certos antimicrobianos por bactérias isoladas de arroz e milho (IKEDA et al. 2013; GUIMARÃES e BALDANI, 2013). Fernandes; Fernandes e Hungria (2003), observaram em rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros de Sergipe que 100% dos isolados foram resistentes ao ácido nalidixico, cloranfenicol e tetraciclina, 80% a ampicilina e 20% a estreptomicina em concentração  $>126 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Comparativamente, 100% dos isolados de arroz foram resistentes ao ácido nalidixico, 50% a ampicilina e a tetraciclina, 45% ao cloranfenicol e 9% a estreptomicina (Tabela 5).

**Tabela 5:** Avaliação da resistência dos 22 isolados associados à planta de arroz e três estirpes de referência *R. tropici* (BR322 e BR520) e *A. brasilense* (FP2) para concentração de 200 µg mL<sup>-1</sup> dos antibióticos ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, tetraciclina e ácido nalidíxico.

Isolados	Antibióticos (200 µg mL <sup>-1</sup> )					%CIA
	Ampicilina	Cloranfenicol	Estreptomicina	Tetraciclina	Ácido nalidíxico	
R18	-	-	-	-	+	20,0
R20	-	-	-	-	+	20,0
R21A	-	-	-	-	+	20,0
R21B	+	+	+	+	+	100,0
R23	+	+	-	+	+	80,0
R50	+	+	-	+	+	80,0
R59	+	+	+	+	+	100,0
R62A	-	-	-	-	+	20,0
R62B	-	-	-	-	+	20,0
R64	-	-	-	-	+	20,0
R68	+	+	-	+	+	80,0
R130	+	-	-	-	+	40,0
R136A	-	-	-	-	+	20,0
R136B	-	-	-	-	+	20,0
R139	-	+	-	+	+	60,0
R141	+	+	-	+	+	80,0
R145	+	+	-	+	+	80,0
R147A	-	-	-	-	+	20,0
R147B	-	-	-	-	+	20,0
R148	+	-	-	+	+	60,0
R158	+	+	-	+	+	80,0
R161	+	+	-	+	+	80,0
BR322	+	-	+	+	+	80,0
BR520	+	+	-	-	+	60,0
FP2	+	-	+	-	+	60,0
%CICA	56,0	44,0	16,0	48,0	100,0	

Resistência ao antimicrobiano (+); Sensibilidade ao antimicrobiano (-).

%CIA: Percentagem de crescimento dos isolados nos diferentes antibióticos.

%CICA: Percentagem de crescimento dos isolados em cada antibiótico testado.

Quando observado resistência a mais de uma classe de antibiótico, indica que as bactérias apresentam mais de uma estratégia molecular para inativar a atividade presente nos antibióticos (MELO, 2000). Ainda, além dos fatores genéticos, aspectos fisiológicos apresentados pela colônia podem dificultar a assimilação do agente antimicrobiano. Dados da literatura mostram uma associação entre resistência a antibióticos e produção de muco. Isso porque, acredita-se que o muco pode dificultar a assimilação do antibiótico por impedir a passagem de substâncias para dentro da célula bacteriana (MARTINS et al. 1997).

No presente estudo, foi observado que, bactérias com produção de muco mostraram ser mais resistentes aos antibióticos testados, sendo os isolados R21B, R59 resistente a todas as classes antibacterianas testadas (Tabela 5 e Anexo II). Já

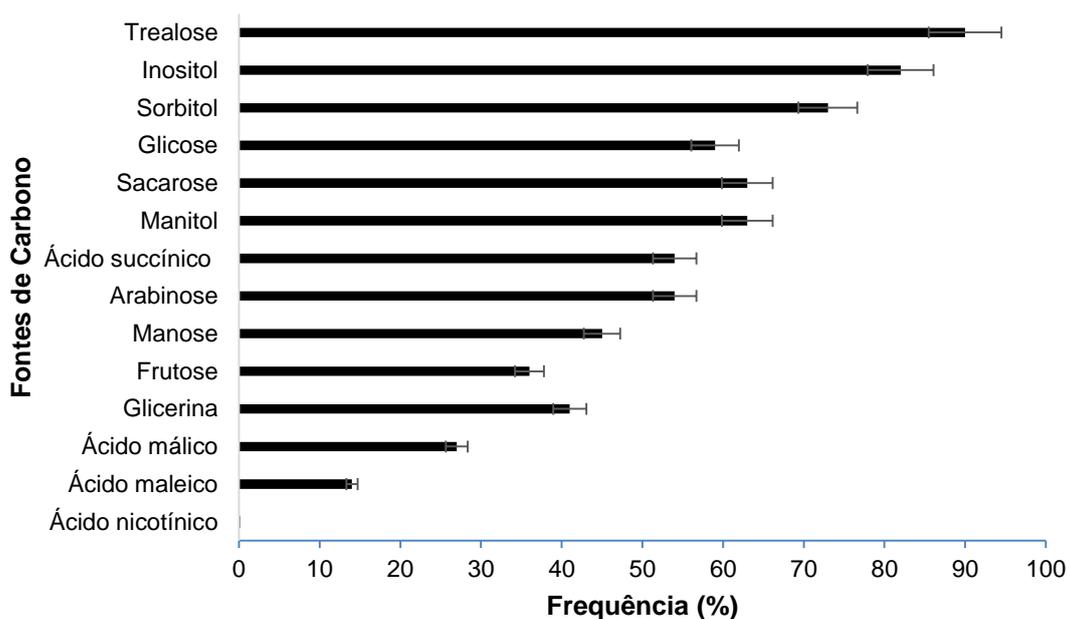
os isolados R23, R50 R68, R141, R145, R158 e R161 foram resistentes para quatro classes e R148 e R130 para três e duas, respectivamente (Tabela 5 e Anexo II). Em contrapartida, os isolados de produção escassa (R18, R20, R62A, R62B e R64) foram sensíveis a quatro classes em concentração mínima ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Anexo II). Porém, para determinar corretamente se existe relação entre esses fatores, outros estudos deverão ser realizados.

A susceptibilidade ou resistência apresentada por algumas bactérias do solo são utilizadas como indicador de sobrevivência e competição por nutrientes na rizosfera, uma região de intensa atividade metabólica (COSTA et al. 2014). Estas linhagens resistentes apresentam grande potencial para serem utilizadas na elaboração de inoculantes, principalmente se forem RPCP.

### 5.2.2 Teste de crescimento em fontes de carbono

Com base nos resultados obtidos foi observado que dentre as fontes mais utilizadas estão os açúcares, como monossacarídeos (glicose), dissacarídeos (sacarose e trealose) e polióis (inositol e sorbitol) (Figura 5). Já as menos utilizadas foram às fontes de natureza química ácida como o ácido nicotínico, ácido maléico e ácido málico (Figura 5 e Anexo III).

**Figura 5:** Percentual do uso de fontes de carbono utilizadas por 22 isolados bacterianos associados à planta de arroz.



A partir desses dados foi possível destacar que os isolados R148 e R161 metabolizaram 12 (86%) das 14 fontes testadas. Já 18% dos isolados (R136B, R147A, R147B e R158), assim como as estirpes de referência BR322 e BR520, apresentaram crescimento satisfatório em 71% das fontes utilizadas. Para a estirpe de referência FP2 foi observado metabolização de 64% das fontes utilizadas. Não foi observado para os demais isolados um padrão na utilização das fontes de C, indicando uma variabilidade metabólica.

Os isolados de crescimento muito rápido e produção de muco abundante apresentaram melhor desempenho e assimilação das fontes testadas (Tabela 4 e Figura 5), o que pode indicar sucesso na colonização dos ambientes, assim como os dados obtidos por Badri et al. (2013) e Hernández-Forte e Garcia (2017). A variabilidade na capacidade de utilização das fontes de C pode indicar estratégias ecológica diferentes dos isolados de arroz testados, o qual são reforçados pelos resultados dos demais ensaios realizados para estas bactérias (Anexo III).

Para Fernandes-Junior; Rumjanek e Xavier (2011), a metabolização de diferentes fontes de carbono é comum em isolados bacterianos de crescimento rápido e alta produção de muco. Ainda, em seu estudo, os autores observaram que fontes como frutose e xilose contribuem para o aumento de produção de EPS em meio de cultivo YM. No presente estudo, apenas quatro entre nove isolados que apresentaram alta produção de muco cresceram e produziram muco em meio suplementado com frutose. Entretanto, para os demais açúcares testado houve metabolização e alta produção de muco.

Braga (2012), ao promover a caracterização morfofisiológica de bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas* isoladas de arroz, observou maiores índices de crescimento em meio contendo sacarose como fonte de carbono. Comparativamente nos 22 isolados de arroz, 63% demonstraram crescimento em sacarose, sendo as fontes mais utilizadas a trealose (90%), inositol (82%) e sorbitol (73%). Ao contrário do observado por Braga (2012) que revelou baixa frequência no uso do inositol (35%) e sorbitol (27%). Esses resultados possibilitam a distinção de alguns isolados da presente pesquisa quando comparados aos gêneros identificados pelo autor, demonstrando que há grande diversidade metabólica no uso de diferentes fontes de carbono entre os isolados associados a planta de arroz no Cerrado goiano.

A utilização variável de fontes de carbono, como ácidos orgânicos, monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos, são características investigadas em vários estudos de bactérias endofíticas indicando a grande complexidade de microrganismos que colonizam o interior das plantas (CASTELLANE e LEMOS, 2007; BERGE et al. 2009).

Segundo Graham e colaboradores (1991); Cavaglieri; Passone e Etcheverry (2004), bactérias do gênero *Rhizobium* utilizam diversos carboidratos como fontes de carbono. Entretanto, alguns autores mencionam a baixa afinidade dessas bactérias em assimilar fontes de carbono de caráter ácido (BERGE et al. 2009), em acordo com os resultados apresentados no presente estudo, para quatro fontes ácidas testadas, houve crescimento satisfatório das estirpes de referência (BR322 e BR520) apenas em ácido succínico. Pelos dados obtidos é possível supor que os demais isolados avaliados também são menos propensos em utilizar fontes ácidas, indicando metabolismo característico para o ambiente do Cerrado.

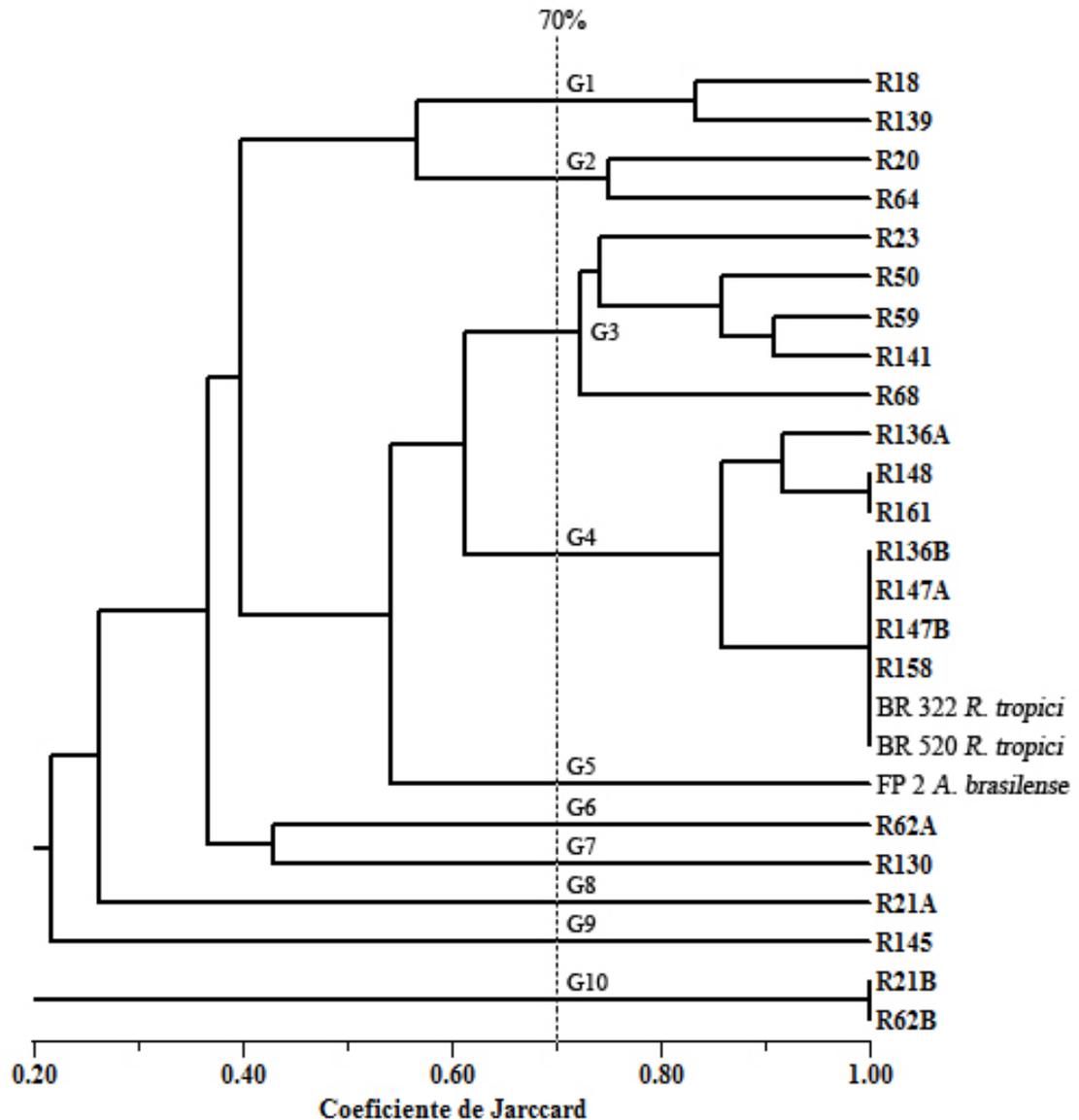
O uso de diferentes fontes de carbono apresentadas por algumas bactérias podem ser úteis na otimização da produção de bioprodutos (NERY et al. 2008; TRINDADE; MUNHOZ e BURKERT, 2014) e como critério de diferenciação entre algumas espécies. Olivares (1997), relata o uso das fontes de carbono N-acetil-glucosamina e meso-eritritol na diferenciação das espécies do gênero *Herbaspirillum*.

Pela análise dos resultados foi elaborado um dendrograma sendo definidos 10 grupos com índice de similaridade em torno de 70% (Figura 6). Entre os agrupamentos, G1 e G2 foram compostos por dois isolados cada: R18, R139 e R20, R64, respectivamente. Em ambos os grupos foi observado a ausência de crescimento em fontes de C de natureza ácida.

O maior grupo obtido foi o G4 que apresentou quatro isolados (R136B, R147A, R147B, e R158) com 100% de similaridade com as estirpes de referência BR322 e BR520 (*R. tropici*) (Figura 6). As bactérias incluídas nesse grupo demonstraram ser capazes de assimilar 71% das fontes de carbono fornecidas, indicando semelhanças metabólicas entre as mesmas. Já os isolados R23, R50, R59, R68 e R141 do grupo G3 mostraram aproximadamente 63% de similaridade com as estirpes de referência (Figura 6). Os resultados indicam que os isolados de arroz podem estar taxonomicamente relacionados à família *Rhizobiaceae* pela

semelhança metabólica observada, porém outras características são necessárias para determinação taxonômica destes isolados.

**Figura 6:** Dendrograma de similaridade gerado pelo software NTSYS-pc® 2.10 com base no uso de fontes de carbono por isolados bacterianos associados à planta de arroz e três estirpes de referência *R. tropici* (BR322 e BR520) e *A. brasilense* (FP2) utilizando o coeficiente de Jaccard, por intermédio do algoritmo UPGMA. Foi considerado 70% de similaridade como ponto de corte para o agrupamento dos isolados.



Em relação aos demais isolados, os grupos G5 (FP2), G6 (R62A), G7 (R130), G8 (R21A), G9 (R145) e no G10 (R21B e R62B) foram os que apresentaram resultados mais divergentes (Figura 6). Foi observado dois isolados (G10) com baixa

similaridade com o restante das bactérias avaliadas, onde estas não apresentaram crescimento em nenhuma das fontes testadas (Figura 6 e Anexo III).

Na análise polifásica para a caracterização fenotípica de microrganismos é comumente utilizados vários parâmetros como os ecológicos, sorológicos, resistência a antibióticos e tolerância a diversos fatores, tais como: salinidade, variações do pH e temperatura, uso de fontes de carbono dentre outros (PEREIRA, 2002). Alguns autores têm buscado revelar a diversidade microbiana através dessas caracterizações, com ênfase no uso de diferentes fontes de carbono (ALVES, 2005; RODRIGUES et al. 2006; BARBOSA et al. 2006; CASTELLANE e LEMOS 2007; LEONEL et al. 2014).

### **5.2.3 Avaliação enzimática**

#### **5.2.3.1 Teste de catalase**

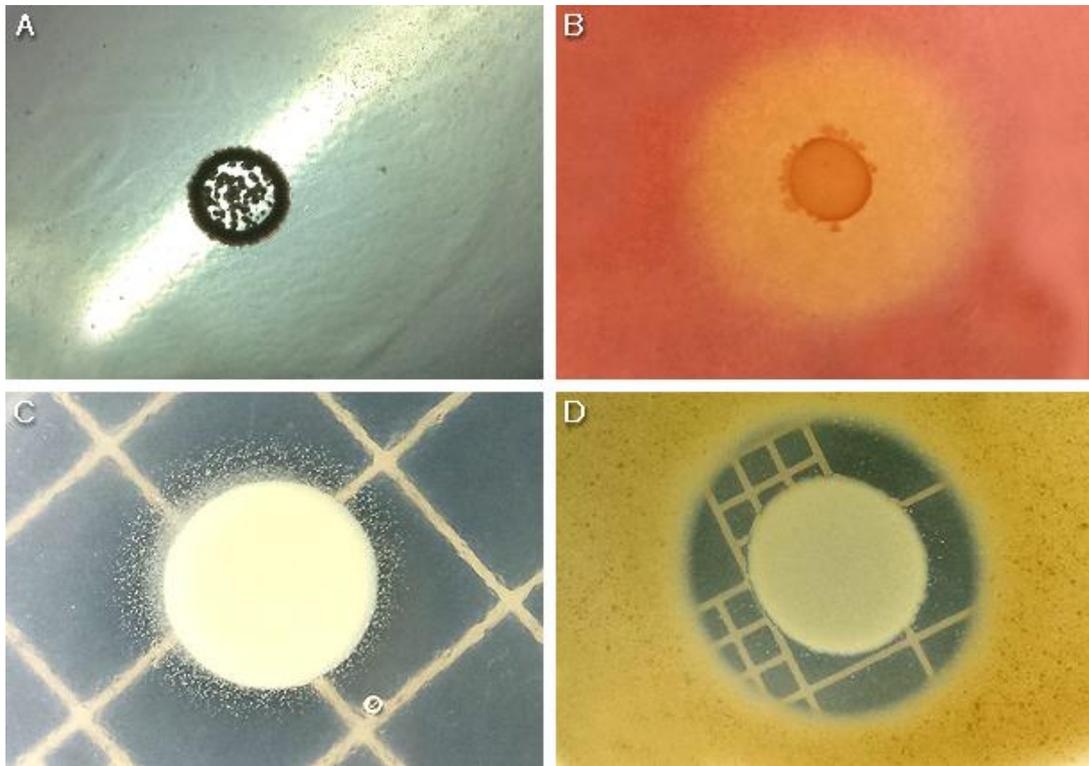
Para o teste de catalase, 95% dos isolados apresentaram atividade positiva, assim como as estirpes de referência, e apenas o isolado R145 apresentou atividade negativa (Anexo III). Mbai et al. (2013), ao estudar 73 bactérias endofíticas de arroz, observou 100% de isolados positivos para este teste, similar ao observado para os isolados de arroz avaliados. Os autores concluíram que esse é um aspecto importante a ser observado em linhagens bacterianas, uma vez que essa habilidade evita o estresse oxidativo e pode ser utilizada no combate da toxicidade celular.

Outros estudos apontam a presença da catalase como critério distintivo na identificação do gênero *Pseudomonas*, porém, destacam a necessidade de testes moleculares para a determinação taxonômica específica (REZENDE et al. 2009). Entretanto, segundo Ikeda (2010), a presença da enzima é comum em diversos gêneros bacterianos, não sendo possível a distinção entre espécies ou gêneros apenas pela análise dessa característica.

#### **5.2.3.2 Enzimas hidrolíticas**

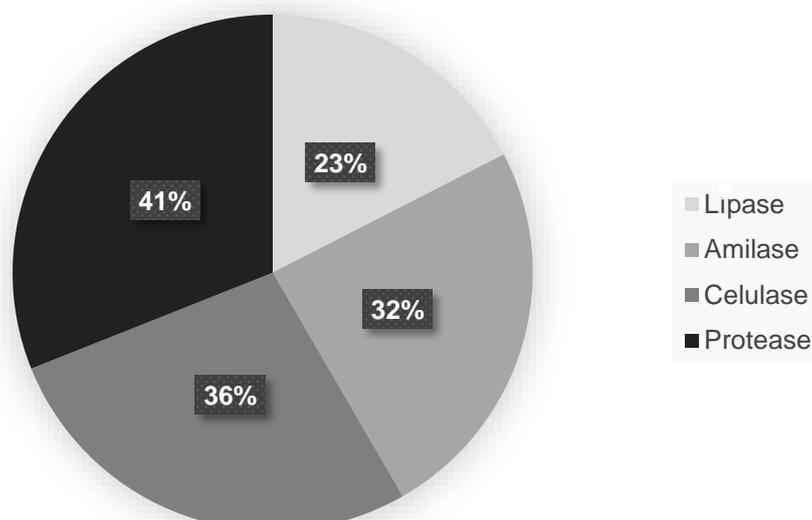
A atividade enzimática dos isolados de arroz e das estirpes de referência foram positiva mediante ao surgimento de zonas claras ao redor da colônia, indicando a liberação de enzimas extracelulares e degradação da fonte de carbono utilizada (MACIEL, 2006; SILVA et al. 2015b) (Figura 7).

**Figura 7:** Halo de degradação enzimática do substrato (fonte de carbono). A: amilase; B: celulase; C: lipase; D: protease.



Dos 22 isolados bacterianos, nove foram positivos para atividade proteolítica (41%); oito celulolítica (36%), sete amilolítica (32%) e cinco lipolítica (23%) (Figura 7 e Figura 8). Entre os isolados testados destacam as bactérias R59, R68 e R141 que foram positivas em pelo menos dois testes das enzimas hidrolíticas testadas (Anexo III).

**Figura 8:** Percentagem dos testes de enzimas hidrolíticas dos 22 isolados bacterianos associado à planta de arroz a partir de métodos semi-quantitativos.



Muito estudos tem realizado a avaliação qualitativa de enzimas hidrolíticas em bactérias associadas a plantas de interesse agrônômico (GUJRAL et al. 2013; JI et al. 2013; MBAI et al. 2013; FERREIRA et al. 2014). Szilagyi-Zecchin e colaboradores (2014), observaram a presença de enzimas hidrolíticas em isolados bacterianos de raízes de milho (*Zea mays*), sendo estas relacionadas a atividade de antibiose contra fitopatógenos. A presença de enzimas hidrolíticas como a celulase (2,6%) e a protease (13%) também foram observadas em bactérias endofíticas do sorgo (*Sorghum bicolor* L.) (MAREQUE et al. 2015). Comparando a presença de celulases, os isolados de arroz testados apresentam maior frequência do que os observados por Mareque e colaboradores (2015).

Comumente, para os testes de análise enzimática são utilizados métodos para obtenção do índice de atividade enzimática (IE). O índice é utilizado para mensurar a capacidade de produção de enzimas por microrganismos em meio sólido (LEALEM e GASHE, 1994). Desse modo, é recomendado para o resultado desse tipo de análise valores  $\geq 2,0$ , para considerar um microrganismo como um bom produtor de enzimas hidrolíticas em meio sólido (CESKA, 1971; STAMFORD; ARAÚJO e STAMFORD, 1998; NUNES et al. 2013).

A avaliação dos índices enzimáticos para a atividade amilolítica revelou IE médio de 2,8, variando entre 1,4 a 3,7. Desses, os isolados R18, R20, R62A, R64 e R68 apresentaram IE  $\geq 3,0$ , sendo considerados produtores com alta concentração desta enzima (Tabela 8). Foram identificados dois isolados (R21A e R62B) como bons produtores, com IE de 2,1 e 1,4, respectivamente. As demais bactérias (68%) não apresentaram atividade positiva para a enzima.

Oliveira e colaboradores (2007), relatou atividade positiva em 19 isolados nativos da Amazônia, onde sete exibiram IE  $\geq 2,0$ . Já Fernandes-Junior e colaboradores (2012), ao estudar rizóbios isolados de nódulos de feijão-guandu (*Cajanus cajan*), constataram alta frequência na produção de amilase, sendo um isolado com IE  $\geq 3,5$ . Na presente pesquisa, os valores de IE observados foram superiores aos relatados pela literatura, indicando que os isolados de plantas de arroz testados são bons produtores amilolítico que podem apresentar potencial para aplicações de fins biotecnológicos (Tabela 8).

**Tabela 8:** Índice enzimático para os 22 isolados bacterianos associados à planta de arroz e três estirpes de referência *R. tropici* (BR322 e BR520) e *A. brasilense* (FP2).

Isolados	Índice enzimático (IE)			
	Amilase	Celulase	Lipase	Protease
R18	3,7±0	4,1±0,35	-	1,6±0
R20	3,2±0,33	3,1±0,20	-	1,7±0,06
R21A	2,1±0,75	2,9±0,14	-	2,0±0,07
R21B	-	-	-	-
R23	-	-	1,2±0,07	-
R50	-	-	1,2±0,01	-
R59	-	-	1,1±0,07	1,5±0,15
R62A	3,0±0,06	3,2±0	-	2,5±0,05
R62B	1,4±0,11	-	-	-
R64	3,2±0,07	3,5±0,14	-	1,6±0,13
R68	3,4±0,07	-	1,2±0	-
R130	-	3,7±0	-	1,3±0,12
R136A	-	-	-	-
R136B	-	4,5±0,08	-	1,6±0,20
R139	-	-	-	-
R141	-	-	1,1±0	1,6±0,05
R145	-	3,0±0	-	-
R147A	-	-	-	-
R147B	-	-	-	-
R148	-	-	-	-
R158	-	-	-	-
R161	-	-	-	-
BR322	-	-	-	-
BR520	-	-	-	-
FP2	-	-	-	-

Ausência de atividade para enzima testada (-)

Muitos autores têm discutido a importância do amido no processo de formação e desenvolvimento de nódulos em leguminosas, sendo essa relação observada em nódulos e células corticais de alfafa nodulada por *R. meliloti* (ARDOUREL et al.1994; OLIVEIRA et al. 2006). As amilases produzidas por esses microrganismos são responsáveis pela hidrólise de moléculas de amido resultando na formação de polímeros compostos de moléculas de glicose, utilizada em diversos processos metabólicos celulares (LIN et al. 1997).

As amilases apresentam ainda ampla aplicação comercial, principalmente as produzidas por bactérias do gênero *Bacillus* (ABD-ELHALEM et al. 2015). Essas

enzimas desempenham papel fundamental nas indústrias de alimento e fermentação, principalmente na fabricação de refrigerantes, cervejarias, geléias, iogurte e na produção do etanol (PANDEY et al. (2000), ainda podem ser utilizadas na indústria de papel e têxtil (KIRK; BORCHERT e FUGLSANG, 2002).

O uso das celulases tem sido mencionado em indústrias têxtil e de papel, utilizadas no preparo de detergentes, extração de óleos e pigmentos, preparo de alimentos entre outros (BHAT, 2000; FAWZYA et al. 2013). A literatura relata alguns gêneros bacterianos que apresentam atividade celulolítica, tais como, *Acetivibrio*, *Alteromonas*, *Bacillus*, *Bacteriodes*, *Bradyrhizobium*, *Cellulomonas*, *Clostridium*, *Curtobacterium*, *Marinobacte*, *Vibrio*, *Rhizobium*, *Rumminococcus*, *Sanguibacter*, *Sinorhizobium* e *Pedobacter* (ROBOSON e CHAMBLISS, 1898; JIMENEZ-ZURDO et al. 1996; MAWADZA et al. 2000; HU e LIN, 2003; LEE et al. 2008; KIM et al. 2009; SHANMUGHAPRIYA et al. 2010; GAO et al. 2010).

Os resultados observados para a atividade celulolítica mostraram IE médio de 3,5, variando entre 2,9 a 4,5 (Tabela 8). Dentre os isolados avaliados, R18, R130 e R136B apresentaram IE 4,1, 3,7 e 4,5, respectivamente, merecendo destaque quanto à produção de celulase, que poderá ser utilizado na formulação de bioprodutos.

Oliveira (2015), avaliando enzimas hidrolítica de 73 isolados oriundos de amostras de solo, verificou a presença de 13 bactérias com perfil celulolítico crescidas em meio suplementando com CMC. Os valores de IE obtidos no estudo ficaram em média de 2,64, comparativamente, as bactérias de arroz testadas possuem IE médio de 3,5 para a atividade celulolítica.

A principal fonte de obtenção de lipases para fins biotecnológicos, são os microrganismos como fungos e bactérias apresentando aplicações na indústria como a produção de produtos farmacêuticos, laticínios, agroquímicos, pesticidas e inseticidas (JAEGER e EGGERT, 2002; MESSIAS et al. 2011).

Os gêneros bacterianos *Bacillus*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Staphylococcus* e *Pseudomonas* já são descritos como bons produtores de lipases (SHAH e WILSON, 1965; JAEGER et al. 1997; KAMBOUROVA et al. 2003; KHATTABI et al. 2003; FERNANDES et al. 2007; MOSBAH et al. 2007; YOO et al. 2011). A presença da enzima na bactéria está associada a mecanismo de defesa, facilitando o processo

de absorção de lipídeos e ácidos graxos livres, adesão tecidual e invasão celular (STEHR et al. 2003).

A atividade lipolítica detectada para as 22 bactérias isoladas de arroz apresentou IE médio de 1,2, variando entre 1,1 a 1,2 (Tabela 8). De 73 isolados bacterianos avaliados por Oliveira (2015), 18% demonstraram atividade positiva para lipase, sendo o IE médio de 1,8, resultado superior ao encontrado para bactérias de arroz.

Minotto e colaboradores (2014), avaliando 23 actinobactérias nativas do Rio Grande do Sul, verificaram que 91% produziram lipase em três temperaturas distintas. Os autores obtiveram apenas dois isolados com resposta negativa para lipase, o que indica que os isolados deste ambiente possuem alta frequência para esta enzima diferente dos resultados observados para os endofíticos de arroz (Figura 8 e Tabela 8).

A presença de protease foi identificada em nove isolados com IE médio de 1,7. Os maiores IE observados para enzima foram para os isolados R21A e R62A com IE de 2,0 e 2,5 respectivamente (Tabela 8). Oliveira et al. (2006), observou que dentre 67 isolados testados, 28,4% apresentaram atividade proteolítica, sendo o maior IE de 6,6 em pH neutro. Alguns fatores podem estar relacionados à baixa quantidade enzimática em meio sólido, como a falta de substrato e condições necessárias para produção substancial da enzima, sendo estes distintos para cada microrganismo (RAO et al. 2006; OSKOUIE et al. 2008).

Segundo Beg e Gupta (2003), dentre os gêneros bacteriano, *Bacillus* apresenta várias espécies reconhecidas pela elevada produção de proteases, sendo as linhagens de *B. subtilis* consideradas a maior fonte de protease alcalina comercial. Patel e Singh (2005), constataram que a produção de protease por *Bacillus* sp. está relacionada a disponibilidade de carbono e nitrogênio em meio de cultura, sendo a produção enzimática favorecida na presença de aminoácidos, peptona e extrato de levedura.

Pelos dados obtidos cinco isolados (R18, R20, R21A, R62A e R64) apresentaram a capacidade de produção de enzimas amilase, celulase e protease, sendo considerados os mais interessantes para futuros estudos em enzimas extracelulares.

### 5.2.3.3 Solubilização de fosfato inorgânico

O fósforo (P) é um nutriente essencial para as plantas, porém no solo encontra-se na sua forma inorgânica sendo indisponível para os vegetais. Assim, o uso de inoculantes ou o manejo de bactérias com capacidade de solubilizar o fosfato inorgânico à orgânico pode ser uma alternativa sustentável capaz de suprir o déficit de P pelas plantas (SOUCHIE et al. 2005). Dentre essas, alguns gêneros, como *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* e *Rhizobium*, estão entre as mais eficientes na solubilização do P (RODRÍGUEZ e FRAGA, 1999), sendo algumas dessas já relatadas em associação à planta de arroz (MBAI et al. 2013; FERREIRA et al. 2014).

Mediante ao índice de solubilização (IS) calculado segundo método de Lealem e Gashe (1994), as bactérias foram classificadas como isolados com baixo ( $IS < 2$ ), médio ( $2 \leq IS < 4$ ) e alto índice de solubilização ( $IS > 4$ ) (HARA e OLIVEIRA, 2005). A determinação do IS para os isolados testados no meio NBRI-P (fosfato ácido) apresentou valor médio de 2,1, e 1,3 para o meio Pikoviskaya (fosfato básico) (Tabela 9). No meio NBRI-P seis isolados exibiram IS considerado médio (R23, R50, R59, R68, R141 e R161) e cinco com IS baixo (R62B, R136A, R147A e R147B) (Tabela 9). Na avaliação do meio Pikoviskaya todos os isolados foram classificados como baixo solubilizador e os maiores valores de IS observado foi de 1,5 para três bactéria (R50, R59 e R161). Entretanto, segundo Costa (2011), mesmo que os isolados sejam classificados com baixo índice de solubilização, são ainda considerados solubilizadores de fosfato em potencial.

Foi observado que os isolados R130 e R145 solubilizaram o meio Pikoviskaya ( $IS = 1,2$  e  $1,1$ , respectivamente), porém não houve formação de halo de degradação no meio NBRI-P. Já para os isolados R62B e R136A apresentaram resultado positivo apenas no meio NBRI-P (Tabela 9). O mesmo resultado foi observado por Lima (2013), em estudo com isolados bacterianos de milho. O autor revelou que esse comportamento pode estar relacionado a adaptações específicas desses microrganismos de solos do Cerrado quanto ao uso do fosfato inorgânico.

**Tabela 9:** Índice de solubilização de fosfato dos 22 isolados bacterianos associados à planta de arroz e três estirpes de referência *R. tropici* (BR322 e BR520) e *A. brasilense* (FP2).

Isolados	Índice de solubilização (IS)	
	Fosfato ácido (NBRI-P)	Fosfato básico (Pikovskaya)
R18	-	-
R20	-	-
R21A	-	-
R21B	-	-
R23	2,4±0,19	1,3±0
R50	2,5±0,25	1,5±0,19
R59	2,6±0,34	1,5±0,12
R62A	-	-
R62B	1,1±0,04	-
R64	-	-
R68	2,7±0,5	1,4±0,07
R130	-	1,2±0,07
R136A	1,8±0,09	-
R136B	-	-
R139	-	-
R141	2,1±0	1,4±0,16
R145	-	1,1±0,09
R147A	1,8±0,16	1,2±0,03
R147B	1,8±0,09	1,2±0,06
R148	-	-
R158	1,9±0,25	1,2±0,04
R161	2,8±0,16	1,5±0,07
BR322	1,6±0,08	1,2±0,07
BR520	1,6±0,13	1,2±0,07
FP2	-	-

Ausência de atividade para enzima testada (-)

Todas as estirpes de referência para o gênero *Rhizobium* apresentaram capacidade de solubilização de fosfato (Tabela 9) como já descrito por Rodríguez e Fraga 1999; Igual et al. 2001. Por outro lado, a estirpe *Azospirillum brasilense* (FP2) não mostrou atividade de solubilização de fosfato nas condições testadas (Tabela 9). Seshadri e colaboradores (2000) cultivaram três isolados de *Azospirillum halopraeferans* em meio Pikovskaya e não foram observadas atividade de solubilização de fosfato, resultado semelhante ao presente estudo.

Ji e colaboradores (2013) e Mbai e colaboradores (2013) observaram a capacidade de solubilização de fosfato em bactérias endofíticas do arroz cultivado na

Coreia (33%) e no Kenia (64%), respectivamente. Esta percentagem está próxima o observada em nosso estudo onde 59% das bactérias avaliadas apresentaram resultado positivo para solubilização de fosfato (Tabela 9).

Santos e colaboradores (2016) avaliaram a capacidade de solubilização de fosfato em isolados endofíticos da cana-de-açúcar, sendo observado resultado positivo para 97,2% das amostras, sendo elas oriundas da rizosfera e raízes (endofíticas). Já Santos e colaboradores (2012) observaram que bactérias da rizosfera apresentam valores de IS superior as de bactérias endofíticas, indicando que o habitat influencia no metabolismo desses microrganismos. Na rizosfera já foi constatado populações bacterianas com intensa atividade metabólica, pois esta possui secreções exsudadas pelo sistema radicular das plantas (BAREA et al. 2005; TAURIAN et al. 2010).

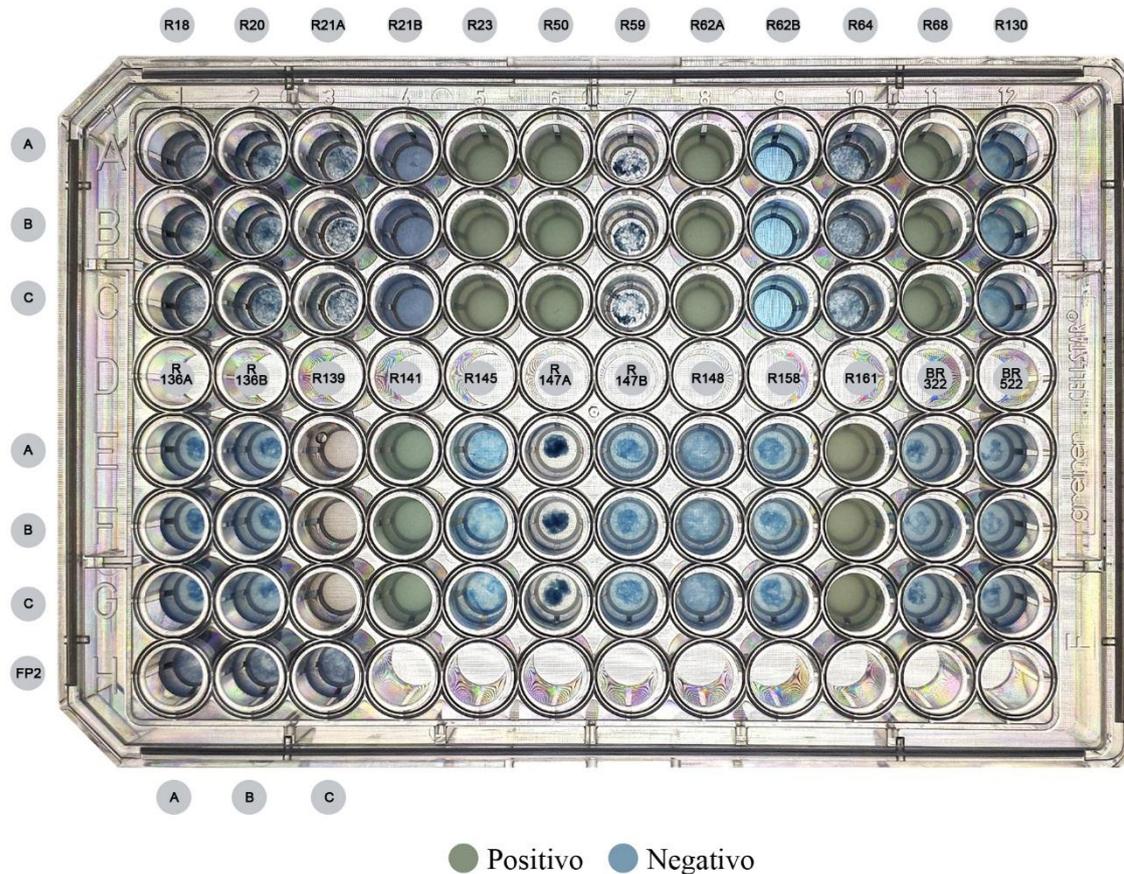
Considerando os dois testes avaliados os isolados R23, R50, R59, R68, R141 e R161 foram os mais promissores para serem explorados quanto a capacidade de solubilizar fosfato.

### **5.2.3 Detecção de sideróforo pelo método de CAS**

O ferro é um elemento essencial para o metabolismo das bactérias, participando da ativação de diversas enzimas e do transporte de elétrons, além de atuar como cofator enzimático (RODRIGUEZ; SMITH, 2003; RATLEDGE, 2004). Para as bactérias RPCP, o ferro é importante durante o processo da FBN, catalisada pela enzima nitrogenase, onde a presença do íon é utilizada na reação de redução do nitrogênio em amônio (HERNÁNDEZ-FORTE; GARCÍA e MORALES-MENA, 2015). Entretanto, o ferro apresenta baixa solubilidade no solo e para competirem por esse elemento, esses microrganismos sintetizam e liberam sideróforos, moléculas quelantes de íons férricos (MA, 2005; GLICK, 2012).

Dentre os isolados analisados, 27% (R23, R50, R62A, R68, R141 e R161) foram capazes de produzir sideróforos em meio de cultivo (Figura 9 e Anexo III).

**Figura 9:** Método colorimétrico para detecção de sideróforo para os isolados bacterianos associados à planta de arroz e três estirpes de referência *R. tropici* (BR322 e BR520) e *A. brasilense* (FP2). A, B e C: triplicatas.



Diversos trabalhos mostram que a produção de sideróforos é uma característica importante em bactérias RPCP, por estimular o crescimento do vegetal, inibindo a ação de patógenos por tornarem o ferro menos disponíveis no solo (AHEMAD e KHAN, 2010; GLICK, 2012; AHEMAD e KHAN, 2012). Segundo Levier e Guerinot (1996), a produção de sideróforos são mais comum em bactérias do gênero *Rhizobium*, devido sua capacidade de crescimento em solos mais ácidos, onde a disponibilidade do ferro é mais elevada. Contudo, a presença de sideróforos já foram observados em outros gêneros de bactérias RPCP, que incluem *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Mesorhizobium*, *Pseudomonas* e *Sinorhizobium* (RODRIGUES et al. 2008; JIANG et al. 2008; AHEMAD e KHAN, 2010; AHEMAD e KHAN, 2011a; AHEMAD e KHAN, 2011b; AHEMAD e KHAN, 2012).

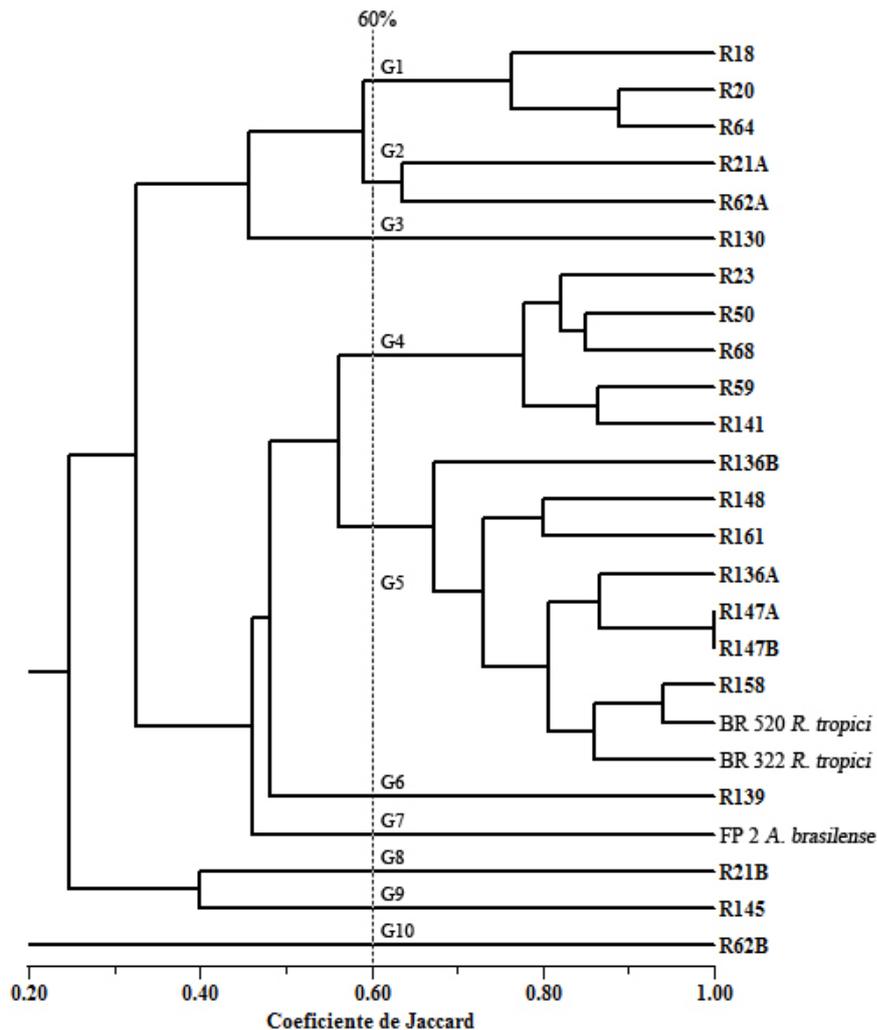
Assim, é possível supor que os isolados com atividade de solubilização de ferro possam atuar como RPCP, sendo necessários avaliações específicas para

testar esta probabilidade. Uma outra observação que pode reforçar esta possibilidade é que os isolados R23, R50, R68, R141 e R161 também apresentaram alta capacidade de solubilizar fosfato inorgânico ácido.

#### 5.2.4 Análise de similaridade para as características bioquímicas

A fim de determinar o grau de similaridade entre as linhagens bacterianas foi elaborada uma matriz binária com base em todos os caracteres bioquímicos avaliados para as 22 bactérias testadas, sendo definido a presença de 10 grupos com índice de similaridade em torno de 60% (Figura 10).

**Figura 10:** Dendrograma de similaridade gerado pelo software NTSYS-pc® 2.10 com base na caracterização bioquímica dos isolados bacterianos associados à planta de arroz e três estirpes de referência *R. tropici* (BR322 e BR520) e *A. brasilense* (FP2) utilizando o coeficiente de Jaccard, por intermédio do algoritmo UPGMA. Foi considerado 60% de similaridade como ponto de corte para o agrupamento dos isolados.



A partir do dendrograma é possível inferir que há variabilidade metabólica entre os isolados testado. Foi possível observar a formação de seis grupos contendo apenas um isolado como em G3 (R130), G6 (R139), G7 (FP2), G8 (R21B), 9 (R145) e G10 (R62B) (Figura 10), indicando que esses isolados possuem características únicas nas avaliações fenotípicas.

O grupo G1 e G2 foram formados por três (R18, R20 e R64) e dois (R21A e R62A) isolados, ambos com similaridade próxima a 35% das estirpes padrão BR322 e BR520 (Figura 10). O agrupamento G4 apresentou cinco isolados (R23, R50, R68, R59 e R141) que, assim como na análise morfológica, foram inseridos no mesmo grupo. Possivelmente, esses isolados pertencem ao mesmo grupo taxonômico, sendo estes em homologia próxima a 55% com as estirpes do gênero *Rhizobium* e 45% com *A. brasilense* (FP2) (Figura 10).

O maior agrupamento observado (G5) foi formado por sete isolados e as estirpes padrão para *Rhizobium tropici* (BR322 e BR520). Houve a formação de um subgrupo no G5 com dois isolados (R147A e R147B) 100% similar entre si (Figura 10). Os isolados presentes no G5 apresentam similaridade com as estirpes de referência, sendo possível inferir que há determinado grau de parentesco entre essas bactérias. Lima (2013), constatou a presença de sete grupos com similaridade próxima a 70% em isolados de milho utilizando as características bioquímicas, sendo que comparativamente, os resultados com bactérias de arroz demonstram diversidade metabólica superior.

Dentre os testes bioquímicos realizados foi possível observar que a maioria dos isolados apresentaram uma ou mais atividades relacionadas a promoção do crescimento de plantas. Entre os isolados testados, pode-se destacar R59, R68 e R141 que foram positivos para cinco características bioquímicas que são previstas em bactérias RPCP (Anexo III).

Segundo Glick (2012) e Khan e colaboradores (2015), as bactérias RPCP devem possuir características associadas ao vigor ou crescimento das plantas. Os seus benefícios residem em diferentes mecanismos, tais como a síntese de reguladores de crescimento de plantas, fixação de nitrogênio, solubilização de nutrientes, produção de sideróforos, enzimas e controle de fitopatógenos do solo. Assim, 86,3% (19) dos isolados são promissores como RPCP e apenas os isolados

R21B, R139 e R148 (13,7%) seriam excluídos desta categoria por não serem positivo em nenhum dos testes realizados (Anexo III).

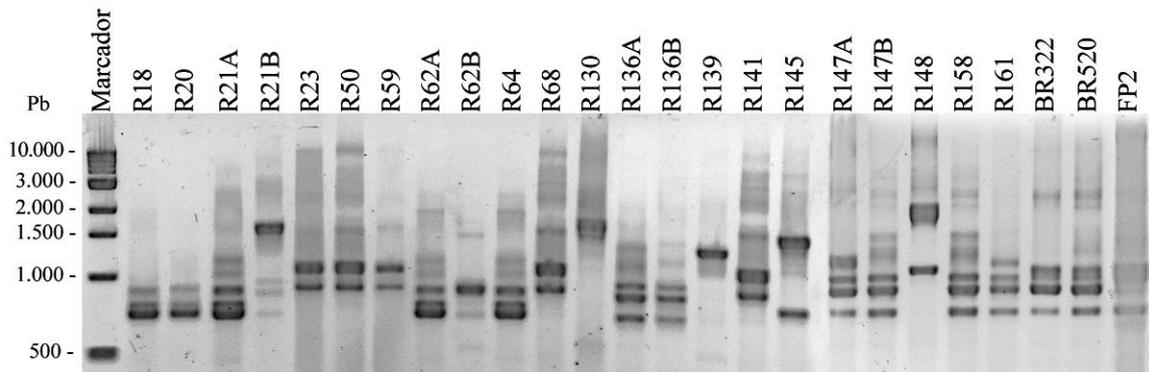
### 5.3 Caracterização genotípica

O uso de técnicas moleculares tem possibilitado o desenvolvimento de métodos simples e rápidos que permitem caracterizar e determinar a diversidade e posição taxonômica da população bacteriana estudada. Dentre essas, destaca a análise de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando genes marcadores tais como o 16S rRNA, o 23S rRNA e o espaçador intergênico 16S-23S rRNA (IGS) (LANE et al. 1985).

Essas regiões do genoma bacteriano são tidas como marcadores moleculares por serem universais e altamente conservadas (OLSON et al. 1994). Já foram identificados em diversas bactérias uma variação inter e intra específica para esta região IGS com variação de número e tamanho de fragmentos obtidos por PCR (DINGMAN, 2012; BOAKYE et al. 2016). Assim, as informações obtidas através da análise e comparação desta região intergênica tem sido importantes na mensuração da diversidade genotípica, na identificação de novas espécies ou descrição de relações filogenéticas entre a população bacteriana estudada (GARRITY e HOLL, 2001; REIS-JUNIOR et al. 2006; IKEDA, 2010; BOAKYE et al. 2016).

Os fragmentos obtidos a partir da PCR para região IGS dos 22 isolados de arroz e as estirpes de referência variaram entre 500 a 3000 pares de base (pb), com presença de uma a cinco bandas (Figura 11). Foi possível observar que entre os isolados de arroz houve predomínio de bandas entre 500 a 1500 pb (Figura 11). Padrão semelhante foi observado por Lima (2013), em estudo realizado com 24 isolados associados ao milho, os fragmentos obtidos pelo autor apresentaram variação de tamanho entre 725 a 1100 pb.

**Figura 11:** Perfil eletroforético em gel de agarose (1,3%) obtido através da amplificação da região espaçadora intergênica 16S-23S rRNA por PCR de 22 isolados associados à planta de arroz e três estirpes de referência *R. tropici* (BR322 e BR520) e *A. brasilense* (FP2).



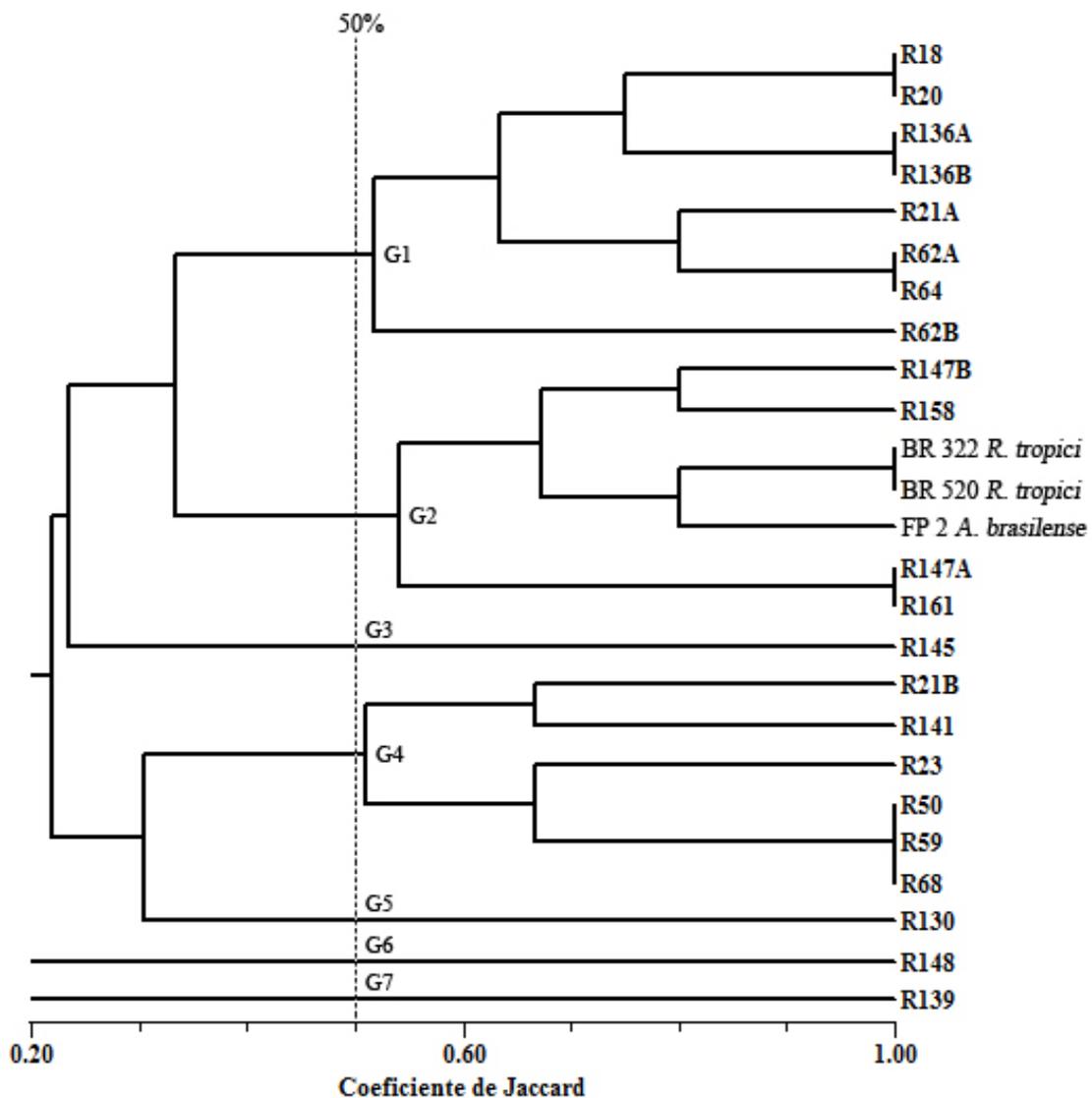
Diversos estudos têm demonstrado a variabilidade da região IGS e a eficácia na caracterização genotípica dos isolados bacterianos associados a gramíneas (QUEIROZ-RESPLANDES, 2016; OLIVEIRA, 2016). Queiroz-Resplandes (2016), observou que em isolados de bactérias endofíticas de milho houve a formação de 14 perfis diferentes com a presença de um a cinco bandas de tamanhos entre 361 a 1847pb. Já Reis-Junior e colaboradores (2006), relataram em estudo com isolados de *Brachiaria* spp. que os produtos obtidos para IGS são variáveis de acordo com a espécie estudada, sendo possível observar em *A. amazonense* três fragmentos característicos, com variações entre 1000 a 1300 pb.

Baudoin et al. (2010) e Jijón-Moreno e colaboradores (2015), observaram que estirpes de *A. brasilense* possuem múltiplas cópias de operons rRNA, constatando grande polimorfismo para região IGS entre os isolados dessa espécie. Os autores observaram não existir um perfil padrão para as estirpes de *A. brasilense* testada, entretanto, todas as cepas exibiram pelo menos três bandas principais. O mesmo perfil foi observado para a estirpe padrão de *A. brasilense* (FP2) utilizada no estudo como referência (Figura 11). Para espécies bacterianas do gênero *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* são descritos a presença de um a três cópias do operon (HAUKKA, 1997). Assim, pode-se inferir que a maioria dos isolados de arroz avaliados apresentam pelo menos dois operons de rRNA.

O dendrograma obtido pela PCR da IGS, apresentou diversidade com a formação de sete grupos com 50% de similaridade (Figura 12). A presença de mais de um fragmento de tamanhos diferentes indica variabilidade da região espaçadora

entre os isolados avaliados. Através da análise do dendrograma é possível supor que estes isolados de raízes de arroz apresentam diversidade genotípica, já que quatro dos sete grupos apresentaram características únicas entre os isolados como observado em G3 (R145), G5 (R130), G6 (R148) e G7 (R139) (Figura 12).

**Figura 12.** Dendrograma de similaridade gerado pelo software NTSYS-pc® 2.10 com base no perfil eletroforetico da região espaçadora intergênica (16S-23S rRNA) dos isolados bacterianos associados à planta de arroz e três estirpes de referência *R. tropici* (BR322 e BR520) e *A. brasilense* (FP2) definido pelo algoritmo UPGMA utilizando o coeficiente de Jaccard. Foi considerado 50% de similaridade como ponto de corte para o agrupamento dos isolados.



O maior agrupamento foi G1 formado por oito isolados (R18, R20, R136A, R136B, R21A, R62A, R64 e R62B) apresentou similaridade baixa (35%) com as estirpes de referência utilizadas no estudo (Figura 12). Entre os isolados houve a

formação de três subgrupos no G1 com similaridade de 100% entre si. O primeiro subgrupo foi formado por isolados (R18 e R20) que apresentaram três fragmentos no PCR, variando entre 700 a 900 pb. O segundo (R136A e R136B) pela presença de quatro fragmentos com variação entre 700 a 1300 pb. Para o último subgrupo (R62A e R64) foi observado que o tamanho dos fragmentos variaram entre 700 a 2000 com quatro fragmentos distintos (Figura 12).

O grupo G2, foi formado por isolados com pelo menos quatro regiões IGS. O grupo foi composto pelas estirpe de referência, sendo os padrões para *R. tropici* (BR322 e BR520) com 100% de homologia entre si. A estirpe padrão para *A. brasilense* apresentou similaridade próxima a 70% com as estirpes BR322 e BR520. Os isolados R147A e R161 formaram um subgrupo com 100% de semelhança entre si, sendo observado quatro fragmentos variando entre 700 a 1100 pb (Figura 12).

Para G4 foi observado a formação de dois subgrupos formados pelos isolados R21B, R141, R23, R50, R59 e R68, com similaridade próxima de 23% com as estirpes padrão em G2. Foi observada homologia próxima a 68% para os isolados formados no primeiro subgrupo em G2. O segundo foi formado por quatro isolados, sendo R50, R59 e R68 100% similar entre si (Figura 12).

Oliveira (2016), em estudo com rizóbios associados à planta de arroz observou a formação de oito grupos com similaridade de 50% para região IGS. Desses grupos, dois apresentaram características únicas e 43% dos isolados agruparam com 100% de homologia com três estirpes do gênero *Rhizobium* utilizadas como referência, sendo indicado que os isolados estudados pertençam ao grupo dos rizóbios. Resultado diferente do obtido no presente estudo, onde apenas 18% dos isolados apresentaram homologia entre 55% a 68% com as estirpes de referência para *R. tropici*. Para os demais isolados foi observada similaridade inferior a 30%, indicando que essas bactérias possam pertencer a diferentes grupos taxonômicos.

Pelo dendrograma foi possível identificar que apenas alguns isolados apresentaram uma relação estreita com a família *Rhizobiaceae*, sendo o mesmo observado para os demais testes avaliados neste estudo. A eficácia na estimativa da diversidade bacteriana associadas a gramíneas e leguminosas através de análises da região IGS, devido principalmente ao polimorfismos observado dessa região, pode ser utilizada para distinguir linhagens bacterianas e espécies relacionadas

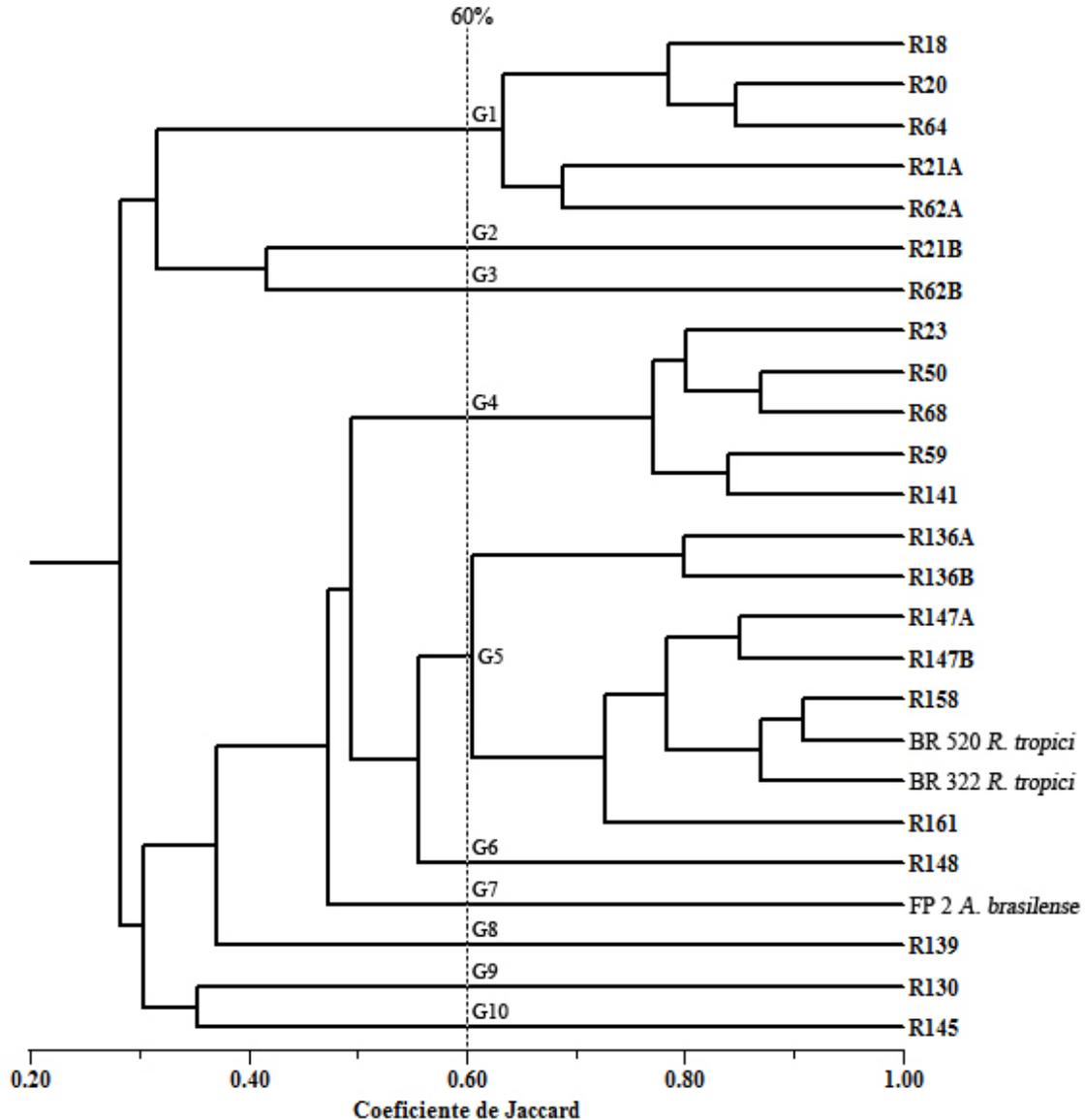
taxonomicamente (REIS-JUNIOR et al. 2006; OLIVEIRA et al. 2012; QUEIROZ-RESPLANDETES, 2016; OLIVEIRA, 2016; CARDOSO et al. 2017). Assim, esta estratégia de estudo para determinação da diversidade genética é um método simples e eficaz que permite distinguir espécies relacionadas filogeneticamente devido à elevada similaridade da região IGS.

Diversos estudos tem discutido sobre a importância da caracterização polifásica de populações bacterianas. Entretanto, mesmo com o avanço da biologia molecular, alguns autores tem demonstrado a relevância dos métodos tradicionais na caracterização morfofisiológica bacteriana e agrupamento dos diferente táxons por similaridade (STROSCHEIN, 2007).

Os resultados obtidos por meio da caracterização morfológica, bioquímica e genotípica foram convertidos em uma matriz binária para construção de um dendrograma, sendo definido a formação de 10 grupos em índice de similaridade próximo a 60% (Figura 13). Dentre estes grupos, G1 (R18, R20, R21A R62A e R64), G4 (R23, R50, R59, R68 e R141) e G5 (R136A, R136B, R147A, R147B, R148, R158 e R161) mostraram tendência de agrupamento similar frente a todos os ensaios de caracterização morfológica, fenotípica e genotípica realizados (Figura 13). Possivelmente, estes isolados pertencem ao mesmo grupo taxonômico ou grupos estreitamente relacionados, sendo os isolados do grupo G5 em similaridade próxima a 62% com as estirpes do gênero *Rhizobium*.

Não foi observado para os demais isolados um padrão de agrupamento, indicando a grande variabilidade metabólica e a presença de características únicas nas avaliações realizadas (Figura 13).

**Figura 13.** Dendrograma de similaridade gerado pelo software NTSYS-pc® 2.10 com base na análise polifásica dos isolados bacterianos associados à planta de arroz e três estirpes de referência *R. tropici* (BR322 e BR520) e *A. brasilense* (FP2) definido pelo algoritmo UPGMA utilizando o coeficiente de Jaccard. Foi considerado 60 % de similaridade como ponto de corte para o agrupamento dos isolados.



Os isolados associados à planta de arroz são formados por linhagens com grande potencial para serem utilizados em diversos processos industriais, principalmente relacionados a produção de enzimas. Novos estudos de bioprospecção enzimática com esses isolados, poderão possibilitar estratégias que visam a redução dos custos de produção de enzimas.

Estes isolados poderão ser utilizados na elaboração de métodos alternativos sustentáveis, como inoculantes para geração de tecnologia agrícola com baixo custo de produção. Além disso, diversos trabalhos tem proposto caracterizar e estimar a diversidade bacteriana associada a plantas de interesse agrícola, divulgando a importância desse tipo de caracterização para seleção de microrganismos associados a gramíneas com potencial aplicação biotecnológica, direcionamento taxonômico (GANGWAR e KAUR, 2008; GUJRAL et al. 2013; JI et al. 2013; MAREQUE et al. 2014; SZILAGYI-ZECCHIN et al. 2014; HERNÁNDEZ-FORTE e GARCIA, 2017) e caracterização de novas espécies (PENG et al. 2008; CHAUDHARY et al. 2012; ZHANG et al. 2014).

## 6. CONCLUSÃO

- Foi possível verificar a variabilidade morfológica entre os 22 isolados endofíticos de raiz de arroz, sendo a produção de muco e pigmentação a variável mais distinta;
- Os resultados de resistência aos antibióticos sugerem alta diversidade metabólica entre as bactérias isoladas de raiz de arroz, sendo os isolados R21B e R59 resistentes a todos os antibióticos testados;
- Os isolados apresentaram diversidade quanto a capacidade de uso das fontes de carbonos, com destaque para os isolados R148 e R161 que metabolizaram 86% das fontes testadas;
- Pela caracterização de enzimas extracelulares foi possível identificar os isolados R18, R20, R21A, R62A e R64 com potencial para produção de amilase, celulase e protease, sendo considerados os mais interessantes para estudos posteriores.
- A capacidade de solubilização de fosfato esteve presente em 59% dos isolados testados, sendo os mais promissores para esta característica os isolados R23, R50, R59, R68, R141 e R161;
- Foi observado que 86,3% das bactérias são potenciais RPCP, sendo os isolados R59, R68 e R141 considerados os mais promissores para testes *in vitro* e a campo como promotores de crescimento vegetal;
- A PCR utilizando o gene marcador da região IGS indicando uma diversidade genética elevada para esta região entre os isolados testados;
- Pela caracterização polifásica foi observado a diversidade metabólica dos isolados de plantas de arroz cultivado no Cerrado goiano, contribuindo para o entendimento da microbiota bacteriana associadas aos vegetais neste habitat e para indicar os isolados promissores para aplicação biotecnológica.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABD-ELHALEM, B. T.; EL-SAWY, M.; GAMAL, R. F.; ABOU-TALEB, K. A. Production of amylases from *Bacillus amyloliquefaciens* under submerged fermentation using some agro-industrial by-products. **Annals of Agricultural Science**, v.60, n.2, p.193-202, 2015.
- AHEMAD, M., KHAN, M.S. Assessment of plant growth promoting activities of rhizobacterium *Pseudomonas putida* under insecticide-stress. **Journal of Microbiology**, v.1, p.54-64, 2011b.
- AHEMAD, M., KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal of King Saud University – Science**, v.26, p. 1-20, 2014.
- AHEMAD, M., KHAN, M.S. Effects of insecticides on plant growth-promoting activities of phosphate solubilizing rhizobacterium *Klebsiella* sp. strain PS19. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.100, p.51-56, 2011a.
- AHEMAD, M., KHAN, M.S. Influence of selective herbicides on plant growth promoting traits of phosphate solubilizing *Enterobacter asburiae* strain PS2. **Research Journal of Microbiology**, v.5, p.849-857, 2010.
- AHEMAD, M., KHAN, M.S. Influence of selective herbicides on plant growth promoting traits of phosphate solubilizing *Enterobacter asburiae* strain PS2. **Research Journal of Microbiology**, v.5, p.849-857, 2010.
- ALVES, J. B. **Seleção de rizóbios para trevo branco**. 2005. 68 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- ARANDA-SELVERIO, G.; PENNA, A. L. B.; CAMPOS-SÁS, L. F.; SANTOS-JUNIOR, O.; VASCONCELOS, A. F. D.; SILVA, M. L. C.; LEMOS, E. G. M.; CAMPANHARO, J. C.; SILVEIRA, J. L. M. 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.
- ARAÚJO, C. L.; GUALTER, R. M. R. Caracterização morfofisiológica de bactérias nativas de solos do Cerrado isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Biotemas**, v.30 p.25-35, 2017.

ARAÚJO, J. F. **Diversidade bacteriana do solo em diferentes fitofisionomias do Bioma Cerrado e perspectivas biotecnológicas**. 2011. 153 f. Tese (Doutorado em Ciências Genômicas e Biotecnologia), Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2011.

ARDOUREL, M.; DEMONT, N.; DEBELLÉ, F.; MAILLET, F.; DE BILLY, F.; PROMÉ, J. C.; DÉNARIÉ, J.; TRUCHET, G. *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide nodulation factors: different structural requirements for bacterial entry into target root hair cells and induction of plant symbiotic developmental responses. **Plant Cell**, v.6, n.10, p.1357-1374, 1994.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Short Protocols in Molecular Biology**. 4th Ed. New York: John Wiley and Sons, p. 1512, 1999.

AZAMBUJA, I. H. V.; VERNETTI JUNIOR, F. J.; MAGALHÃES JUNIOR, A. M. Aspectos socioeconômicos da produção do arroz. In: GOMES, A. S.; MAGALHÃES JÚNIOR, A. M. (Eds.). Arroz irrigado no Sul do Brasil. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**, p. 23-44, 2004.

BADEL, S.; BERNARDI, T.; MICHAUD, P. New perspectives for *Lactobacillus* exopolysaccharides. **Biotechnology Advances**, v.29, p. 54-66, 2011.

BADRI, D. V.; CHAPARRO, J. M.; ZHANG, R.; SHEN, Q.; VIVANCO, J. M. Application of natural blends of phytochemicals derived from the root exudates of arabidopsis to the soil reveal that phenolic-related compounds predominantly modulate the soil microbiome. **The Journal of biological chemistry**, v.288, p.4502-4512, 2013.

BANO N.; MUSARRAT J. Characterization of a novel carbofuran degrading *Pseudomonas* sp. with collateral biocontrol and plant growth promoting potential. **FEMS Microbiology Letters**, v.231, v.13-17, 2004.

BARBOSA, E. A.; PERIN, L.; REIS, V. M. Uso de diferentes fontes de carbono por estirpes de *Gluconacetobacter diazotrophicus* isoladas de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 5, p. 827-833, 2006.

BARBOSA-FILHO, M. P. Nutrição e adubação do arroz (sequeiro e irrigado). Piracicaba: **Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato**, 1987.

BAREA, J. M.; POZO, M. J.; AZCÓN, R.; AGUILAR, C. A. Microbial cooperation in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 56, p. 1761-1778, jul. 2005.

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**, Pelotas, v.17, n.2-4, p.221-227, 2011.

BAUDOIN, E.; COUILLEROT, O.; SPAEPEN, S.; MOËNNE-LOCCOZ, Y.; NAZARET, S. Applicability of the 16S-23S rDNA internal spacer for PCR detection of the phytostimulatory PGPR inoculant *Azospirillum lipoferum* CRT1 in field soil. **Journal of applied microbiology**, v.108, n.1, p 25-38, 2010.

BEG, Q. K.; GUPTA, R. Purification and characterization of a oxidation stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.32, p.294–304, 2003.

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

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology advances**, v.18, n.5, p.355-383. 2000.

BHATTACHARJEE, R. B.; SINGH, A.; MUKHOPADHYAY, S. N. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. **Applied Microbiological Biotechnology**, v.80, p.199-209, 2008.

BISWAS, J. C.; LADHA, J. K.; DAZZOB, F. B.; YANNIC, Y. G.; ROLFED, B. G. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. **Agronomy Journal**, Madison, v.92, n.5, p.880-886, 2000.

BOAKYE, E. Y.; LAWSON, I. Y. D.; DANSO, S. K. A.; OFFEI, S. K. Characterization and diversity of rhizobia nodulating selected tree legumes in Ghana. **Symbiosis**, v. 69, p. 89-99, 2016

BONATELLI, M.L. **Bactérias endofíticas e epifíticas cultivadas e não cultivadas do guaranazeiro e o controle da antracnose**. 2012. 84 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2012.

BRAGA, L. F. **Caracterização morfofisiológica e genética de bactérias endofíticas isoladas de arroz (*Oryza sativa*)**. 2012. 94f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica), Universidade Estadual de Goiás, Anápolis. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia. Classificação de risco dos agentes biológicos. Brasília: **Editora do Ministério da Saúde**, p.36, 2006.

BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, n.2, p.365-372, 2000.

CAPPUCCINO, J. G.; SHERMAN, N. **Microbiology: a laboratory manual**. 10 th ed., Boston, MA: Pearson/Benjamin Cummings, p.567, 2014.

CARDOSO, A. A.; ANDRAUS, M. P.; BORBA, T. C. O.; MARTIN-DIDONET, C. C. G.; FERREIRA, E. P. B. Characterization of rhizobia isolates obtained from nodules of wild genotypes of common bean. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.48, p.43-50, 2017.

CARDOSO, E. J. B. N.; NOGUEIRA, M. A. A rizosfera e seus efeitos na comunidade microbiana e na nutrição de plantas. In: Silveira, A. P. D.; Freitas, S. S. (org.). **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agrônomo, p.78-96, 2007.

CARRIM, A. J. I.; BARBOSA, E. C.; VIEIRA, J. D. G. Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.49, n.3, p.353-359, 2006.

CASSÁN, F.; MAIALE, S.; MASCIARELLI, O.; VIDAL, A.; LUNA, V.; RUIZ, O. Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and IGS possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. **European Journal of Soil Biology**, v.45, p.12-19, 2009.

CASTELLANE, T. C. L. **Análise de polissacarídeos essenciais para a nodulação do feijoeiro por *Rhizobium tropici* cultivados em diferentes fontes de carbono**.

2007. 74f. Dissertação. (Mestrado em Agronomia–Produção Vegetal), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

CASTELLANE, T. C. L.; LEMOS, E. G. M. Composição de exopolissacarídeos produzidos por estirpes de rizóbios cultivados em diferentes fontes de carbono. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, p.1503-1506, 2007.

CAVAGLIERI, L.; PASSONE, A.; ETCHEVERRY, M. Screening procedures for selecting rhizobacteria with biocontrol effects upon *Fusarium verticillioides* growth and fumonisin B1 production. **Research in Microbiology**, v.155, p.747-754, 2004.

CENCIANI, K.; FREITAS, S. S.; CRITTER, S. A. M.; AIROLDI, C. Microbial enzymatic activity and thermal effect in a tropical soil treated with organic materials. **Science Agricola**, v.65, n.6, p.674-680, 2008.

CESKA, M. Enzyme catalysis of solidified media. **European Journal of Biochemistry**, v.22, n.2, p.186-192, 1971.

CHABOT, R.; ANTOUN, H.; KLOEPPER, J. W.; BEAUCHAMP, C. J. Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.8, p.2767-2772, 1996.

CHAUDHARY, H. J.; PENG, G.; HU, M.; HE, Y.; YANG, L.; LUO, Y.; TAN, Z. Genetic diversity of endophytic diazotrophs of the wild rice, *Oryza alta* and identification of the new diazotroph, *Acinetobacter oryzae* sp. nov. **Microbial Ecology**, v.63, p.813-821, 2012.

CHEN, X.H.; KOUMOUTSI, A.; SCHOLZ, R.; EISENREICH, A.; SCHNEIDER, K.; HEINEMEYER, I.; MORGENSTERN, B.; VOSS, B.; HESS, W.R.; REVA, O.; JUNGE, H.; VOIGT, B.; JUNGBLUT, P.R.; VATER, J.; SÜSSMUTH, R.; LIESEGANG, H.; STRITTMATTER, A.; GOTTSCHALK, G. E BORRIS, R. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 1007-1014, 2007.

COELHO, M.A.Z. **Tecnologia Enzimática**. FAPERJ; Petrópolis, RJ: EPUB, p. 288, 2008.

COENYE, T.; VANDAMME P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. **Environmental Microbiology**, v.5, p.719–729, 2003.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO-CONAB. **A cultura do arroz**. Brasília: Conab, 2015.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO-CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos, oitavo levantamento, maio 2017**. Brasília: Conab, v.4, p. 144, 2017.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO-CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos, décimo segundo levantamento, setembro 2016**. Brasília: Conab, 2016.

COSTA, F. M. **Caracterização morfofisiológica e genética de bactérias isoladas de nódulos de guandu (*cajanus cajan* (L.) Mill sp.) cultivado na borda Oeste do Pantanal Sul - Mato - Grossense**. 2011. 87 f. Dissertação (mestrado em agronomia), Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Aquidauna, 2011.

COSTA, F. M.; SCHIAVO, J. A.; BRASIL, M. S.; LEITE, J.; XAVIER, G. R.; FERNANDES-JÚNIOR, P. I. Phenotypic and molecular fingerprinting of fast growing rhizobia of field-grown pigeon pea from the eastern edge of the Brazilian Pantanal. **Genetics and Molecular Research**, v.13, p.469-482, 2014.

COSTERTON, J. W. Introduction to biofilm. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.11, p.217-221, 1999.

DIAZ, P.S.; VENDRUSCOLO, C.T.; VENDRUSCOLO, J.L.S. Reologia de xantana: Uma revisão sobre a influência de eletrólitos na viscosidade de soluções aquosas de gomas xantana. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v.25, p.15-28. 2004.

DINESH, R.; ANANDARAJ, M.; KUMAR, A.; BINI, Y. K.; SUBILA, K. P.; ARAVIND, R. Isolation, characterization, and evaluation of multi-trait plant growth promoting rhizobacteria for their growth promoting and disease suppressing effects on ginger. **Microbiological research**, v.173, p.34-43, 2015.

DINGLE, J.; REID, W. W.; SOLOMONS, G. L. The enzymatic degradation of pectin and other polysaccharides. Application of the “cup-plate” assay to the estimation of enzymes. **Journal for the science of food and agriculture**, n.4, p.149-155, 1953.

DINGMAN, D. W. *Paenibacillus larvae* 16S–23S rDNA intergenic transcribed spacer (IGS) regions: DNA fingerprinting and characterization. **Journal of invertebrate pathology**, v. 110, n. 3, p.352-358, 2012.

DÖBEREINER, J. **Fixação de nitrogênio em associação com gramíneas**. In: CARDOSO, E.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P., (Ed.). *Microbiologia do Solo*. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.173-179, 1992.

DONOT, F.; FONTANA, A.; BACCOU, J. C.; SCHORR-GALINDO, S. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion genetics and extraction. **Carbohydrate Polymers**, v.87, p.951–962, 2012.

DUTA, F.P.; FRANCA, F.P. de; LOPES, L.M.D. Optimization of culture conditions for exopolysaccharides production in *Rhizobium* sp. using the response surface method. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.9, p.391-399, 2006.

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. Levana Bacteriana: aspectos tecnológicos, características e produção. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 1, p. 71-82, jan./mar. 2005.

ESPOSITO-POLESI, N. P. Microrganismos endofíticos e a cultura de tecidos vegetais: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.9, n.4, p.533-541,2011.

FAGERIA, N. K.; BARBOSA-FILHO, M. P. Identificação e correção de deficiências nutricionais na cultura do arroz. Santo Antônio de Goiás: **Embrapa Arroz e Feijão**, 2006.

FDA – Food and Drug Administration. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/>>. Acesso em: 02 fev. 2017.

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M.; HUNGRIA, M. Selection of indigenous rhizobia to the cowpea, pigeonpea and jackbean crops in the coastal tableland of Sergipe, Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.7, p.835-842, 2003.

FERNANDES, M. L. M.; SAAD, E. B.; MEIRA, J. A.; RAMOS, L. P.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v.44, p.8-13, 2007.

FERNANDES-JUNIOR, P. I.; LIMA, A. A.; PASSOS, S. R.; GAVA, C. A. T.; OLIVEIRA, P. J.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R. Phenotypic diversity and amylolytic activity of fast growing rhizobia from pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2012.

FERNANDES-JÚNIOR, P. I.; OLIVEIRA, P. J.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate and exopolysaccharide biosynthesis by bacterial isolates from pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] root nodules. **Applied biochemistry and biotechnology**, v.163, n.4, p.473-484, 2011.

FERREIRA, E. P. B.; KNUPP, A. M.; MARTIN-DIDONET, C. C. G. Crescimento de cultivares de arroz (*oryza sativa* L.) influenciado pela inoculação com bactérias promotoras de crescimento de plantas. **Bioscience Journal**, v.30, n.3, p.655-665, May/June, 2014.

FIGUEIREDO, M. V. B.; EGÍDIO, B. N.; BURITY, H. A. Water stress response on the enzymatic activity in cowpea nodules. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p.195-200, 2001.

FONTANIELLA, B.; RODRÍGUES, C.W.; PIÑÓN, D.; VICENTE, C.; LEGAZ, M. E. Identification of xanthans isolated from sugar canejuices obtained from scalded plants infected by *Xanthomonas albilineans*. **Journal of Chromatography B**, v.770, p.275-81, 2002.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO. **International year of rice**. 2004. Disponível em: < <http://www.fao.org/rice2004/en/rice-us.htm>>. Acesso em: 20 nov. 2016.

FREITAS, A. D. S.; SAMPAIO, E. V. B.; SANTOS, C. E. R. S.; SOUZA, R. J. C. Fixação biológica de nitrogênio no Semiárido Brasileiro (Biological nitrogen fixation in the Brazilian Semiarid). **Revista Brasileira de Geografia Física**, v.8, p.585-597, 2015.

GANGWAR, M.; KAUR, G. Isolation and characterization of endophytic bacteria from endorhizosphere of sugarcane and ryegrass. **The Internet Journal of Microbiology**, v.7, p.139-144, 2008.

GAO, Z.; RUAN, L.; CHEN, X.; ZHANG, Y.; XU, X. A novel salt-tolerant endo- $\beta$ -1, 4-glucanase Cel5A in *Vibrio* sp. G21 isolated from mangrove soil. **Applied microbiology and biotechnology**, v.87, n.4, p.1373-1382, 2010.

GARRITY, G. M. e HOLT, J. G. The Road map to the *Manual*. In: BOONE, D.R. e CATENHOLZ, R.W., eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. New York, **Springer-Verlag**, v.1. p.119-166, 2001.

GHARZOULI, R.; BENAHMED, A.; BENHIZIA, Y.; BENGUEDOUAR, A. Influence of carbon source on the production of exopolysaccharides by *Rhizobium sultae* and on the nodulation of *Hedysarum coronarium* L. legume. **African Journal of Microbiology Research**, v.6, p.5940-5946, 2012.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v.2012, 2012.

GOURION, B; ROSSIGONOL, M.; VORHOLT, A. J. A proteomic study of *Methylobacterium extorquens* reveals a response regulator essential for epiphytic growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.103, p.13186–13191, 2006.

GRAHAM, P. H.; SADOWSKY, M. J.; KEYSER, H. H.; BARNET, Y. M.; BRADLEY, R. S.; COOPER, J. E. ; DE LEY, D. J.; JARVIS, B. D. W.; ROSLYCKY, E. B.; STRIJDOM, B. W.; YOUNG, J. P. W. Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root - and stem - nodulating bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.41, n.4, p.582-587, 1991.

GRANDI, A. Z. **Produção de exopolissacarídeos por *Lactobacillus helveticus* autóctone isolado de soro-fermento natural**. 2010. 74f. Dissertação (mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, 2010.

GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A. M. Developments in fungal taxonomy. **Clinical microbiology reviews**, Washington, v.12, p.454-500, 1999.

GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em arroz de sequeiro. **Agronomia**, v.37, n.2, p.25-30, 2003.

GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, V. L. D. Produção de arroz inoculado com bactérias diazotróficas marcadas com resistência induzida ao antibiótico estreptomicina. **Revista Ciência Rural**, v.56, n.1, p.125-132, 2013.

- GUJRAL, M. S.; AGRAWAL, P. KHETMALAS, M. B.; PANDEY, R. Colonization and plant growth promotion of *Sorghum* seedlings by endorhizospheric *Serratia* sp. **Acta Biologica Indica**, v.2, p.121-124, 2013.
- HAHN, L.; SÁ. E. L. S.; MACHADO, R. G.; SILVA, W. R.; OLDRA, S.; DAMASCENO, R. G.; SCHÖNHOFEN, A. Growth promotion in maize with diazotrophic bacteria in succession with ryegrass and white clover. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, v.14, p.11-16, 2014.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.895-914, 1997.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia**, v.67, n.3, p.597-607, 1975.
- HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.7, p.667-672, 2005.
- 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.
- HERNÁNDEZ-FORTE I.; NÁPOLES-GARCÍA, M. C. Rizobios residentes en la rizosfera de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) cultivar INCA LP-5. **Cultivos Tropicales**, v.38, p.39-49, 2017.
- HERNÁNDEZ-FORTE, I.; NÁPOLES-GARCÍA, M. C.; MORALES-MENA, B. Caracterización de aislados de rizobios provenientes de nódulos de soya (*Glycine max* (L.) Merrill) con potencialidades en la promoción del crecimiento vegetal. **Cultivos Tropicales**, v.36, n.1, p. 65-72, 2015.
- HERNÁNDEZ-FORTE, I.; NÁPOLES-GARCIA, M. C.; PEREZ-HERNANDEZ, G.; ROSALES-JENQUI, P. R.; BANOS-GORDILLO, R.; RAMIREZ-PEDROSO, J. F. Caracterización fenotípica de aislados de rizobios procedentes de la leguminosa forrajera *Canavalia ensiformis*. **Cultivos Tropicales**, v.33, p.21-28, 2012.

HU, C. Y.; LIN, L. P. Characterization and purification of hydrolytic enzymes in *Sinorhizobium fredii* CCRC 15769. W. J. **Microbial Biotechnology**, v.19, n.5, p.515-522, 2003.

HUNGRIA, M. Metabolismo do carbono e do nitrogênio nos nódulos. In: HUNGRIA, M. & ARAÚJO, R., eds. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Embrapa, Brasília, p.890, 1994.

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

IGUAL, J. M.; VALVERDE, A.; CERVANTES, E.; VELÁZQUEZ, E. Phosphate-solubilizing bacteria as inoculantes for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. **Agronomie**, v.21, n.2, p.561-568, 2001.

IKEDA, A. C. **Caracterização morfofisiológica e genética de bactérias endofíticas isoladas de raízes de diferentes genótipos de milho (*Zea mays* L.)**. 2010. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

IKEDA, A. C.; BASSANI, L. L.; ADAMOSKI, D.; STRINGARI, S.; CORDEIRO, V. K.; GLIENKE, C.; STEFFENS, M. B. R.; HUNGRIA, M.; GALLI-TERASAWA, L. V. Morphological and genetic characterization of endophytic bacteria isolated from roots of different maize genotypes. **Microbial Ecology**, v. 65: p.154-160, 2013.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current opinion in Biotechnology**, n.4, v.13, p.390-397, 2002.

JAEGER, K. E.; SCHNEIDINGER, B.; ROSENAU, F.; WERNER, M.; LANG, D.; DIJKSTRA, B. W.; SCHIMOSSEK K.; ZONTA, A.; REETZ, M. T. Bacterial lipases for biotechnological applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.3, p.3-12, 1997.

JESUS, E. D. C.; MOREIRA, F. M. S.; FLORENTINO, L. A.; RODRIGUES, M. I. D.; OLIVEIRA, M. S. Leguminosae nodulating bacteria diversity from three different land use systems in Brazilian Western Amazon. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.8, p.769-776, 2005.

JESUS, J. G. R. **Seleção e identificação de cepas bacterianas produtoras de amilases isoladas da microbiota associada a resíduos agrícolas de cacau e dendê**. 2013. 86 f. Dissertação (mestrado em biotecnologia). Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

JI, S. H.; GURURANI, M. A.; CHUN, S. C. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. **Microbiological Research**, v.169, p.83-98, 2014.

JIANG, C.; SHENG, X.; QIAN, M.; WANG, Q. Isolation and characterization of a heavy metal-resistant *Burkholderia* sp. from heavy metal-contaminated paddy field soil and IGS potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal polluted soil. **Chemosphere**, v.72, p.157-164, 2008.

JIJÓN-MORENO, S.; MARCOS-JIMÉNEZ, C.; PEDRAZA, R. O.; RAMÍREZ-MATA, A.; DE SALAMONE, I. G.; FERNÁNDEZ-SCAVINO, A.; VÁSQUEZ-HERNÁNDEZ, C. A.; SOTO-URZÚA, L.; BACA, B. E.; The ipdC, hisC1 and hisC2 genes involved in indole-3-acetic production used as alternative phylogenetic markers in *Azospirillum brasilense*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.107, n.6, p.1501-1517, 2015.

JÍMENEZ-ZURDO, J. I.; MATEOS, P. F.; DAZZO, F. B.; MARTÍNEZ-MOLINA, E. Cellbound cellulase and polygalacturonase production by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species. **Soil Biology and Biochemistry**, v.28, p.917-921, 1996.

JORDAN, D. C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.32, p.136-139, 1982.

JULIANO, B. O. **Rice in human nutrition**. Rome. FAO, 1993.

KAMBOUROVA, M.; KIRILOVA, N.; MANDEVA, R.; DEREKOVA, A. Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC 7. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.22, p.307-313, 2003.

KHAN, M. U.; SESSIGSCH, A.; HARRIS, M.; FATIMA, K.; IMRAN, A.; ARSLAN, M.; SHABIR, G.; KHAN, Q. M.; AFZAL, M. Cr-resistant rhizo- and endophytic bacteria associated with *Prosopis juliflora* and their potential as phytoremediation enhancing agents in metal-degraded soils. **Frontiers in plant science**, v.5, 2014.

KHATTABI, M.; GELDER, P.; BITTER, W.; TOMAMASSEN, J. Role of the calcium ion and the disulfide bond in the *Burkholderia glumae* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.22, p.329-338, 2003.

KIM, B. K.; LEE, B. H.; LEE, Y. J.; JIN, I. H.; CHUNG, C. H.; LEE, J. W. Purification and characterization of carboxymethylcellulase isolated from a marine bacterium, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* A-53. **Enzyme and Microbial Technology**, v.44, n.6, p.411-416, 2009.

KIRK, O.; BORCHERT, T.V.; FUGLSANG, C.C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, n.4, p.345-351, 2002.

KUJUR, M.; GARTIA, S.K.; PATEL, A.K. Quantifying the contribution of different soil properties on enzyme activities in dry tropical ecosystems. **ARPN Journal of Agricultural and Biological Science**, v.7, p.763-772, 2012.

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

LADHA, J. K.; PATHAK, H.; KRUPNIK, T. J.; SIX, J.; VAN KESSEL, C. Efficiency of fertilizer nitrogen in cereal production: Retrospects and prospects. **Advances in Agronomy**, v.87, p.85-156, 2005.

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

LEALEM, F., GASHE, B. A. Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eraglostis tef*). **Journal of Applied Bacteriology**, v.77, n.3, p.348-352, 1994.

LEE, Y. J.; KIM, B. K.; LEE, B. H.; JO, K. I.; LEE, N. K.; CHUNG, C. H.; LEE, J. W. Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyoliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. **Bioresource Technology**, v.99, n.2, p.378-386, 2008.

LEONEL, T. F.; MORETTO, C.; MENECHINI, A. K.; LEMOS, E. V. G. M. Sacarose como fonte de carbono produção de exopolissacarídeos por *mesorhizobium* spp. **Ciência & Tecnologia**, v.6, n.1, 2014.

LEVIER, K.; GUERINOT, M. L. The *Bradyrhizobium japonicum* fegA gene encodes as iron regulated outer membrane protein with similarity to hydroxamate-type siderophore receptors. **Journal of Bacteriology**, n.23, p. 7265-7275, 1996.

LIMA, D. S. **Caracterização morfofisiológica e genética de bactérias endofíticas isoladas de milho (*Zea mays* L.)**. 2013. 127 F. Dissertação (mestrado em química orgânica), Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2013.

LIN, L. L.; HSU, W. H.; CHU, W. S. A gene encoding for an  $\alpha$ -amylase from thermophilic *Bacillus* sp. Strain TS-23 and IGS expression in *Escherichia coli*. **Journal of Applied Microbiology**, v.82, n.3, p.325-334, 1997.

LIU, F. P.; LIU, H. Q.; ZHOU, H. L.; DONG, Z. G.; BAI, X. H.; BAI, P.; QIAO, J. J. Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from betel nut (*Areca catechu*) and their effects on plant growth and phosphorus mobilization in tropical soils. **Biology and Fertility of Soils**, v.50, p.927-937, 2014.

LIU, S. B.; CHEN, X. L.; HE, H. L.; ZHANG, X. Y.; XIE, B. B.; YU, Y.; CHEN, B.; ZHOU, B. C.; ZHANG, Y. Z. Structure and ecological roles of a novel exopolysaccharide from the arctic sea ice bacterium *pseudolalteromonas* sp. Strain SM20310. **Applied and Environmental Microbiology**.v.1. p.224. 2013

LUVIELMO, M. M.; SCAMPARINI, A. R. P. Goma xantana: produção, recuperação, propriedades e aplicação. **Estudos tecnológicos**, n.1, v.5, p.50-67, 2009.

MA, J. F. Plant root responses to three abundant soil minerals: silicon, aluminum and iron. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.24, n.4, p.267-281, 2005.

MACIEL, G. M. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja**. 2006.133p. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MACIEL, J. C. ANDRAD, P. L.; NERI, D. F. M.; CARVALHO, L. B.; CARDOSO, C. A.; CALAZANS, G. M. T.; ALBINO-AGUIAR, J. SILVA, M. P. C. Preparation and characterization of magnetic levan particles as matrix for trypsinim mobilization. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v.324, p.1312-1316, 2012.

MADHAIYAN, M.; POOGUZHALI, S.; SENTHILKUMAR, M.; SESHADRI, S. CHUNG, H.; YANG, J.; SUNDARAM, S.; SA, T. Growth promotion and induction of systemic

resistance in rice cultivar Co-47 (*Oryza sativa* L.) by *Methylobacterium* spp. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v.45, p.315-324, 2004.

MAGNÚSSON, S. H.; GUNNLAUGSDÓTTIR, H.; LOVEREN, H.V.; HOLM, F.; KALOGERAS, N.; LEINO, O.; LUTEIJN, J. M.; ODEKERKEN, G.; POHJOLA, M. V.; TIJHUIS, M. J.; TUOMISTO, J. T.; UELAND, Ø.; WHITE, B. C.; VERHAGEN, H. State of the art in benefit-risk analysis: Food microbiology. **Food and Chemical Toxicology**, v.50, p.33-39, 2012.

MAREQUE, C.; TAULÉ, C.; BERACOCHEA, M.; BATTISTONI, F. Isolation, characterization and plant growth-promotion effects of putative bacterial endophytes associated with sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench). **Annals Microbiology**, v.65, p.1057-1067, 2015.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P.; DONATO, V. M. T. S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 1, p.89-111, 2004.

MARON, P. A.; MOUGEL, C.; RANJARD, L. Soil microbial diversity: Methodological strategy, spatial overview and functional interest. **Comptes Rendus Biologies**, v.334, p.403-411, 2011.

MARQUES, A. C. R. **Fixação biológica de nitrogênio e micorrização em gráneas do campos sulinos**. 73f. 2014. Dissertação (mestrado em agrobiologia), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

MARTENS, M., DAWYNDT, P., COOPMAN, R., GILLIS, M., DE VOS, P., WILLEMS, A. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 house keeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.58, p.200–214, 2008.

MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de "Rizóbio". Comunicado Técnico. **Embrapa**, n.19, p.1-14, 1997.

MASSOL-DEYA, A.A.; ODELSON, D. A.; HICKEY, R. F.; TIEDJE, J. M. **Bacterial community fingerprint of amplified 16S and 16S-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA)**. In: Akkermans ADL,

Elsas JDV, Bruijn FJ (Ed.). Molecular microbial ecology manual. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995.

MAWADZA, C.; HATTI-KAUL, R.; ZVAUYA, R.; MATTIASSON, B. Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus strains*. **Journal of biotechnology**, v.83, n.3, p.177-187, 2000.

MBAI, F. N.; MAGIRI, E. N.; MATIRU, V. N.; NG'ANG', A. J.; NYAMBATI, V. C. S. Isolation and Characterisation of Bacterial Root Endophytes with Potential to Enhance Plant Growth from Kenyan Basmati Rice American. **American International Journal of Contemporary Research**, v.3, p.25-40, 2013.

MEDEIROS, E. V.; MARTINS, C. M.; LIMA, J. A. M.; FERNANDES, Y. T. D.; OLIVEIRA, V. R.; BORGES, W. L. Diversidade morfológica de rizóbios isolados de caupi cultivado em solos do Estado do Rio Grande do Norte solos do Estado do Rio Grande do Norte. **Maringá**, v.32, n.1, p.161-169, 2009.

MELO, I. S. **Isolamento de agentes de biocontrole da rizosfera**. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Controle biológico. Jaguariúna: EMBRAPA, 2000.

MENDES, R.; AZEVEDO, J. L. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In: COATA\_MAIA, L.; MALOSSO, E.; YANO-MELO, A. M. Micologia: avanço no conhecimento. Recife: **Sociedade Brasileira de Micologia**, v.1, p.129-150, 2007.

MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; MELO BARBOSA, A. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, n.2, v.32, p.213-234, 2011.

MINOTTO, E., MILAGRE, L.P., OLIVEIRA, M.T., VAN DER SAND, S.T.. Enzyme characterization of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants. **Journal of Advanced Scientific Research**, v.5, p.16-23, 2014.

MISHRA, A.; JHA, B. Microbial exopolysaccharides. In: ROSENBERG, E.; DELONG, E. F.; LORY, S.; STACKEBRANDT, E.; THOMPSON, F. (Eds) **The prokaryotes: applied bacteriology and biotechnology**. 4rd ed. New York: Springer Berlin Heidelberg. 2013. Cap. 5, p. 179-189.

MORENO, J.; VARGAS, M. A.; MADIEDO, J. M.; MUÑOZ, J.; RIVAS, J. GUERRERO, M. G. Chemical and Rheological Properties of an Extracellular Polysaccharide Produced by the Cyanobacterium *Anabaena* sp. ATCC 33047. **Biotechnology & Bioengineering**, New York, v.67, p.283-290, 2000.

MOSBAH, H.; SAYARI, A.; HORCHANI, H.; GARGOURI, Y. Involvement of Gly 311 residue on substrate discrimination, pH and temperatura dependency of recombinat *Staphylococcus xylosus* lipase: A study with emulsified substrate. **Protein Expression and Purification**, v.55, p.31-39, 2007.

MOUSAVI, S. D.; WILLEMS, A.; NESME, X.; LAJUDIE, P.; LINDSTROM, K. Revised phylogeny of Rhizobiaceae: Proposal of the delineation of Pararhizobiumgen. nov., and 13 new species combinations. **Systematic and Applied Microbiology**, 2015.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v.170, p.265-270, 1999.

NAVROSKI, D.; SILVA, T. L.; SCHERER, A. J.; APPEL, R. J. C.; FAVETTA, A.; BARREIROS, M. A. B.; GRANGE, L. Diversidade morfológica de rizobactérias obtidas de solos sob distintos manejos de cultivo da região oeste do Paraná. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v.4, p.117-128, 2015.

NEIVERTH, W. **Diversidade morfológica e genética de rizobactérias endofíticas obtidas de solos de diferentes classes e manejos de cultivo**. 2012. 107f. Dissertação (mestrado em agronomia), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Paraná, 2012.

NERY, T. B. R.; BRANDÃO, L. V.; ESPERIDIÃO, M. C. A.; DRUZIAN, J. I. Biossíntese de goma xantana a partir da fermentação de soro de leite: rendimento e viscosidade. **Química Nova**, São Paulo, v.31, n.8, 2008.

NUNES, G. F. de O.; MENEZES, K. A. S.; SAMPAIO, A. A.; SANTOS, A. B. dos; FERNANDES JUNIOR, P. I.; MARTINS, L. M. V. **Atividade enzimática de isolados de rizóbio obtidos de nódulos de leguminosas forrageiras**. XXXIV Congresso Brasileiro de Ciências do solo, 2013.

OLIVARES, F. L. **Taxonomia, ecologia e mecanismos envolvidos na infecção e colonização de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp. híbrido) por bactérias endofíticas do gênero *Herbaspirillum***. 1997. 344p. Tese (Doutorado), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, 1997.

OLIVEIRA, A. M. R.; BANGEL, E. V.; HUNGRIA, M.; SILVEIRA, J. R. P.; VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B. Characterization of the spacer region 16-23S rDNA for differentiation of strains of rhizobia used in the production of commercial inoculants in Brazil. **Ciência Rural**, v.42, p.1423-1429, 2012.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S. Partial Characterization of Amylases of two Indigenous Central Amazonian Rhizobia Strains. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.53, n.1 p.35-45, 2010.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS JÚNIOR, A. F. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.4. p.853-860, 2006.

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

OLIVEIRA, C. A.; MARRIEL, I. E.; GOMES, E. A.; LANA, U. G. P.; SCOTTI, M. R.; ALVES, V. M. C. Diversidade bacteriana da rizosfera de genótipos de milho contrastantes na eficiência de uso de fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p.1473-1482, 2009.

OLIVEIRA, F. A. **Morfo-fisiologia de bactérias isoladas de solo da reserva ecológica da Universidade Estadual de Goiás – Anápolis**. 2015. 114 F. Dissertação (mestrado em química orgânica), Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2015.

OLIVEIRA, G. R. F.; SILVA, M. S.; MARCIANO, T. Y. F.; PROENÇA, S. L.; SÁ, M. E. Crescimento inicial do feijoeiro em função do vigor de sementes e inoculação com *Bacillus subtilis*. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, v.10, n.4, p.439-448, 2016.

OLIVEIRA, M. S. **Caracterização bioquímica de bactérias isoladas das raízes de arroz de sequeiro quanto a produção de biocompostos e promoção do crescimento vegetal**. 2015. 102 f. Dissertação (mestrado em ciências moleculares), Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2016.

OLSON, R.; FORSBERG, H.; WISE, B.; RACK, J. Measurement of word recognition, orthographic, and phonological skills. In: G.R. Lyon (Ed.) **Frames of reference for**

**the assessment of learning disabilities: New views on measurement issues.** Baltimore: Paul H. Brookes Publishing Co. p.243-277. 1994.

OSKOUIE, S. F. G.; TABANDEH, F.; YAKHCHALI, B.; EFTEKHAR, F. Response surface optimization of medium composition for alkaline protease production by *Bacillus clausii*. **Biochemical Engineering Journal**, v.39, n.1, p.37-42, 2008.

OSÓRIO-FILHO, B. D.; GANO, K. A.; BINZ, A.; LIMA, R. F.; AGUILAR, L. M.; RAMIREZ, G. A. Rhizobia enhance growth in rice plants under flooding conditions. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, v.14, p.707-718, 2014.

OTERO, A.; VINCENZINI, M. Extracellular polysaccharide synthesis by Nostoc strains as affected by N source and light intensity. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.102, p.143-153, 2003.

PACE, N. R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, v.276, p.734-40, 1997.

PACHECO, F. **Sequenciamento, identificação e análise de genes de arroz envolvidos na interação com *Herbaspirillum seropedicae***. 2008. 77f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Universidade Federal do Paraná, UFP, Curitiba, 2008.

PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C. R.; SOCCOL, V. T.; SINGH, D.; MOHAN, R. Advances in microbial amylases. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.31, n.2, p.135-152, 2000.

PATEL, R. M.; SINGH, S. P. Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp.: Production and Optimization. **Process Biochemistry**, v.40, p.3569-3575, 2005.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.29, p.62-77, 2002.

PENG, G.; YUAN, Q.; LI, H.; ZHANG, W.; TAN, Z. *Rhizobium oryzae* sp. nov., isolated from the wild rice *Oryza alta*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p.2158-2163, 2008.

PEREIRA, K. C. **Caracterização morfológica, bioquímica e molecular de rizóbios recomendados para inoculação de leguminosas arbóreas**. 2002. 74f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia), Universidade Estadual Paulista, São Paulo. 2002.

PEREIRA-JUNIOR, N.; BOM, E. P. S.; FERRARA, M. A. **séries em biotecnologia: Tecnologia de Bioprocessos**. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, v.1, 2008.

PÉREZ, F. R.; SANTANA, R. C.; CAPÓ, Y. A.; MARTÍN, B. D.; GUTIÉRREZ, R. T. Aislamiento y caracterización morfológica de bacterias endófitas en sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). **Centro Agrícola**, v.37, p.61-66, 2010.

PIKOVSKAYA, R. I. Mobilization of phosphorous in soil inconnection with vital activity of some microbial species. **Mikrobiologiya**, v.17, p.362-370, 1948.

PLYUTA, V.; ZAIGSEVA, 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.

QUAX, W. J. **Bacterial Enzymes**. In: The Prokaryotes: applied bacteriology and biotechnology, *4th ed.* 2013, 393p.

QUEIROZ-RESPLANDES, V. M. **Caracterização genética e avaliação da produção de pigmentos tipo melanina de bactérias endofíticas isoladas de milho (*Zea mays* L.)**. 2016. 107f. Dissertação (mestrado em Ciências Moleculares), Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2016.

RAIJ, B. V. Fertilidade do solo e adubação. Piracicaba: **Ceres/Potafos**, p.343, 1991.

RAO, Y. K.; LU, S. C.; LIU, B. L.; TZENG, Y. M. Enhanced production of an extracellular protease from *Beauveria bassiana* by optimization of cultivation processes. **Biochemical Engineering Journal**, v.28, n.1, p.57-66, 2006.

RATLEDGE, C. Iron, mycobacteria and tuberculosis. **Tuberculosis**, v.84, n.1-2, p.110-130, 2004.

REIS-JUNIOR, F. B.; MENDES, I. C.; TEIXEIRA, K. R. S.; REIS, V. M. Uso de ferramentas moleculares em estudo da diversidade de microrganismos do solo. **Planaltina: Embrapa Cerrados**, 2002.

REIS-JUNIOR, F. B.; REIS, V. M.; SANTOS-TEIXEIRA, K. R. Restrição do 16S-23S DNAr intergênico para avaliação da diversidade de *Azospirillum amazonense* isolado de *Brachiaria* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.431-438, 2006.

REZENDE, S. S.; OLIVEIRA, M. E. S. de; DIDONET, C. C. G. M. **Bactérias Diazotróficas do gênero Pseudomonas: isolamento, diversidade e caracterização em plantas de arroz no cerrado de Goiás**. Disponível em: <<http://www.prp2.ueg.br/06v1/conteudo/pesquisa/inic-cien/eventos/sic2007/flashsic2007/arquivos/resumos/resumo69.pdf>>. Acesso em: 26, nov. 2016.

RINAUDO, M. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. **Polymer International**, v.57, p.397-430, 2008.

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

RODRIGUES, E. P.; RODRIGUES, L. S.; OLIVEIRA, A. L. M.; BALDANI, V. L. D.; TEIXEIRA, K. R. S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. *Azospirillum amazonense* inoculation: effects on growth, yield and N<sub>2</sub> fixation of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Soil**, v.302, p.249-261, 2008.

RODRIGUEZ, G. M.; SMITH, I. Mechanisms of iron regulation in mycobacteria: role in physiology and virulence. **Molecular microbiology**, v.47, n.6, p.1485-94, 2003.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v.17, p.319-339, 1999.

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

RUAS-MADIEDO, P.; DE LOS REYES-GAVILÁN, C.G. Invited Review: Methods for the Screening, Isolation and Characterization of Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. **Journal Dairy Science**, v.88, p.843-856, 2005.

SANTOS, A. B.; STONE, L. F.; VIEIRA, N. R. A. A cultura do arroz no Brasil. **Embrapa Arroz e Feijão**, Santo Antônio de Goiás, 2006.

SANTOS, I. B.; LIMA, D. R. M.; BARBOSA, J. G.; OLIVEIRA, J. T. C.; FREIRE, F. J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J. Bactérias diazotróficas associadas a raízes de cana-de-açúcar: solubilização de fosfato inorgânico e tolerância à salinidade. **Bioscience Journal**, v.28, p.142-149, 2012.

SANTOS, I. B.; PEREIRA, A. P. A.; OLIVEIRA, J. T. C.; OLIVEIRA, D. R. M.; FREIRE, F. J.; SOBRAL, J. K. Variabilidade genética de bactérias solubilizadoras de fosfato associadas à cana-de-açúcar. In: I CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, AGRÍCOLA E AMBIENTAL (CBMAAA). **Ciência & Tecnologia**, v.8, 2016.

SATHIYANARAYANAN, G.; KIRAN, G. S.; SELVIN, J. Synthesis of silver nanoparticles by polysaccharide bioflocculant produced from marine *Bacillus subtilis* MSBN17. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.102, p.13–20, 2013.

SCHLOTTER, M.; DILLY, O.; MUNCH, J. C. Indicators for evaluating soil quality, **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.98, p.255-262, 2003.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical biochemistry**, v.160, n.1, p.47-56, 1987.

SELBMANN, L.; CROGNALE, S.; PETRUCCIOLI, M. Exopolysaccharide production from *Sclerotium gluconicum* NRRL 3006 and *Botryosphaeria rhodina* DABAC-P82 on raw and hydrolysed starchy materials. **Applied Microbiology**.v.34, n.1, p.51-55, 2002.

SHAH, D. B.; WILSON, J. B. Egg yolk factor of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.89, p.949-953, 1965.

SHANMUGHAPRIYA, S.; KIRAN, G. S.; SELVIN, J.; THOMAS, T. A.; RANI, C. Optimization, purification, and characterization of extracellular mesophilic alkaline cellulase from sponge-associated *Marinobacter* sp. MSI032. **Applied biochemistry and biotechnology**, n.3, v.162, p.625-640, 2010.

SHIN, I. L.; SHIEH, C. J.; HSIEH, C. Y. Selective production and characterization of levan by *Bacillus subtilis* (Natto) Takahashi. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.53, n.21, p. 8211-8215, 2005.

SILVA, C. F.; REIS, K. C. D.; LOPES, N. A.; DIAS, M.; BATISTA, L. R.; SCHWAN, R. F. Enzymatic and antagonistic potential of bacteria isolated from typical fruit of

Cerrado in Minas Gerais State, Brazil. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.37, p.367-374, 2015a.

SILVA, D. M.; FRIES, M. R.; ANTONIOLLI, Z.; AITA, C.; VOSS, M.; JACQUES, R.; SEMINOTTI, J.; CARVALHO, C. A. Bactérias diazotróficas em solo cultivado com arroz irrigado (*Oryza sativa* L.). **Revista Brasileira de Agrociência**, v.10, n.4, p.467-474, 2004.

SILVA, M. D.; KUKLISNKY-SOBRAL, J.; FREIRE, F. J.; SILVA, M.O.; CADETE, L. L.; FARIAS, A. R. B. Bioprospecção de bactérias produtoras de amilase em feijão caupi e cana-de-açúcar. In: Jornada de ensino, pesquisa e extensão, 9, 2009, Universidade Federal Rural de Pernambuco UFRPE, Recife, 2009. **Anais Eletrônicos**. Disponível em: <<http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/listaresumos.htm>>. Acesso em: 26, nov. 2016.

SILVA, V. M. A; MARTINS, C. M.; MARTINS, S. C. S. Atividade celulolítica de actinobactérias de região semiárida do Ceará. **Enciclopédia biosfera**, Centro Científico Conhecer-Goiânia, v.11 n.21; p. 2015b.

SILVA, V. N.; SILVA, L. E. S. F.; FIGUEIREDO, M. V. B.; CARVALHO, F. G.; SILVA, M. L. R. B.; SILVA, A. J. N. Caracterização e seleção de populações nativas de rizóbios de solo da região semi-árida de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n.1, v.37, p.16-21, 2007.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H.J. **Methods in legume-Rhizobium technology**. Hawaii: Niftal Project; Mircen, p.367, 1985.

SOUCHIE, E. L.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M.; SAGGIN-JÚNIOR, O.; SILVA, E. M. R. Solubilização de fosfatos em meios sólidos e líquidos por bactérias e fungos do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.11, p.1149-1152, 2005.

SOUZA, M. L. Utilização de microrganismos na agricultura. **Biotecnologia**, n.21, p.28-31, 2001.

STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microorganismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.4, p.382-385, 1998.

STEHR, F.; KRETSCHMAR, M.; KRÖGER, C.; HUBE, B.; SCHÄFER, W. Microbial lipases as virulence factors. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.22, p.347-355, 2003.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.67, n.4, p.491-502, 2003.

STROSCHEIN, M. R. D.; SACCOL-DE-SÁI, E. L.; MACHADO, R. G.; CABRAL, T. L.; BRUXEL, M.; GIONGO, A.; FONTOURA, R. C. Caracterização e influência de rizóbios isolados de alfafa na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de arroz. **Ciência Rural**, v.41, n.10, p.1738-1743, 2011.

STROSCHEIN, M. R. D. **Caracterização de Bactéria Fixadora de Nitrogênio em *Lupinus albus***. 2007. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo), Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, 2007.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; MATHESON, B. G.; NOWAK, J. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. **Biology and Fertility of Soils**, v.25, p.13-19, 1997.

SUGANTHI, C.; MAGESWARI, A.; KARTHIKEYAN, S.; ANBALAGAN, M.; SIVAKUMAR, A.; GOTHANDAM, K.M. Screening and optimization of protease production from a halotolerant *Bacillus licheniformis* isolated from saltern sediments. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 11, p. 47–52, 2013.

SUTHERLAND, I. W. The biofilm matrix: an immobilized but dynamic microbial environment. **Trends in Microbiology**, v.9, p. 222-227, 2001.

SESHADRI, S.; MUTHUKUMARASAMY, R.; LAKSHMINARASIMHAN, C.; IGNACIMUTHU, S. Solubilization of inorganic phosphates by *Azospirillum halopraeferans*. **Current Science**, v.79, p. 565-557, 2000.

SZILAGYI-ZECCHIN, V. J. IKEDA, A. C.; HUNGRIA, M.; ADAMOSKI, D.; KAVACORDEIRO, V.; GLIENKE, C.; GALLI-TERASAWA, L. V. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. **AMB Express**, v.4, n.26, 2014.

TAURIAN, T.; ANZUAY, M. S.; ANGELINI, J. G.; TONELLI, M. L.; LUDUEÑA, L.; PENA, D.; IBÁÑEZ, F.; FABRA, A. Phosphate-solubilizing peanut associated

bacteria: screening for plant growth-promoting activities. **Plant Soil**, v.329, p.421-431, 2010.

TEJESVI, M. V.; NALINI, M. S.; MAHESH, B.; PRAKASH, H. S.; KINI, K. R.; SHETTY, H. S.; SUBBIAH, V. New hopes from endophytic fungal secondary metabolites. **Boletín de La Sociedad Química de México**, n.1, v.1, p.19-26, 2007.

TONIUTTI, M. A.; FORNASERO, L. V.; TROD, B. S.; ZUBER, N. E.; CÓRDOBA, M. S. Caracterización fenotípica y funcional de rizobios noduladores de dos especies del género *Macropitium*. **FAVE Sección Ciencias Agrarias**, v.14, n.1, 2015.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, v.5, p.240-245, 2002.

TRINDADE, R. A.; MUNHOZ, A. P.; BURKERT, C. A. V. **Produção de expolissacarídeos bacterianos em diferentes fontes de carbono**. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 20, 2014, Florianópolis. Anais, 2014.

VAN-BEILEN, J.B. Enzymetechnology: an overview. **Current Opinion in Biotechnology**, n.4, v.14, p.338-344, 2002.

VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B.; SCHLINDWEIN, G.; GRANADA, C. E.; GIONGO, A.; BENEDEZI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Occurrence of plant growth-promoting traits in clover-nodulating rhizobia strains isolated from different soils in Rio Grande do Sul state. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Piracicaba, v.33, n.5, p.1227-1235, 2009.

VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. Fixação biológica do nitrogênio em soja. In: VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. (ED.). **Biologia dos solos dos cerrados**. Planaltina, DF: EMPRAPA-CPAC, p. 295-360, 1997.

VELOSO, C. A. C.; BOTELHO, S. M.; LOPES, A. M.; CARVALHO, E. J. M. Nutrição e adubação da cultura do arroz de sequeiro. **Embrapa Amazônia Oriental**, Belém, 2009.

VERMANI, M. V.; KELKAR, S. M.; KAMAT, M. Y. Production and optimization of certain growth parameters for an exopolysaccharide from *Azotobacter vinelandii* MTCC 2460 isolated from a plant rhizosphere. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v.80, n.6, p.599-602, 1995.

VIEIRA, N. R. A.; CARVALHO, J. L. V. Qualidade Tecnológica. In: VIEIRA, N. R. A.; SANTOS, A. B.; SANT'ANA, E. P. **A cultura do arroz no Brasil**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, p.582-604, 1999.

VINCENT, J.M. Manual for the practical study of root nodule bacteria. **Oxford: Blackwell**, p.164, 1970.

WANG, S.; HUIJUN, W.; JUNQING, Q.; LINGLI, M.; JUN, L.; YANFEI, X.; XUEWEN, G. Molecular mechanism of plant growth promotion and induced systemic resistance to tobacco mosaic virus by *Bacillus* spp. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.19, p.1250-1258, 2009.

WANG, Y.; AHMED, Z.; FENG, W.; LI, C.; SONG, S. Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirifaciens* ZW3 isolated from Tibetan kefir. **International Journal of Biological Macromolecules**, n.3, v.43, p.283–288, 2008.

XIE, P.; HAO, X.; MOHAMAD, O. A.; LIANG, J.; WEI, G. Comparative study of chromium biosorption by *Mesorhizobium amorphae* strain CCNWGS0123 in single and binary mixtures. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.169, p.570–587, 2013.

YADAV, R. L.; ARCHNA-SUMAN,; PRASAD, S. R.; PRAKASH, O. Effect of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Trichoderma viride* on soil health, yield and N-economy of sugarcane cultivation under subtropical climatic conditions of India. **European Journal of Agronomy**, v. 30, p.296-303, 2009.

YANNI, Y. G.; DAZZO, F. B.; Enhancement of rice production using endophytic strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii in extensive field inoculation trials within the Egypt Nile Delta. **Plant Soil**, v.336, p.129-142, 2010.

YOO, H-Y.; SIMKHADA, J. R.; CHO, S. S.; PARK, D. H.; KIM, S. W.; SEONG, C. N.; YOO, J. C. A novel alkaline lipase from *Ralstonia* with potential application in biodiesel production. **Bioresource Technology**, v.102, p.6104-6111, 2011.

YOSHIDA, A.; SEO, Y.; SUZUKI, S.; NISHINO, T.; KOBAYASHI, T.; HAMADA-SATO, N.; KOGURE, K.; IMADA, C. Actinomycetal community structures in seawater and freshwater examined by DGGE analysis of 16S rRNA gene fragments. **Marine Biotechnology**, v.10, p.554-563, 2008.

YOUNG, J.P.W.; HAUKKA, K.E. Diversity and phylogeny of rhizobia. **New Phytologist**, v.133, n.1, p.87-94, 1996.

YUE, L. C.; EM, T. W.; XIN, H. S.; XIAO, X. Z.; WEN, X. C. Molecular diversity and phylogeny of rhizobia associated with *Lablab purpureus* (Linn.) grown in Southern China. **Systematic and Applied Microbiology**, n.34 p.276-284, 2011.

ZHANG, X. X.; TANG, X.; SHEIRDIL, R. A.; SUN, L. MA, X. T. *Rhizobium rhizoryzae* sp. nov., isolated from rice roots. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.64, p.1373-1377, 2014.

ZINNIEL, D. K.; LAMBRECHT, P.; HARRIS, N. B.; FENG, Z.; KUCZMARSKI, D.; HIGLEY, P.; ISHIMARU, C. A.; ARUNAKUMARI, A.; BARLETTA, R. G.; VIDAVER, A. K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.5, p.2198-2208, 2002.

## ANEXO I

### Meios de cultura, reagentes e soluções

#### Meio extrato de levedura-manitol (YMA) (VINCENT, 1970)

1. Manitol-----10 g
2. Fosfato de Potássio Dibásico (10 %)-----1 mL
3. Fosfato de Potássio Monobásico (10 %)-----4 mL
4. Sulfato de Magnésio (10 %)-----2 mL
5. Cloreto de Sódio (10 %)-----1 mL
6. Extrato de Levedura-----0,4 g
7. Ágar-----15 g
8. Água destilada-----q.s.p.1000 mL

O pH foi ajustado para 6,8, a solução foi autoclavada a 1 atm em temperatura de 121°C durante 20 minutos e armazenada em temperatura ambiente.

#### Meio Mínimo (HUNGRIA et al. 1994)

##### Solução 1

1. Fosfato de Amônio Monobásico-----30 g
2. Fosfato de Potássio Monobásico-----15 g
3. Fosfato de Amônio Dibásico-----2,5 g
4. Cloreto de Sódio-----2,5 g
5. Água destilada-----q.s.p.1000 mL

##### Solução 2

1. Sulfato de Magnésio (1M)

##### Solução 3

1. Ágar-----22,5 g
2. Água destilada-----q.s.p.1000 mL

As três soluções foram autoclavadas separadamente a 1 atm em temperatura de 121°C durante 20 minutos e armazenado em temperatura ambiente. A montagem foi feita com 199 mL da solução (1), 1 mL da solução (2), 800 mL da solução (3) e a fonte de carbono escolhida 1M.L<sup>-1</sup>.

**Meio leite sólido**

1. Solução  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1M)-----1 mL
2. Solução de Sais-----200 mL
3. Solução de Leite (20%)-----200 mL
4. Solução de Ágar-----800 mL
5. pH 7

**Meio carboximetilcelulose (CMC) sólido**

1. Solução  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1M)-----1 mL
2. Solução de Sais-----200 mL
3. Solução de CMC (5%)-----200 mL
4. Solução de Ágar-----800 mL
5. pH 7

**Meio tween sólido**

1. Solução  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1M)-----1 mL
2. Solução de Sais-----200 mL
3. Tween 80-----10 mL
4. Solução de Ágar-----800 mL
5. pH 7

**Meio NBRI-P (NAUTIYAL, 1999)**

1. Glicose-----10 g
2.  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -----5 g
3.  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -----5 g
4. KCl-----0,2 g
5.  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -----0,25 g
6.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -----0,1 g
7. Água-----q.s.p.1000 mL
8. Ágar-----15 g
9. pH 7

**Meio Pikovskaya's (PIKOVSKAYA, 1948)**

1. Extrato de levedura-----0,5 g
2. Glicose-----10 g
3.  $\text{Ca}_3(\text{PO})_4$ -----5 g
4.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -----0,5 g
5. KCl-----0,2 g
6.  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -----0,1 g
7.  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -----0,0001 g
8.  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -----0,0001 g
9. Água destilada-----q.s.p.1000 mL
10. Ágar-----15 g
11. pH 7

**Solução de ágar**

1. Ágar-----18 g
2. Água destilada-----800 mL

**Solução de sais**

1.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -----4 g
2.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -----4 g
3.  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -----100 mL
4. NaCl-----100 mL
5. Água destilada-----q.s.p.1000 mL

**Coloração de gram (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001)****Solução de cristal de violeta**

1. Violeta de metila-----4 g
2. Oxalato de amônia-----4 g
3. Álcool etílico-----100 mL
4. Álcool metílico-----100 mL
5. Água destilada-----600 mL

**Solução de lugol**

1. Iodeto de potássio-----4,5 g
2. Iodo metálico-----3 g
3. Água destilada-----450 mL

**Solução de safranina**

1. Safranina-----2,5 g
2. Água destilada-----500 mL

**Reagente CAS (SCHWYN; NEILAND, 1987)****Solução A**

1. Cromo Azul S-----12,2 mg
2. Água destilada-----10 mL

Esterizar por filtração

**Solução B**

1. HCL (concentrado)-----84  $\mu$ L
2. Água (deionizada)-----100 mL
3. FeCL<sub>3</sub>. 6H<sub>2</sub>O (1 mM)-----27 mg

**Solução C**

1. Brometo de hexadeciltrimetilamónio (HDTMA)-----21,9 mg
2. Água (destilada)-----25 mL

**Solução D**

1. Piperazina anidra (PIPE)-----4,307 g
2. Água (deionizada)-----40 mL
3. pH 5,6 (ajustar com HCL)

Adicionar 7,5 mL de solução A com 1,5 mL da solução B. Posteriormente, adicionar a mistura ao conteúdo da solução C e homogeneizar. Transferir a mistura para um balão volumétrico e adicionar todo o conteúdo da solução D e completar o volume para 100 mL com água destilada.

**Solução de lise**

1. Tris HCL (1M) pH 7,5-----5 mL
2. EDTA-----5 mL
3. NaCl (5M)-----8 mL
4. SDS (10%)-----10 mL
5. Água destilada-----q.s.p.100 mL

**Solução T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> (DNase free)**

1. Tris HCL (1M) pH 7,5-----1  
mL
2. EDTA (0,5M)-----100 µL
3. Água destilada-----q.s.p.50 mL

## Anexo II

**Tabela 6:** Avaliação da resistência dos 22 isolados associados à planta de arroz e três estirpes de referência *R. tropici* (BR322 e BR520) e *A. brasilense*

Isolados	Ampicilina				Cloranfenicol				Estreptomicina				Tetraciclina				Ácido nalidixico				%CIAC	
	30	50	100	200	30	50	100	200	30	50	100	200	30	50	100	200	30	50	100	200		
R18	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	25,0
R20	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	25,0
R21A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	25,0
R21B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100,0
R23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	90,0
R50	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	80,0
R59	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100,0
R62A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	25,0
R62B	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	25,0
R64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	20,0
R68	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	80,0
R130	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	60,0
R136A	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	35,0
R136B	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	35,0
R139	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	60,0
R141	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	80,0
R145	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	80,0
R147A	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	35,0
R147B	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	40,0
R148	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	85,0
R158	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	80,0
R161	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	95,0
BR322	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	95,0
BR520	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	85,0
FP2	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	65,0
%CICA	68,0	56,0	56,0	56,0	84,0	72,0	48,0	44,0	32,0	32,0	24,0	16,0	72,0	60,0	52,0	48	100,0	100,0	100,0	100,0		

(FP2) para diferentes concentrações (30 µg mL<sup>-1</sup>, 50 µg mL<sup>-1</sup>, 100 µg mL<sup>-1</sup> e 200 µg mL<sup>-1</sup>) dos antimicrobianos Ampicilina, Cloranfenicol, Estreptomicina, Tetraciclina e Ácido nalidixico.

Resistência ao antimicrobiano (+); Sensibilidade ao antimicrobiano (-).

%CIAC: Percentagem de crescimento dos isolados nos diferentes antibióticos e concentrações testadas.

%CICA: Percentagem de crescimento dos isolados em cada concentração de antibiótico testado.

## Anexo III

**Tabela 7:** Uso de diferentes fontes de carbono, atividade enzimática e produção de sideróforo para 22 isolados bacterianos associados à planta de arroz e três estirpes de referência *R. tropici* (BR322 e BR520) e *A. brasilense* (FP2)

		Isolados																								
		R18	R20	R21A	R21B	R23	R50	R59	R62A	R62B	R64	R68	R130	R136A	R136B	R139	R141	R145	R147A	R147B	R148	R158	R161	BR322	BR520	FP2
Fontes de carbono	Ácido maleico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	Ácido málico	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ácido nicotínico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ácido succínico	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	Arabinose	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	Frutose	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-
	Glicerina	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	Glicose	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	Inositol	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	Manitol	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	Manose	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	Sacarose	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Sorbitol	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
	Trealose	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Atividade enzimática	Amilase	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	
	Celulase	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
	Fosfato ácido	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
	Fosfato básico	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	
	Lipase	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
Protease	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-		
<b>Produção de sideróforo</b>		-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	

Atividade positiva (+); Atividade negativa (-)