

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

**DISSERTAÇÃO**

**Taxonomia Polifásica de Bactérias Diazotróficas**  
**do Gênero *Sphingomonas* spp. e Efeito da Inoculação**  
**em Plantas de Arroz**

**Sandy Sampaio Videira**

**2008**



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

**TAXONOMIA POLIFÁSICA DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS  
DO GÊNERO *Sphingomonas* spp. E EFEITO DA  
INOCULAÇÃO EM PLANTAS DE ARROZ**

**SANDY SAMPAIO VIDEIRA**

*Sob a Orientação da professora*  
**Vera Lúcia Divan Baldani**

*e Co-orientação do pesquisador*  
**Jean Luiz Simões Araújo**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo.

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2008

633.18  
V652t  
T

Videira, Sandy Sampaio, 1981-  
Taxonomia polifásica de bactérias  
diazotróficas do gênero *Sphingomonas* spp.  
e efeito da inoculação em plantas de arroz  
/ Sandy Sampaio Videira - 2008.  
126f. : il.

Orientador: Vera Lúcia Divan Baldani.  
Dissertação (mestrado) - Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto  
de Agronomia.

Bibliografia: f. 57-80; 104-114.

1. Bactérias fixadoras de nitrogênio -  
Teses. 2. Tipagem bacteriana - Filogenia-  
Teses. 3. Promoção de crescimento vegetal  
- Teses. 4. Arroz - Nitrogênio - Teses. I  
Baldani, Vera Lúcia Divan, 1954- . II.  
Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro. Instituto de Agronomia. III.  
Título.

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

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

**SANDY SAMPAIO VIDEIRA**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-graduação em Agronomia, área de Concentração em Ciência do Solo.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

Vera Lúcia Divan Baldani. Dr<sup>a</sup>. Embrapa Agrobiologia  
(Orientadora)

---

Marivaine da Silva Brasil. Dr<sup>a</sup>. UFMS

---

Adelson Paulo de Araújo. Dr. UFRRJ

---

João Sebastião de Paula Araujo. Dr. UFRRJ

*Se por um motivo muito grave você ficar em estado de ansiedade, faça um teste, deixe a ansiedade subir, subir, subir, até o limite máximo, até onde você não pode mais suportar. Neste momento, pense. O que poderia acontecer de pior? Pronto, você já começou a encontrar uma saída. Ao falar isto para você mesmo a sua força interior começa a agir no seu cérebro e o próximo passo é relaxar. A hora é difícil, mas o pior já passou e você já conseguiu se perguntar sobre o pior que lhe pode acontecer, agora basta encher o peito de ar e falar com segurança, assim você ganha metade do caminho e parte para a outra metade como vencedor.*

**Paulo Baleki**

**Aos Meus Pais,**  
*José Luiz Videira e Eliane Sampaio Videira,*  
*Que me ensinaram a importância do estudo,*  
*Por darem amor, apoio e compreensão,*  
*Pelo esforço e trabalho que me possibilitaram o estudo,*  
*Pela educação, lições de vida e moral.*  
*Por tudo o que fizeram por mim, este trabalho é dedicado a vocês.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo e à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Ao CNPq e FAPERJ pela bolsa concedida que me permitiram o privilégio de dedicar-me integralmente à pesquisa que agora concluo.

À Embrapa Agrobiologia pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho.

À minha orientadora, Dr<sup>a</sup> Vera Baldani, pela orientação científica em toda minha trajetória desde a graduação, pela amizade, confiança, respeito e por ter me inculcido o gosto do trabalho com bactérias.

Ao meu co-orientador, Dr. Jean Araujo, pela paciência, amizade, profissionalismo e pelas provocações valiosas que muito contribuíram para minha reflexão.

Ao Dr. Ivo Baldani, que não somente acompanhou meu trabalho, mas contribuiu e muito com suas valiosas sugestões e, sobretudo, pelo exemplo de competência profissional e comprometimento com a pesquisa.

À Dr<sup>a</sup> Márcia Vidal, sua simplicidade, gentileza e doçura jamais serão esquecidas.

À Dr<sup>a</sup> Verônica Reis, pela presteza e carinho que sempre me demonstrou.

Aos professores do CPGA-CS, em especial a Lúcia dos Anjos e Marcos Gervásio, pelas “dicas” constantes do ser professor e, sobretudo, pelo amor à profissão. Conviver com pessoas assim é privilégio de poucos!

Aos membros da banca examinadora, pela predisposição em analisar este trabalho.

A Luciana Rodrigues, pela amizade, carinho, ensinamentos iniciais e por confiar a mim as suas estirpes.

Aos colegas dos laboratórios de Gramíneas e Genética e Bioquímica, Marivaine, Elisete, Dani, Salomão, Joilson, Lia, Gabi, Marinete, Ricardo, Edílson, Rafa, Wilmondes, Aline, Lívia, André, Pat, Patty, Paulo, Zélio, Leona, Péricles e Helma, e aos demais alunos e agregados, não menos importantes, pelo convívio diário e ajuda.

Aos funcionários e vigias da Embrapa Agrobiologia, em especial ao Lúcio, Claudinho, Altiberto, Delson, Jonata, Jonny e Leandro.

À Lú e ao Roberto, pela amizade e por estarem sempre dispostos a resolver os entraves burocráticos.

Ao Dudu e Ademar, colegas da Graduação e Pós-graduação, por compartilharem comigo mais dois anos de estudo.

Ao meu grande amigo, Geraldo Baeta, por quem tenho enorme admiração e carinho, registro minha gratidão pelo incentivo, força e amizade incondicional ao longo desses anos.

Ao João, pelo incentivo constante e apoio na realização de mais uma etapa de minha vida acadêmica. Suas conversas faziam-me sentir mais tranquila, pronta para uma nova batalha.

Ao Ivan, pelo carinho, estímulo e, especialmente pela compreensão e companheirismo nos momentos de desespero. Você é muito especial!

Aos Meus Irmãos de Coração, Bia, Jaime, Re, Patty e Cel (e aos agregados, Talita, Felipe, Raul, ... ), com quem dividi muitas vezes as alegrias e tristezas tanto da formação profissional quanto da vida pessoal. Sou imensamente grata e feliz por poder contar com vocês!

À minha querida família, papai, mamãe, vovó, tios e primos... Vocês me ensinaram através de exemplos as principais virtudes de um homem: humildade, honestidade e dedicação. Estarei sempre em dívida por todo o apoio, amor, carinho e compreensão que deram a mim durante toda a minha vida.

A Deus, por colocar todas essas pessoas no meu caminho e me mostrar a importância de cada uma delas através dos desafios e alegrias que apareceram durante essa jornada.

Muito Obrigada... 😊

## **BIOGRAFIA**

SANDY SAMPAIO VIDEIRA, filha de José Luiz Videira e Eliane Sampaio Videira, nasceu em 02 de abril de 1981 na Cidade do Rio de Janeiro. Ingressou no Centro Federal de Educação Tecnológica de Química de Nilópolis/RJ, concluindo o curso técnico em Saneamento Básico no ano de 2001. Gradou-se em Engenharia Agrônoma na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro no ano de 2006. Durante a graduação foi estagiária da Embrapa Agrobiologia, e posteriormente, bolsista de iniciação científica do CNPq, na área de Microbiologia e Bioquímica do Solo, de setembro de 2001 a fevereiro de 2006. Em março de 2006 ingressou no Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do solo na UFRRJ, onde iniciou como bolsista do CNPq no primeiro ano, e selecionada, por mérito, como bolsista do Edital Bolsa Nota 10 da FAPERJ, no segundo ano.

## RESUMO GERAL

VIDEIRA, Sandy Sampaio. **Taxonomia polifásica de bactérias diazotróficas do gênero *Sphingomonas* spp. e efeito da inoculação em plantas de arroz.** 2008. 126f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ, 2008.

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um alimento extensamente consumido no planeta, suprimindo mais de 50% da alimentação mundial. Aproximadamente 150 milhões de hectares são utilizados para seu cultivo, e destes, 32% crescem em condições de terras altas. O arroz é normalmente cultivado em solos com deficiência de N, exigindo que este elemento seja fornecido por meio de fertilizantes nitrogenados comercialmente disponíveis. Infelizmente, uma quantidade significativa do N aplicado como fertilizantes perde-se através de diferentes mecanismos, causando problemas de poluição ambiental e aumento no custo de produção. A utilização da tecnologia de fixação biológica de N<sub>2</sub> (FBN) pode diminuir a aplicação de N-fertilizantes, reduzindo os elevados custos econômicos e ambientais. Dentre a grande diversidade de bactérias que se associam com plantas de arroz, bactérias do gênero *Sphingomonas* são frequentemente encontradas, entretanto a primeira espécie fixadora de nitrogênio só foi descrita recentemente. Devido ao grande número de bactérias deste gênero obtidas de plantas de arroz cultivadas no campo experimental da Embrapa Agrobiologia, o presente estudo visou estudar a diversidade genética e identificar estes isolados, através de métodos moleculares, fisiológicos e quimiotaixonômicos, assim como avaliar o comportamento populacional e a eficiência de alguns isolados na promoção de crescimento vegetal de plantas de arroz de terras altas cultivadas em casa de vegetação. Os resultados obtidos mostraram que somente 50% dos isolados apresentaram atividade da nitrogenase *in vitro* e o gene relacionado a FBN. Todos os isolados diazotróficos foram identificados como *Sphingomonas* spp., apresentando pouca diversidade genética entre si e maior similaridade com a espécie *Sphingomonas azotifigens*. A população de bactérias diazotróficas revelou maior número nas raízes. Verificou-se um incremento no rendimento de grãos do arroz de até 48% quando inoculado com algumas estirpes de *Sphingomonas* spp. e *Herbaspirillum seropedicae* (ZAE94) sobre o tratamento sem inoculação e sem adubação nitrogenada.

**Palavras – chave:** Fixação biológica de nitrogênio. Nitrogenase. *Oryza sativa*.

## GENERAL ABSTRACT

VIDEIRA, Sandy Sampaio. **Poliphasic taxonomy of *Sphingomonas* spp. diazotrophic bacteria and effect of inoculation in rice plants.** 2008. 126p. Dissertation (Master Science in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ, 2008.

Rice (*Oryza sativa* L.) is a widely consumed food on the planet, supplying more than 50% of the world's food. Approximately 150 million hectares are used for its cultivation, and of these, 32% grow in upland conditions. Rice is usually grown in N-deficient soils, demanding that the element be supplied to the field by commercially available N fertilizers. Unfortunately, a substantial amount of the N applied as fertilizers is lost through different mechanisms, causing environmental pollution and economical problems. Utilization of biological N<sub>2</sub> fixation (BNF) technology may decrease the application of N fertilizers, reducing environmental and economical risks. Among the wide variety of bacteria that are associated with rice plants, *Sphingomonas* spp. are often found; although the first nitrogen-fixing specie has been reported only recently. Due the large number of *Sphingomonas* spp. obtained from rice plants grown in the experimental field of Embrapa Agrobiologia, this study aimed to study the genetic diversity and identify these isolates through molecular, physiological and quimiotaxonomic methods, as well as assess the behavior of the population and the efficiency of some isolated in growth-promoting of upland condition rice plants cultivated in a greenhouse. The results showed that only 50% of the isolates presented *in vitro* nitrogenase activity and the gene related to BNF. All diazotrophic isolates were identified as *Sphingomonas* spp., showing little genetic diversity among themselves and greater similarity to *Sphingomonas azotifigens*. The population of diazotrophic bacteria showed great numbers present in the rice roots. There was an increase in grain yield of rice by 48% when inoculated with some strains of *Sphingomonas* spp. and *Herbaspirillum seropedicae* (ZAE94) on the treatment without inoculation and without nitrogen.

**Key words:** Biological nitrogen fixation. Nitrogenase. *Oryza sativa*.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO I. TAXONOMIA POLIFÁSICA DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS DO GÊNERO <i>Sphingomonas</i></b>	
<b>RESUMO</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>4</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>5</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>6</b>
2.1 Taxonomia Bacteriana	6
2.1.1 Métodos genotípicos	6
2.1.2 Métodos fenotípicos	11
2.1.3. Métodos quimiotaxonômicos	12
2.2 O Gênero <i>Sphingomonas</i>	12
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>18</b>
3.1. Origem dos Isolados	18
3.2 Extração de DNA Genômico	19
3.3 Identificação de Bactérias Diazotróficas	19
3.4 Avaliação da Diversidade dos Isolados	21
3.4.1 Análise de restrição dos fragmentos amplificados (ARDRA)	21
3.4.2 Polimorfismo do tamanho de fragmentos amplificados (AFLP)	22
3.4.3 DGGE do gene 16S DNAr	23
3.5 Determinação do Posicionamento Taxonômico e Relação Filogenética	24
3.5.1 Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência (FISH)	24
3.5.2 Gênero-específico	25
3.5.3 Seqüenciamento do gene 16S DNAr	25
3.5.4 Hibridização DNA:DNA	26
3.6 Características Fenotípicas e Quimiotaxonômicas	27
3.6.1 Curva de crescimento bacteriano	27
3.6.2 Morfologia de colônia	28
3.6.3 Morfologia celular	28
3.6.4 Reação de Gram	28
3.6.5 Testes enzimáticos	28

3.6.6 Condições ideais de pH e temperatura	29
3.6.7 Tolerância a NaCl	29
3.6.8 Tolerância a sacarose	30
3.6.9 Metabolismo de carbono	30
3.6.10 Produção de ácido-3-indolacético (AIA)	30
3.6.11 Solubilização de fosfatos	31
3.6.12 Ésteres metílicos de ácidos graxos celulares (FAME)	31
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>32</b>
4.1 Ativação dos Isolados	32
4.2 Qualidade e Quantificação do DNA Genômico	32
4.3 Identificação de Bactérias Diazotróficas	32
4.4 Diversidade Genética	35
4.4.1 ARDRA	35
4.4.2 AFLP	37
4.4.3 DGGE	40
4.5 Posicionamento Taxonomico e Relação Filogenética	41
4.5.1 FISH	41
4.5.2 Seqüenciamento e análise filogenética da região16S DNAr	42
4.4.3 Identificação com iniciadores específicos	44
4.5.4 Hibridização DNA:DNA	45
4.6 Características Fenotípicas e Quimiotaxonômicas	47
4.6.1 Curva de crescimento	47
4.6.2 Morfologia de colônias	48
4.6.3 Morfologia celular	48
4.6.4 Reação de Gram e testes enzimáticos	48
4.6.5 Tolerância a NaCl	49
4.6.6 Tolerância a sacarose	49
4.6.7 Metabolismo de carbono	50
4.6.8 Solubilização de fosfato	51
4.6.9 Produção de AIA	52
4.6.10 FAME	53
<b>5. CONCLUSÕES</b>	<b>55</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>56</b>

**7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** **57**

**CAPÍTULO II. EFEITO DA INOCULAÇÃO DE *Sphingomonas* spp. EM PLANTAS DE ARROZ**

**RESUMO** **82**

**ABSTRACT** **83**

**1. INTRODUÇÃO** **84**

**2. REVISÃO DE LITERATURA** **85**

2.1 Nitrogênio na Cultura do Arroz **85**

2.2 Fixação de Nitrogênio **86**

2.3 Fixação Biológica de Nitrogênio em Arroz **87**

**3. MATERIAL E MÉTODOS** **90**

3.1 Área de Estudo **90**

3.2 Cultivar Utilizada **90**

3.3 Delineamento Experimental **90**

3.4 Preparo do Inoculante **90**

3.5 Implantação do Experimento **90**

3.6 Determinações **90**

3.6.1 Contagem do número mais provável (NMP) **91**

3.6.2 Acúmulo de biomassa e nutrientes **92**

3.6.3. Análises estatísticas **92**

**4. RESULTADOS E DISCUSSÕES** **93**

4.1 Número Mais Provável (NMP) - Solo e Semente **93**

4. 2 Biomassa da Parte Aérea (BMS) e Acúmulo de N, P e K **93**

**5. CONCLUSÕES** **102**

**6. CONSIDERAÇÕES FINAIS** **103**

**7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** **104**

**CONCLUSÕES GERAIS** **115**

**CONSIDERAÇÕES GERAIS** **116**

**ANEXOS** **117**

## INTRODUÇÃO GERAL

As bactérias estão presentes em todos os ambientes terrestres ocupando e colonizando todos os nichos possíveis, incluindo as superfícies e interior de plantas, que constituem um verdadeiro ecossistema microbiano (NEWMAN & BANFIELD, 2002; TORSVIK et al., 2002). Entre as bactérias associadas a plantas, as bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) são consideradas um dos grupos mais importantes na agricultura tropical. Há vários efeitos positivos atribuídos às BPCV, como o controle biológico de pragas e doenças nas plantas (DOWNING et al., 2000), fixação biológica de nitrogênio (BALDANI & BALDANI, 2005), indução de resistência sistêmica (HALLMANN, 1997), produção de antibióticos (STROBEL & DAISY, 2003), produção de fitohormônios como as auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e etileno (LEE et al., 2004; ZAKHAROVA, 1999; KUKLINSKY-SOBRAL, 2004), dentre outros.

A interação de bactérias fixadoras de nitrogênio com diversas culturas tem sido tema de pesquisas no mundo todo, devido ao seu potencial biotecnológico, evidenciado no aumento da produtividade das culturas, possibilidade de redução dos custos de produção ao diminuir o volume de adubos nitrogenados aplicados e, conseqüentemente, melhoria da conservação dos recursos ambientais (KUSS, 2006). As contribuições da fixação biológica de nitrogênio foram verificadas inicialmente em leguminosas, mas plantas da família *Poaceae* como o arroz, têm apresentado potencial significativo, podendo a contribuição da FBN chegar a 58% (MIRZA et al., 2000; BALDANI et al., 2002). Diferentes gêneros de bactérias diazotróficas têm sido isolados de rizosfera e tecidos de arroz, incluindo o gênero *Sphingomonas* (IIZUKA, 1960, KIM et al., 1998; XIE & YAKOTA, 2006).

A literatura vem relatando um crescimento constante do número de espécies bacterianas associadas a plantas de arroz, por isso os processos de reconhecimento e avaliação do potencial destes novos microrganismos são necessários para que prossigam estudos quanto à sua atuação sobre o rendimento desta cultura e possibilidade de utilização nos sistemas de produção agrícola.

Este estudo justifica-se pela necessidade de identificar e resolver as relações filogenéticas de isolados bacterianos do gênero *Sphingomonas* spp. obtidos de tecidos vegetais de dois cultivares de arroz e verificar o potencial de aplicação destas bactérias em plantas de arroz. Os resultados desta pesquisa podem fornecer informações valiosas, bem como auxiliar na seleção de estirpes mais eficientes para processos de inoculação, obtendo-se desta maneira, o máximo fornecimento de nitrogênio para a cultura do arroz.

Este estudo foi organizado em dois capítulos, o primeiro abordando a utilização da taxonomia polifásica para avaliar a diversidade, identificar e caracterizar isolados de bactérias do gênero *Sphingomonas* obtidas do interior de plantas de arroz; e o segundo se refere ao experimento de inoculação de plantas em casa de vegetação, observando-se o comportamento populacional das bactérias diazotróficas e o crescimento de plantas de arroz de terras altas (sequeiro) frente aos tratamentos de inoculação e diferentes doses de nitrogênio aplicadas, avaliando-se o possível efeito benéfico das bactérias diazotróficas na produtividade do arroz.

## **CAPÍTULO I**

### **TAXONOMIA POLIFÁSICA DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS DO GÊNERO *Sphingomonas***

## RESUMO

As plantas constituem um complexo ecossistema onde comunidades bacterianas interagem continuamente. O número de diferentes espécies e a população de uma determinada espécie dentro da comunidade são parâmetros essenciais para o manejo em culturas de interesse agrônomo. Visto que as bactérias podem beneficiar de muitas maneiras as plantas hospedeiras, o conhecimento da estrutura e diversidade destes microrganismos pode ser aplicado para melhorar a produtividade de cultivos. A maioria dos estudos de bactérias associadas a arroz está relacionada com a fixação biológica de nitrogênio. Entretanto, estudos de diversidade e identificação da população de bactérias do gênero *Sphingomonas* associadas aos tecidos de plantas de arroz ainda não foram realizados. O objetivo deste estudo foi identificar e avaliar a diversidade genética de bactérias do gênero *Sphingomonas* obtidas de tecidos de arroz através de uma abordagem polifásica, utilizando métodos moleculares, fisiológicos e bioquímicos. Os isolados foram obtidos durante o trabalho de tese de Rodrigues em 2003. Das 54 isolados obtidos de tecidos vegetais de plantas de arroz recuperados do estoque inicial, somente 50% apresentaram o gene relacionado à FBN e foram capazes de mostrar atividade da nitrogenase *in vitro*. Dentre os isolados fixadores de nitrogênio, os resultados obtidos pelo ARDRA, AFLP e FAME mostraram que os isolados se dividiram em dois grupos distintos. As análises da seqüência parcial do gene 16S DNAr e as demais técnicas utilizadas para posicionamento taxonômico dos isolados bacterianos permitiram a sua classificação como membros do gênero *Sphingomonas*. Embora a técnica de hibridização DNA:DNA não tenha sido finalizada, os resultados sugerem que os isolados apresentam maior similaridade genética com as espécies *S. azotifigens* seguida da espécie *S. trueperi*. Os isolados produziram AIA, mas não foram capazes de solubilizar fosfato. Em função de sua constante associação com as plantas e ampla distribuição, estas bactérias podem ser importantes não apenas pela FBN e produção de fitohormônios, mas também por apresentar outros atributos interessantes para utilização na biotecnologia.

**Palavras - chave:** Bactérias fixadoras de nitrogênio. Tipagem bacteriana. Filogenia.

## ABSTRACT

Plants are a complex ecosystem where bacterial communities continuously interact. The number of different species and the population of a specific species within the community are essential parameters to define its structure and diversity. This knowledge can be applied to improve the productivity and to facilitate the management of agronomic interest crops. The majority of bacteria studies associated to rice are related to biological nitrogen fixation. However, studies about the diversity of *Sphingomonas* community of rice plant tissues have not yet been reported. The objective of this study was to identify and assess the genetic diversity of *Sphingomonas* bacteria obtained from rice tissues through a poliphasic approach, using molecular, physiological and biochemical methods. Only 50% of the isolates obtained from rice tissues showed the gene related to the BNF and were capable of showing the nitrogenase activity *in vitro*. Among the nitrogen-fixing isolates, the results obtained through ARDRA, AFLP and FAME showed that the isolates were divided into two distinct groups. Analyses of the partial sequence of 16S rDNA gene and the other techniques used for taxonomic placement of the bacterial isolates allowed their classification as members of the *Sphingomonas* genus. Although the technique of DNA:DNA hybridization has not been finalized, the results suggest that the isolates show greater genetic similarity to *S. azotifigens* species followed by *S. trueperi*. The isolates produced AIA, but have not been able to solubilize phosphate. Because of its constant association in plants and wide distribution, these bacteria may be important not only for the BNF and production of phytohormone, but also by presenting other interesting attributes useful in biotechnology.

**Key words:** Nitrogen-fixing bacteria. Bacterial typing. Phylogeny.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é reconhecido como um dos países que apresenta um dos mais elevados índices de biodiversidade animal e vegetal. Entretanto, são escassos dados sobre a diversidade microbiana brasileira. Por isso, a identificação de novos microrganismos, bem como sua preservação e classificação apropriada, é imprescindível para que a nossa diversidade seja convenientemente utilizada e convertida em riquezas.

Os primeiros sistemas de classificação de procariontes eram baseados apenas em propriedades fenotípicas utilizadas para agrupar linhagens, a despeito de qualquer afinidade evolutiva verdadeira, e por isso foram tidos como artificiais. Durante as últimas duas décadas, técnicas moleculares têm sido amplamente utilizadas para estudar bactérias obtidas de muitas plantas, inclusive os cereais. Os métodos utilizados para detectar e isolar bactérias diazotróficas envolve basicamente a maceração de tecidos vegetais e inoculação em meio de cultivo semi-sólido livre de nitrogênio. Esse método pode fornecer estimativas da população bacteriana, assim como a colonização ao longo da planta, mas não revelar a identidade exata dos organismos.

O gênero *Sphingomonas* compreende mais de 50 espécies bacterianas, e embora sejam encontradas em associação com plantas de arroz desde 1960, somente em 2006 *S. azotifigens* foi descrita como a primeira espécie fixadora de nitrogênio deste gênero, obtidas de raízes de plantas de arroz. Embora bactérias do gênero *Sphingomonas* sejam mundialmente estudadas, não existem informações sobre a diversidade e distribuição de bactérias diazotróficas deste gênero em plantas de arroz. Desta forma, estudos que buscam aumentar os conhecimentos a respeito da população de bactérias deste gênero em plantas de arroz, podem auxiliar no entendimento do processo interativo, visto que já foi observado que bactérias que se associam às plantas podem conferir ao seu hospedeiro muitos benefícios na promoção de crescimento vegetal.

Diante do exposto, torna-se evidente a necessidade de um melhor conhecimento da população de *Sphingomonas* spp. associada a plantas de arroz. Desta forma, este capítulo teve como objetivos: (i) identificar a população diazotrófica de bactérias do gênero *Sphingomonas* previamente obtidas de plantas de arroz; (ii) estudar a diversidade genética destas bactérias através da utilização de testes moleculares e; (iii) identificar, *in vitro*, o metabolismo e funcionalidade destas bactérias.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Taxonomia Bacteriana

As bactérias constituem um dos grupos mais diversos na terra e possuem importância indiscutível na sustentabilidade da biosfera. Têm um papel preponderante nos ciclos biogeoquímicos (carbono, nitrogênio, e outros elementos), processos de biorremediação, conversão de energia, biocatálises, e síntese de produtos naturais; isto faz das bactérias uma fonte importante para novos processos industriais e biotecnológicos (BULL et al., 2000; DEUTSCHBAUER et al., 2006). Consequentemente, o interesse na exploração de comunidades naturais de bactérias tem aumentado, e apesar da grande diversidade encontrada estima-se que tenhamos conhecimento de apenas uma pequena fração das bactérias existentes (TORSVIK et al., 2002).

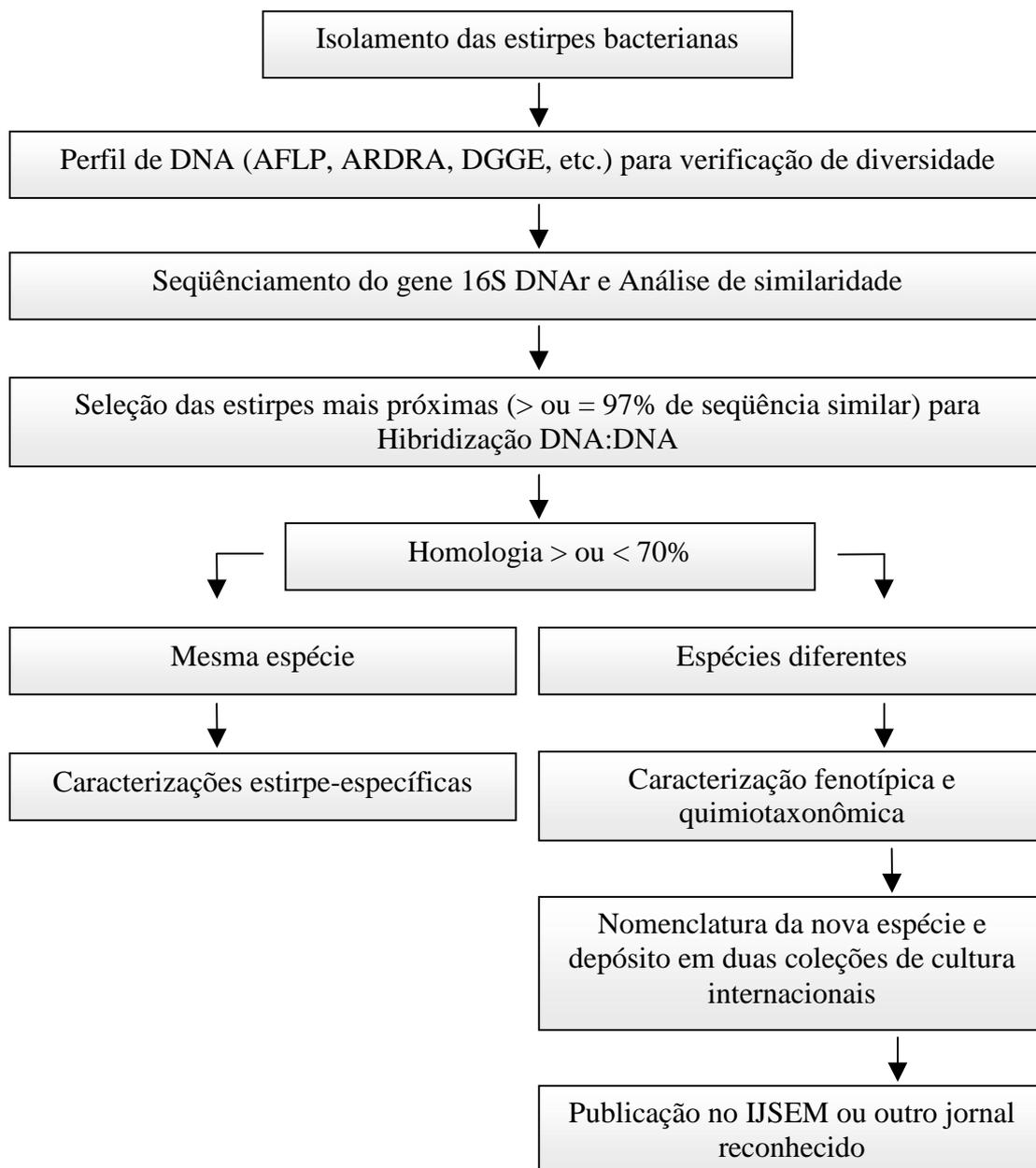
A taxonomia e sistemática microbiana abordam a classificação (criação de novas taxa), identificação (alocação de linhagens dentro de espécies conhecidas) e nomenclatura dos microrganismos (VANDAMME et al., 1996; GEVERS et al., 2005; COENYE et al., 2005). Os termos taxonomia e sistemática foram frequentemente utilizados de forma indiscriminada, mas os dois termos apresentam diferentes significados. A taxonomia é a teoria e a prática de classificar microrganismos (MAYR & ASHLOCK, 1991), a sistemática refere-se ao estudo da diversidade dos organismos e o relacionamento entre eles, incluindo seu parentesco evolutivo (filogenia) e todas as possíveis interações biológicas (SIMPSON, 1961).

Por mais de 100 anos, os microrganismos tem sido descritos e identificados por metodologias dependentes de cultivo (FRY, 2000; SCHLEIFER, 2004). A maioria das descrições tem sido baseada em certas características morfológicas, como forma e coloração das colônias, tamanho e motilidade celular, patogenicidade, assimilação de diferentes fontes de carbono, dentre outros, resultando na formação de grupos taxonômicos relativamente heterogêneos e muitas vezes artificiais (WOESE, 1987). Houve, no entanto, a necessidade de uma abordagem mais abrangente para fornecer informação convincente para determinar linhagens bacterianas. A algumas décadas, avanços e inovações nas técnicas moleculares, baseadas em sequenciamento de DNA e análise de seqüências dos genes ribossomais (principalmente as subunidades menores como 16S DNAr – SSU DNAr) de vários procaríotos, têm gerado informações relevantes nas relações taxonômicas, ecológicas e evolucionárias das espécies de bactérias encontradas (DAHLLOF, 2002; FORNEY et al., 2004).

A primeira tentativa de classificação microbiana baseada em DNA fita simples foi feita por Schildkraut et al. em 1961. Esse foi um grande avanço no mundo da classificação microbiana, preparando o caminho para o desenvolvimento do sistema polifásico atualmente utilizado. O termo cunhado por Colwell em 1970, taxonomia polifásica, refere-se à integração de informações genotípicas complementadas com informações fenotípicas e quimiotaxonômicas de um microrganismo a fim de executar um agrupamento do mesmo (PRAKASH et al., 2007). A abordagem polifásica é uma tendência recente da taxonomia microbiana, que prevê um sistema de classificação autêntico (Figura 1).

#### 2.1.1 Métodos genotípicos

Os métodos genotípicos de taxonomia, direcionados para moléculas de DNA ou RNA, são consequência do progresso tecnológico experimentado pela biologia molecular nas décadas recentes e atualmente dominam os estudos taxonômicos modernos (VANDAMME et al., 1996).



**Figura 1.** Fluxograma dos procedimentos a serem realizados para a caracterização taxonômica de isolados bacterianos de acordo com Prakash et al., 2007.

Em 1987, o Comitê Internacional de Sistemática Bacteriana definiu “espécie bacteriana” como um grupo de estirpes que apresentam mais de 70% de homologia na hibridização DNA:DNA com 5°C ou menos de variação da temperatura de fusão ( $\Delta T_m$ ), desde que todas as características fenotípicas e quimiotaxonômicas estejam de acordo (WAYNE et al., 1987). Em 1987, os trabalhos de Stackebrandt & Goebel e Woese, demonstraram que a similaridade das seqüências do todo o gene 16S DNAr também deveria ser utilizada na definição de espécies, onde estirpes com similaridade das seqüências de 16S > 97% deveriam ser consideradas a mesma espécie, e estirpes com 97% ou menos de similaridade não necessariamente pertenceriam a mesma espécie (STACKEBRANDT & GOEBEL, 1994). Em 2002, um novo comitê reavaliou a definição de espécies na bacteriologia e propuseram que além da hibridização DNA:DNA e a seqüência do gene 16S

DNAr (apresentando mais de 1.300 nucleotídeos e similaridade com outras seqüências < 99,5%), outras técnicas envolvendo genomas deveriam ser utilizadas como base para a definição de novas espécies (STACKEBRANDT et al., 2002).

#### **a) Análise do gene 16S DNAr**

Em procariotos são encontrados três tipos de moléculas de ribossomas: o 5S e 23S que constituem a subunidade grande (LSU) e as moléculas de 16S que constituem a subunidade pequena (SSU) (SEVIOUR et al., 1999). O RNA é sempre sintetizado a partir da cópia de regiões específicas e bem delimitadas do DNA. Os genes ribossomais do DNA possuem a informação genética, que codifica a síntese das diferentes moléculas de RNAr (LECHNER et al., 1994). Devido a síntese de ribossomas ser tão importante para todas as células, é provável que o sistema para tradução tenha surgido uma única vez na evolução, e não tenha sido alterado subsequentemente. Desta forma, por ser um processo conservado durante o período evolutivo, as seqüências das subunidades 5S, 16S e 23S podem ser consideradas conservadas, assim como os genes que as codificam (ABREU, 2004).

A seqüência do gene 16S DNAr foi estabelecida como marcador genético universal por varias razões, dentre elas: (i) distribuição universal entre os procariotos, (ii) conservação natural, apresentando baixa taxa de mutação durante a evolução, (iii) papel fundamental do ribossomo na síntese protéica, (iv) não ocorrência de transferências horizontais, e (v) tamanho ideal para utilização através de técnicas de PCR e seqüenciamento (WOESE, 1987; CLARRIDGE, 2004).

Atualmente, este gene tem sido seqüenciado de muitas bactérias (MAIDAK et al., 1996). Muitas das regiões conservadas são semelhantes entre diferentes bactérias, e dentro destas, pequenas seqüências podem ser reconhecidas como únicas sendo espécie-específicas ou estirpe-específicas (ABREU, 2004). Estas seqüências podem ser utilizadas para identificação individual de células bacterianas (AMANN et al., 1990; 1995).

Nos estudos do gene 16S DNAr a reação em cadeia da polimerase (PCR) é o método mais comumente utilizado; as informações obtidas podem ser comparadas através das análises dos perfis gerados por técnicas de análise de restrição de DNA ribossomal (ARDRA) (GICH et al., 2000; LAGACÉ et al., 2004), eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) (SIEVERT et al., 2000; LEYS et al., 2004), hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) (AMANN et al., 2001), dentre outras. O seqüenciamento do fragmento produzido pela amplificação por PCR do gene 16S DNAr tem sido muito utilizado na identificação e análises comparativas para entender as relações filogenéticas entre os procariotos a nível de espécie. De forma geral, estes métodos moleculares baseados no gene 16S DNAr tornaram-se mais populares e amplamente aceitáveis devido à sua simplicidade e poder discriminatório, podendo desta forma contribuir para a identificação taxonômica das estirpes.

#### **b) Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA)**

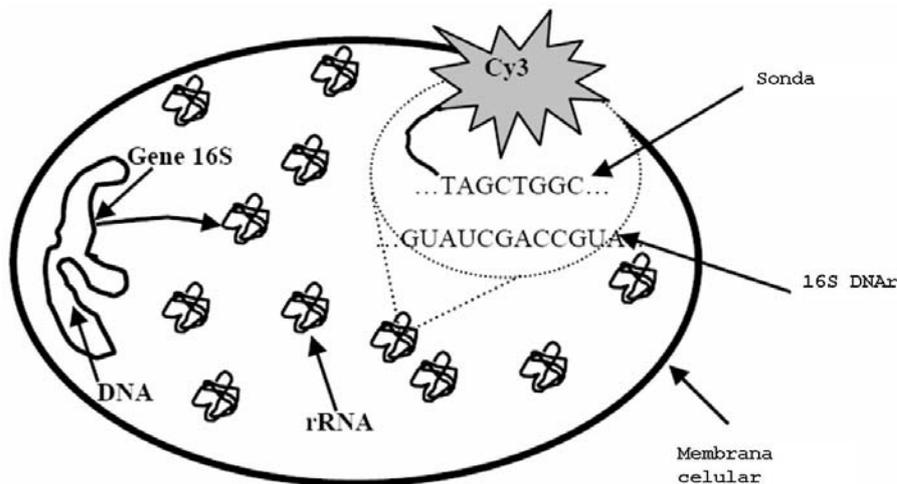
ARDRA é uma técnica derivada do RFLP e emprega a digestão do DNA ribossomal amplificado com diferentes enzimas de restrição. É baseada no grau de conservação do gene e variação dos sítios de restrição do DNAr que reflete nos padrões filogenéticos. A vantagem desta técnica, em contraste com outros métodos de análise de fragmentos, é que além de gerar padrões específicos para gêneros e espécies (GÜRTLER et al., 1991), também gera padrões intra-específicos (AZEVEDO et al., 1998; REIS JUNIOR et al., 2006). No caso de análise da diversidade de grupos de isolados com elevada afinidade filogenética, o fragmento amplificado deve incluir o espaço intergênico 16S-23S DNAr. Esta região apresenta maior variabilidade, tanto em composição de bases quanto em tamanho, quando comparada com a 16S e 23S.

### c) Electroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)

A técnica de DGGE foi primeiramente utilizada para identificar mutações gênicas na área médica (BORRESEN et al., 1988). MUYZER et al. (1993) foram os primeiros a adaptar o uso de DGGE para análises de comunidades microbianas. Inicialmente, comunidades com diversidade limitada foram examinadas (MUYZER et al., 1995; FERRIS et al., 1996) e, subsequentemente, muitos grupos passaram a utilizar a técnica para análise de comunidades microbianas dos solos (HEUER et al., 1997; DUINEVELD et al., 1998). Devido à imensa complexidade das comunidades microbianas deste ambiente, pesquisadores tiveram que selecionar iniciadores específicos para populações conhecidas como actinomicetos (HEUER et al., 1997) e bactérias nitrificantes (KOWALCHUK et al., 1997), ou limitar suas pesquisas a ambientes específicos como a rizosfera e tecidos vegetais (DUINEVELD et al., 1998; ROSADO et al., 1998; LEYS et al., 2004; NAKATSU, 2007). Qualquer gene pode ser utilizado nesta técnica, desde que apresente regiões conservadas e variáveis em sua seqüência de bases. A maioria dos estudos tem sido feito com o 16S DNAr, mas outros marcadores como regiões intergênica (BECKER et al., 2004; DE OLIVEIRA et al., 2006), 5S DNAr (STONER et al., 1996), o gene *rpoB* (DA MOTA et al., 2004) e o gene *nifH* (WARTIAINEN et al., 2008), entre outros, também tem sido utilizados.

### d) Hibridização *in situ* por fluorescência (FISH)

A metodologia de FISH é um exame de microscopia que tem sido utilizado para identificação de bactérias, sendo uma das técnicas de identificação mais direta. Este método usa hibridização de oligonucleotídeos, geralmente com 15 nucleotídeos complementares a regiões específicas do gene 16S DNAr ou 23S DNAr para as diferentes classes, gêneros e espécies bacterianas (AMAM et al., 2001). As sondas são capazes de entrar nas células fixadas podendo formar ligações estáveis com a região 16S ou 23S nos ribossomos (Figura 2). Se não existir complementaridade entre a sonda e o ribossomo, não ocorre hibridização e a sonda é lavada da célula (LINDREA et al., 1999). As células que hibridizam com a sonda marcada podem ser diretamente visualizadas em um microscópio de epifluorescência.



**Figura 2.** Hibridização *in situ* com sonda de oligonucleotídeos específica para o gene 16S DNAr. Fonte: adaptado de Abreu, 2004.

### e) Hibridização de ácidos nucleicos

A Hibridização DNA – DNA, ou técnica de reassociação DNA:DNA tem sido utilizada na caracterização genotípica de bactérias a algumas décadas. É uma das primeiras técnicas moleculares utilizadas (CROSA et al., 1973) e até agora permanece como

metodologia fundamental para o delineamento de espécies bacterianas (ROSSELLÓ-MORA & AMANN, 2001).

Esta técnica permite a comparação do genoma total entre duas espécies bacterianas sob condições padronizadas. De acordo com esta metodologia, uma espécie bacteriana inclui estirpes com 70% ou mais de similaridade DNA:DNA com 5°C ou menos de variação da temperatura de fusão (WAYNE et al., 1987; VANDAMME et al., 1996). Estima-se que mais de 5.000 espécies bacterianas foram identificadas com sucesso baseadas na técnica de hibridização DNA:DNA (ROSSELLÓ-MORA, 2006).

Como todos os métodos, este apresenta algumas limitações, tais como: (i) tempo de resposta demorado, (ii) permite o estudo de poucos grupos, (iii) apresenta elevado nível de erros experimentais, (iv) a reprodutibilidade dos resultados é inexata, (v) não tem capacidade de gerar um banco de dados e, (vi) não é aplicável a organismos não culturáveis (JANDA & ABBOTT, 2002; MEHLEN et al., 2004; OREN, 2004; GEVERS, et al., 2005). Apesar da intensa crítica (LAN & REEVES, 2001; MAYNARD SMITH et al., 2000), a hibridização DNA:DNA ainda é referência para o delineamento de espécies em bacteriologia. Linhagens da mesma espécie apresentam, sob condições controladas de ensaios, pelo menos 70% de hibridização entre seus genomas, conforme definido pelo Comitê Internacional de Sistemática Bacteriana (STACKEBRANDT et al., 2002).

#### **f) Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição amplificados (AFLP)**

Técnicas de DNA *fingerprinting* têm sido descritas como poderosos métodos de tipagem molecular para microrganismos (SWAMINATHAN & GHASSAN, 1993). O RFLP é uma técnica que requer grande quantidade de DNA genômico, sondas de ácidos nucléicos pré-definidas e procedimentos de hibridização laboriosos. A performance do RAPD é sensível a muitos fatores como a seleção de iniciadores, concentração de magnésio no tampão de PCR e ao termociclador usado para a PCR (LIN et al., 1996).

Um novo marcador molecular de planta baseado em PCR, o polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição amplificados (AFLP) supera muitos dos problemas encontrados por RFLP e RAPD. AFLP tem sido utilizado como marcador de estabilidade genética e para localizar genes de resistência a doenças (VOS et al., 1995; THOMAS et al., 1994). Além disso, esta técnica tem sido usada com sucesso para determinar a variabilidade gênica em diversos gêneros de bactérias (McLAUCHLIN et al. 2002; BEN-HAIM et al., 2003; AST et al., 2007; HILL et al., 2007; BUSCONI et al., 2008), já que resulta num arranjo de 30 a 40 fragmentos, alguns dos quais são grupo-específicos e outros estirpe-específicos (JANSSEN et al., 1996). A combinação de diferentes enzimas de restrição e a escolha de nucleotídeos seletivos nos iniciadores para PCR faz do AFLP um excelente sistema para tipagem e determinação do posicionamento taxonômico de microrganismos (LIN et al., 1996; JANSSEN et al., 1996).

Vários estudos independentes mostram uma alta correlação entre a similaridade de padrões de AFLP e de hibridização de DNA:DNA para diversos grupos taxonômicos. Por esse motivo, o AFLP tem sido sugerido como uma alternativa para as hibridizações DNA:DNA (STACKEBRANDT et al., 2002; THOMPSON et al., 2004). Apesar de a técnica de AFLP ser rápida, altamente discriminatória e os resultados serem acumulados em bases de dados locais, a comparação de padrões de AFLP gerados em diferentes laboratórios é muito difícil, comprometendo fortemente a criação de bancos de dados públicos para a identificação de microrganismos.

#### **g) Tipagem por seqüência de múltiplos loci (MLST)**

O uso da tipagem por seqüência de múltiplos loci (*Multi Locus Sequence Typing* - MLST) tem ampliado a visão sobre a biodiversidade e a evolução de bactérias (COHAN,

2002; FEIL et al., 2003) e fungos (O'DONNELL et al., 2004; BALAJEE et al., 2005). Essa técnica originou-se da eletroforese de enzimas, amplamente utilizada por biólogos de populações (CAUGANT, 2003). Esta técnica consiste no seqüenciamento e na análise de fragmentos de 5 a 7 genes conservados, espaçados ao longo do genoma microbiano com pelo menos 100 kb de distância um do outro (MAIDEN et al., 1998). A grande vantagem dessa técnica é que a diferença entre linhagens fica diretamente indexada nas seqüências de DNA. Como esses genes evoluem muito lentamente, tornam-se ideais para estudos de longo tempo. Além disso, seqüências gênicas, diferentemente de padrões de banda (como AFLP), podem ser acumuladas em bases de dados de domínio público e comparadas com facilidade ([www.cria.org.br/cgee/documentos/microtax.doc](http://www.cria.org.br/cgee/documentos/microtax.doc)).

Em uma nova reunião em que foram discutidos a definição e o conceito de espécies em procariontes (GEVERS et al., 2005), concluiu-se que a definição de espécie utilizada atualmente ainda se mostra útil e operacional. Entretanto, houve a sugestão de que novas metodologias sejam desenvolvidas com urgência para suplantar as limitações da hibridização DNA:DNA, 16S DNAr, características fenotípicas e *fingerprints*. A MLST vem sendo fortemente indicada como nova alternativa. Diversos pesquisadores têm sugerido que a definição de espécie seja baseada em seqüências de diversos genes (LA SCOLA et al., 2003; GEVERS et al., 2005; THOMPSON & SWINGS, 2006) pelas características de baixo custo de ensaios, facilidade de construção de bases de dados de acesso público, incorporação de novos dados e recursos de análise computacional.

### **2.1.2 Métodos fenotípicos**

Fenótipo é a expressão do genótipo, e sua observação inclui características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas do organismo. Antes do desenvolvimento das técnicas moleculares, a taxonomia bacteriana foi exclusivamente baseada em estudos comparativos das características fenotípicas (VANDAMME et al., 1996). Os métodos fenotípicos clássicos para tipagem bacteriana incluem a análise de características morfológicas do organismo em diferentes substratos de crescimento, utilização de diferentes fontes de carbono, diferentes condições de NaCl, pH e temperatura, susceptibilidade e produção de antibióticos, atividades enzimáticas, entre outros (VANDAMME et al., 1996). O perfil metabólico pode não ser uma representação acurada da comunidade microbiana, mas certamente gera importantes informações sobre a funcionalidade metabólica das bactérias (SMALLA, 1998). Uma das principais desvantagens dos métodos fenotípicos é o caráter condicional da expressão do gene, onde o mesmo organismo pode mostrar diferentes caracteres fenotípicos em diferentes condições ambientais. Além disso, é preciso notar que características fenotípicas devem ser comparadas com outros conjuntos de dados encontrados em estirpes relacionadas. Entretanto, a reprodutibilidade destes resultados entre os diferentes laboratórios tem sido um problema constante, sendo necessário utilizar procedimentos muito bem padronizados durante a execução dos testes (On SLW & HOLMES, 1991).

Com o advento da taxonomia numérica (SNEATH & SOKAL, 1962) e o surgimento da computação, dados fenotípicos começaram a ser analisados por coeficientes numéricos que expressam similaridade entre linhagens com o auxílio de um computador. Sem dúvida, a taxonomia numérica proporcionou maior objetividade aos esquemas de classificação microbiana. A abordagem pressupunha a utilização de um grande número de testes bioquímicos (100 a 200) e uma amostragem grande e diversificada de linhagens, sendo os resultados expressos em porcentagens (VANDAMME et al., 1996).

### **2.1.3. Métodos quimiotaxonômicos**

O termo quimiotaxonomia refere-se à aplicação de métodos analíticos que obtenham informações sobre diferentes produtos químicos constituintes ou marcadores

quimiotaxonômicos das células bacterianas, a fim de agrupá-los ou organizá-los em diferentes níveis (VANDAMME et al., 1996; ROSSELLÓ-MORA & AMANN, 2001). O princípio da quimiotaxonomia baseia-se na distribuição desigual de marcadores entre diferentes grupos microbianos. Os métodos mais comumente usados incluem composição da parede celular/membrana como peptidoglicanos, ácidos, lipídeos polares, composição de ácidos graxos, lipopolissacarídeos, quinonas e poliaminas (SCHLEIFER & KANDLER, 1972; BUSSE & AULING, 1988), dentre outros.

A riqueza de informações contidas nos ácidos graxos, por exemplo, pode ser tanto qualitativa (usualmente em nível de gênero), quanto quantitativa (em nível de espécie). Como os caminhos bioquímicos para análise de ácidos graxos são conhecidos, várias relações podem ser estabelecidas entre diferentes organismos. Kunitsky et al. ([www.store.pda.org/bookstore/tableofcontents/ermm\\_v3\\_ch01.pdf](http://www.store.pda.org/bookstore/tableofcontents/ermm_v3_ch01.pdf)) afirmam que a composição de ácidos graxos é altamente conservada geneticamente, e assim, um mesmo gênero e espécies de bactérias, em condições semelhantes, terão similaridade bem elevada da composição de ácidos graxos.

Ácidos teicóicos são polímeros de glicerol e são especificamente utilizados para caracterizar bactérias Gram-positivas. Quinonas que pertencem a uma classe de lipídios terpenóides são componentes de membrana plasmática bacteriana e são valiosos na sistemática microbiana. A análise destes compostos, utilizando diferentes técnicas de cromatografia, pode delinear com êxito as bactérias até a classificação de gênero (BISHOP et al., 1962).

Todas as técnicas utilizadas na classificação e sistemática têm suas vantagens e limitações, por isso, a combinação de diferentes métodos tem sido o melhor caminho para o entendimento sobre diversidade, filogenia, ecologia, evolução e taxonomia do maior grupo de organismos vivos da Terra – os procariotos.

## 2.2 O Gênero *Sphingomonas*

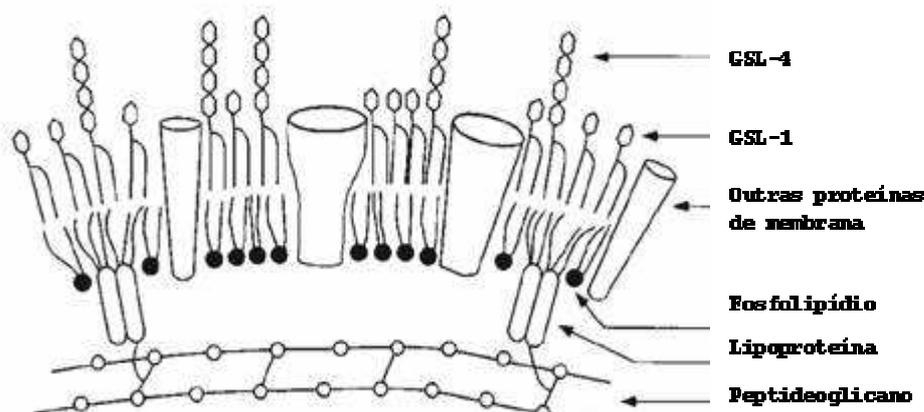
### a) Descrição do gênero

Yabucchi et al. em 1990 transferiram a espécie *Pseudomonas paucimobilis* (previamente conhecida como CDC grupo IIK-2) para o novo gênero *Sphingomonas*, com a estirpe-tipo, *S. paucimobilis*. O gênero foi expandido e inclui, atualmente, cerca de 54 espécies. As bactérias do gênero *Sphingomonas* apresentam como características: pertencem à subclasse  $\alpha$ -proteobacteria; são Gram-negativas; não formadoras de esporos; apresentam células com formato de bastão ou cocobacilos retos ou curvos; diâmetro celular de aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$ ; reprodução por fissão binária; divisões celulares assimétricas; de modo geral, as espécies não apresentam flagelos, com algumas exceções; metabolismo estritamente aeróbico com o oxigênio comoceptor final de elétrons; algumas espécies produzem bacterioclorofila a; a coloração das colônias é predominantemente amarela, com variação de tonalidade de espécie para espécie e de acordo com os meios de cultura utilizados e tempo de incubação (YABUCCHI & KOSAKO, 2005). A característica amarela das colônias é devido ao carotenóide nostoxantina, diferente de xanthomonadina que é produzido por *Xanthomonas* spp. (JENKINS & STARR, 1985).

Todos os membros deste gênero apresentam uma composição de membrana diferenciada dos procariotos, com sphingoglicolipídeos (GSL) dos tipos GSL-1 ou GSL-4 (Figura 3), em papel análogo àquele dos lipopolissacarídeos nas bactérias Gram-negativas (KAWASAKI et al., 1994; KAWAHARA et al., 2000). KAWAHARA et al. (1999) chegaram a conclusão que os GSL, usualmente presente em membranas de células eucarióticas, são os maiores componentes da membrana de bactérias do gênero *Sphingomonas*. De acordo com estas informações, alguns autores têm especulado algum tipo de relação entre bactérias deste gênero e organismos superiores (IKUSHIRO et al., 2001; GIAVASIS et al., 2000). HEUNG

et al. (2006) relatam que estes compostos atuam como moléculas sinalizadoras em muitas funções celulares e têm papel crucial na regulação de processos patogênicos em células humanas. Em outros eucariotos como fungos, shingolipídeos têm sido relacionados com estresse de temperaturas elevadas (JENKINS et al., 1979), endocitoses (ZANOLARI et al., 2000), transdução de sinais (OBEID et al., 2002) e patogenicidade (CHENG et al., 2003).

Em bactérias, a funcionalidade destas moléculas ainda é desconhecida, entretanto, Kawahara et al., (1999) sugerem que a superfície celular hidrofóbica destas bactérias é conveniente para a utilização de compostos aromáticos e sobrevivência em nichos ecológicos diversificados.



**Figura 3.** Modelo da membrana celular de *Sphingomonas paucimobilis*. Fonte: adaptado de Kawahara et al., 1999.

### **b) Taxonomia e relações filogenéticas**

O gênero *Sphingomonas* foi nomeado por Yabuchi et al. (1990) devido à presença de sphingoglicolípídeo específico contendo ácido glucurônico (YAMAMOTO et al., 1978). Este composto foi inicialmente encontrado em lipídeos celulares de uma estirpe de *Flavobacterium devorans* (ZIMMERMANN, 1890), que posteriormente foi reclassificada para *Pseudomonas paucimobilis* (YABUCCHI et al., 1979).

Embora o seqüenciamento de seu genoma ainda seja incompleto (BALKWILL et al., 2006), baseados em resultados de análises filogenéticas do gene 16S DNAr e presença de sphingoglicolípídeo nos lipídeos celulares das estirpes tipo, os gêneros *Rhizomonas* (Van BRUGGEN et al., 1990), *Blastomonas* (HIRAISHI et al., 2000) e *Erythromonas* (YURKOV et al., 1997) apresentam relações mais estreitas com *Sphingomonas* spp..

A similaridade das seqüências de 16S DNAr das estirpes tipo das espécies de *Sphingomonas* e *S. paucimobilis* – estirpe-tipo do gênero – encontra-se entre 98 e 91%. Devido ao rápido aumento do número de espécies, a diversidade de habilidade metabólica e a distribuição de organismos em vários nichos ecológicos, a definição de espécies do gênero *Sphingomonas* através da análise filogenética da seqüência de nucleotídeo do gene 16S DNAr tem sido subjetiva (TAKEUCHI et al., 2001; HIRAISHI et al., 2000; STOLZ et al., 2000). De acordo com os resultados encontrados durante análises filogenéticas de bactérias deste gênero, Takeuchi et al. (2001) propuseram a separação do gênero *Sphingomonas* em 4 gêneros, *Sphingomonas*, *Sphingobium*, *Novosphingobium*, e *Sphingopyxis*. Estes gêneros se diferem principalmente pela composição de ácidos graxos celulares, utilização do homospermidina como a poliamina principal e regiões do gene 16S DNAr.

De acordo com o avanço das técnicas moleculares, muitas espécies têm sido reclassificadas como, por exemplo, *Rhizomonas suferifaciens* (*Sphingomonas suferifaciens*), *Blastomonas natatoria* e *B. ursincula* (*S. natatoria* e *S. ursincula*) (YABUCCHI et al., 1999). De forma geral, estes autores concluíram que a definição do gênero e espécies de *Sphingomonas* não deve ser delineada somente por análises filogenéticas, mas também ser distinguidos pela combinação de testes fenotípicos e quimiotaxonômicos.

### c) Interação com plantas

Microrganismos associados a plantas têm atraído a atenção por apresentarem características que influenciam direta ou indiretamente o desenvolvimento das plantas com as quais se associam (GLICK, 1995; DOBBELAERE et al., 2003). Estímulos diretos incluem fixar nitrogênio, promover antibioses, aumentar a absorção de água e nutrientes pela planta, aumentando a superfície exploratória das raízes ou solubilizando compostos inorgânicos, produzir fitohormônios e vitaminas, inibir a síntese de etileno (DOBEREINER et al., 1992; AYYADURAI et al., 2006; NOEL et al., 1996; UNNO et al., 2005; GUNARTO et al. 1999; GLICK, 1995). Muitas espécies de bactérias têm mostrado potencial na promoção do crescimento vegetal como *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sphingomonas*, entre outras.

*Sphingomonas* são bactérias de vida livre encontradas em ambientes naturais e antropogênicos. Estirpes deste gênero têm sido isoladas de uma variedade de ambientes, incluindo solos contaminados com produtos químicos, sedimentos, água de rios e oceanos, ambientes alcalinos, tecidos vegetais, hospitais, e associados a doenças de plantas e humanos (YABUCCHI & KOSAKO, 2005). Sua distribuição em diversos ambientes é decorrente da sua habilidade de utilizar uma larga escala de compostos orgânicos como fonte de carbono (YABUUCHI & KOSAKO, 2005) e sobreviver sob condições de nutrientes limitadas (OHTA et al., 2004).

Algumas espécies deste gênero são associadas com plantas e têm apresentado grande número de isolados nos tecidos vegetais como folhas, flores e sementes de diversas famílias botânicas, inclusive em poáceas como arroz (KAWAHARA et al., 1994; KIM et al., 1998; RIVAS et al., 2004; HASHIDOKO et al., 2005; MANO et al., 2006; XIE & YAKOTA, 2006; WARTIAINEN et al., 2008). Dentre as espécies deste gênero relacionadas a tecidos vegetais encontram-se *Sphingomonas paucimobilis*, isolada de palmeiras e culturas agrícolas (FERNANDES et al., 2001); *S. trueperi*, plantas de arroz; *S. asaccharolytica* e *S. mali*, raízes de *Malus* spp. (TAKEUCHI et al., 1995); *S. melonis*, frutos de *Cucumis melo* (BUONAURIO et al., 2002); *S. pruni*, raízes de *Prunus persia* (TAKEUCHI et al., 1995); *S. rosa*, raízes de *Rosa* sp; *S. roseiflava*, espiga de *Setaria viridis* e outras poáceas (YUN et al., 2000); *S. suberifaciens*, raízes de *Lactuca sativa* (Van BRUGGEN et al., 1990); *S. yanoikuyae*, raízes de *Ardisia crispa* e *Psychotria nairobiense* (YABUUCHI et al., 1990); *S. phyllosphaerae*, filosfera de *Acacia caven* (RIVAS et al., 2004) e *S. azotifigens*, raízes de arroz (XIE & YAKOTA, 2006).

É possível que a adesão destas bactérias ao filoplano das espécies vegetais seja tolerante à radiação UV, estando esta adaptação intimamente ligada com a sua capacidade de formar biofilmes (MORRIS, et al., 1998; ELASRI & MILER, 1999). Com a capacidade de permanecer aderida aos tecidos vegetais por longos períodos, estes autores acreditam que estas bactérias consigam infectar as sementes e se dispersar ao longo da parte aérea das plântulas, tornando-se endofíticas. Recentemente, Hashidoko et al. (2006) e Mano et al. (2006) isolaram bactérias do gênero *Sphingomonas* não somente da palha, mas também de sementes de arroz esterelizadas superficialmente.

Embora uma quantidade significativa de espécies tenha sido encontrada em tecidos vegetais, informações sobre os benefícios gerados por esta interação são escassos. A

existência de um grande número de *Sphingomonas* spp.. em folhas, flores e sementes de diferentes plantas sugere uma associação mutualística entre ambos.

#### **d) *Sphingomonas* spp. em plantas de arroz**

Um dos primeiros relatos da interação de bactérias do gênero *Sphingomonas* e plantas de arroz foi feito por Iizuka em 1960. Este autor verificou um elevado número de bactérias com pigmento amarelo em sementes de arroz e sugeriu que haveria uma relação direta entre o número destas bactérias e a germinação das sementes. Posteriormente, Kim et al. (1998) em estudos de população de espécies de *Sphingomonas* em superfície de plantas, também relataram a presença de uma grande quantidade de bactérias com pigmento amarelo em sementes de arroz, identificando-as como membros do gênero *Sphingomonas*. Estes mesmos autores também verificaram a presença destas bactérias em flores e folhas de outras famílias botânicas. Embora estes trabalhos indiquem que existe um efeito positivo de bactérias deste gênero em associação com sementes de arroz, não foi possível determinar o tipo de estímulo gerada por esta interação.

Em um estudo de bactérias fixadoras de nitrogênio do solo, Anderson (1955) descreveu um novo diazotrófico conhecido como "*Pseudomonas azotocolligans*". Entretanto, Hill & Postgate (1969) demonstraram que esta bactéria não era fixadora de nitrogênio, sendo posteriormente reclassificada como *Sphingomonas trueperi* por Kämpfer et al. (1997). Apesar da estirpe tipo desta espécie não ser considerada fixadora de nitrogênio, Adhikari et al. (2001) identificaram a presença do gene *nifD* em um isolado de arroz identificado como *S. trueperi*, mas não conseguiram detectar a atividade da nitrogenase ao utilizar a técnica de redução de acetileno (ARA).

Em 2001, Fernandes et al., estudando bactérias diazotróficas em raízes e folhas de coqueiros cultivados em região de baixada litorânea de Sergipe, identificaram *S. paucimobilis* com atividade da nitrogenase determinada através da técnica de ARA, em cultura pura. Da mesma forma, outros autores relatam isolados diazotróficos de *S. paucimobilis* na rizosfera de arroz (ENGELHARD et al., 2000), milho e sorgo (HEBBAR et al., 1992) e sementes de arroz (MANO et al., 2006).

Oyaizu-Masuchi & Komagata (1988) reportaram o isolamento de bactérias de vida livre, fixadoras de nitrogênio da rizosfera e raízes de plantas de arroz. Estes isolados foram classificados em diferentes grupos baseados nas características fenotípicas e quimiotaxonômicas. Posteriormente, Takeuchi et al. (2001), através da análise da sequência de nucleotídeos do gene 16S DNAr, identificaram alguns destes isolados como membros do gênero *Sphingomonas*. Em 2006, Xie & Yokota baseados nos resultados obtidos por Oyaizu-Masuchi & Komagata (1988) e Takeuchi et al. (2001), juntamente com novas informações, propuseram uma nova espécie, *S. azotifigens*. Esta bactéria foi descrita, efetivamente, como a primeira espécie fixadora de nitrogênio do gênero *Sphingomonas*. A capacidade de fixação de N foi determinada através da detecção do gene *nifH* e a atividade da nitrogenase, pela técnica de ARA (XIE & YOKOTA, 2006).

#### **e) Síntese de fitohormônios**

Recentemente, metabólicos secundários, que são especialmente produzidos por bactérias, têm mostrado grande importância na biotecnologia, beneficiando o crescimento, desenvolvimento e produtividade de muitas plantas. Um grupo destes metabólicos secundários são os fitohormônios, produzidos não só por plantas superiores (DAVIES, 1995; FUJII et al., 2007; RUZICKA et al., 2007), mas por líquens e musgos (ERGUN et al., 2002), fungos (TSAVKELOVA et al., 2003) e bactérias (MARTINEZ-MORALES et al., 2003; PEDRAZA et al., 2004; KHALID et al., 2004, RADWAN et al., 2005; MEHNAZ & LAZAROVITS, 2006; SPAEPEN et al., 2007).

A síntese dos fitohormônios por bactérias associadas a plantas é uma das formas mais importantes de interação planta-bactéria (COSTACURTA & VANDERLEYDEN, 1995; KAMNEVA et al., 1999; SPAEPEN et al., 2007). Auxinas são reconhecidas como o principal hormônio vegetal encontrado na natureza, sendo o ácido 3-indolacético (AIA) o composto mais ativo e produzido (RADWAN et al., 2005). Esta substância é responsável pela divisão, expansão e diferenciação de células e tecidos vegetais, principalmente nas raízes (WOODWARD & BARTEL, 2005; TEALE et al., 2006), além de apresentar influência direta na germinação de sementes (MEHNAZ & LAZAROVITS, 2006; TSAVKELOVA et al., 2007).

A produção de AIA é difundida entre as bactérias, e sua biossíntese é realizada por espécies simbióticas dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Nostoc*, e bactérias associativas como *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas* (CACCIARI et al., 1989; RADWAN et al., 2005; MEHNAZ & LAZAROVITS, 2006). Acredita-se que cerca de 80% das bactérias isoladas de rizosfera e tecidos vegetais são capazes de produzir auxina (COSTACURTA & VANDERLEYDEN, 1995). Recentemente, Spaepen et al. (2007) relataram que as bactérias utilizam os fitohormônios na interação com plantas como estratégia de colonização, promovendo a fitoestimulação e contornando o mecanismo de defesa basal das plantas. Desta forma, AIA produzido pelas bactérias pode ser considerada uma molécula sinalizadora essencial na interação planta-bactéria, e na interação com outras bactérias que ocupam o mesmo nicho (SPAEPEN et al., 2007).

Tsavkelova et al. (2003, 2005, 2007) revelaram a abundância de diferentes bactérias colonizando raízes e parte aérea de orquídeas. Algumas destas bactérias produziram AIA em concentrações significativas, e bioensaios confirmaram a atividade de AIA microbiana. Os resultados apresentados por Tsavkelova et al. (2005, 2007) mostraram que o tratamento de plantas de feijão com suspensão bacteriana aumentou significativamente a formação e volume de raízes, assim como a germinação de sementes de orquídeas. Dentre as bactérias produtoras de AIA isoladas de plantas de orquídeas, a estirpe identificada como *Sphingomonas* spp. (AM498043) apresentou os resultados mais promissores na produção de AIA e influência na germinação de sementes e desenvolvimento da plântula (TSAVKELOVA et al., 2007).

#### **f) Produção de exopolissacarídeos**

De acordo com Ogita et al. (2006), *Sphingomonas* spp. desempenham um papel de apoio ao desenvolvimento da comunidade de microflora sob condições adversas do solo. Estes autores relataram que a estirpe de *Sphingomonas* EC-K085 foi capaz de produzir um tipo de polímero - (R, R, R, R)-3-hydroxybutyrate (HB4) - caracterizado como um fator de promoção de crescimento para bactérias do gênero *Frateuria*. Além do favorecimento do cultivo de *Frateuria*, Tanaka et al. (2004) relataram que uma estirpe de *Sphingomonas* (GF9) isolada de lodo ativado foi capaz de proporcionar o cultivo de *Catellibacterium nectariphilum*, descrita originalmente como bactéria não-cultivável.

HB4 é um polímero sinônimo de Poli-beta-hidroxibutirato (PHB), ou seja, poliésteres acumulados por microrganismos na forma de grânulos intracelulares, produzidos geralmente em condições de pouca disponibilidade de nutrientes (HANZLIKOVA et al., 1985). O acúmulo deste composto se inicia na fase estacionária do crescimento microbiano, podendo ser utilizado posteriormente como fonte de carbono e energia (LEE, 1996). Anderson & Dawas (1990) relataram que sob condições limitadas de nitrogênio e na presença de fontes de carbono, algumas bactérias podem acumular de 60 a 80% de seu peso em PHB. Estas informações corroboram com o fato de que este é o polímero bacteriano mais representativo em muitas bactérias fixadoras de nitrogênio de vida livre e simbióticas (OGITA et al., 2006; CASTELLANE & LEMOS, 2007).

Além deste polímero, bactérias do gênero *Sphingomonas* são estudadas na produção de exopolissacarídeos (EPS) para utilização industrial (BERWANGER et al., 2007). As estruturas de exopolissacarídeos relatadas são conhecidas como “sphingans” (POLLOCK, 1993). Industrialmente, estes EPS podem ser adicionados em vários produtos, especialmente em leites fermentados, atuando como agentes de viscosidade, estabilizantes, emulsificantes ou geleificantes (MAUGERI, 2001; RUAS-MADIEDO et al., 2002). Além disso, determinados EPS produzidos são também requeridos devido aos efeitos fisiológicos para o indivíduo, contribuindo na formação de agregados celulares bacterianos e no reconhecimento e adesão a superfícies, facilitando a colonização de vários ambientes e formação de biofilmes (De VUYST & DEGEEST, 1999; DUBOC & MOLET, 2001).

#### **g) Biorremediação**

Embora muitas espécies de *Sphingomonas* sejam isoladas de ambientes relativamente limpos, a grande maioria tem sido descoberta em ambientes contaminados. Muitos artigos tem sido publicados sobre as vias de degradação aeróbia por estirpes de diferentes espécies de *Sphingomonas*. A maioria das espécies que se encontram associadas a ambientes contaminados tem habilidade em degradar uma variedade de poluentes, tais como inseticidas (NAGATA et al., 1999), compostos recalcitrantes (DAVISON et al., 1996), herbicidas (KOHLE, 1999), fenóis clorados (CASSIDY et al., 1999), dibenzofurum (KIM et al., 2004), além de utilizar hidrocarbonetos policíclicos aromáticos como fonte de carbono e energia (LEYS et al., 2004). Em um estudo realizado por Nishiyama et al. (1992), *S. paucimobilis* degradou hexaclorociclohexano para sobreviver e crescer no solo contaminado, especialmente dentro dos agregados do solo com menos de 0,025 milímetros de diâmetro. Esta bactéria manteve uma densidade de população mais elevada na presença do contaminante do que em sua ausência. Estas descobertas demonstram que estirpes de *Sphingomonas* spp. podem utilizar contaminantes orgânicos como fonte do crescimento e energia (THOMAS et al., 2000), sendo extremamente úteis na biorremediação de ambientes contaminados.

Além de degradar uma grande variedade de compostos, estirpes de *Sphingomonas* têm sido relatadas em biosorção de metais pesados. Em estudos de biosorção de cádmio por *S. paucimobilis*, foi verificado que as células da estirpe utilizada foram capazes de remover o cádmio do ambiente com eficiência relativamente elevada, dependendo do pH da solução e concentração do sorvente (TANGAROMSUK et al., 2002).

O gênero *Sphingomonas* tem sido encontrado em plantas, especialmente da família *Poaceae*, colonizando suas superfícies e o interior de seus tecidos sem causar danos aparentes. Diferentemente da associação *Rhizobium*-leguminosa, sua associação parece ser mais descentralizada, apresentando bactérias dispersas em toda a planta. Considerando a diversa funcionalidade destas bactérias, seja pela fixação biológica de nitrogênio, produção de fitohormônios e exopolissacarídeos, e os demais aspectos discutidos nesta revisão, vislumbra-se que a utilização biotecnológica deste gênero torna-se altamente promissora na agroindústria.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Origem dos Isolados

Durante o trabalho de tese de Rodrigues (2003), que tinha por objetivo o isolamento de bactérias diazotróficas do gênero *Herbaspirillum* de plantas de arroz, foram obtidos 82 isolados de colônias amarelas em meio Batata (Anexo A) que se diferenciavam do gênero *Herbaspirillum* e dos demais gêneros de diazotróficos isolados com maior frequência. O isolamento destas bactérias foi feito de acordo com a metodologia descrita por Döbereiner et al. (1995), no Laboratório de Gramíneas da Embrapa Agrobiologia. A origem de cada isolado está descrita na Tabela 1.

As bactérias estavam armazenadas em tubos com meio Batata sólido inclinado sob condições ambiente. Na reativação dessas bactérias, as mesmas foram inoculadas, com o auxílio da alça de platina para meio DYGS líquido (Anexo A) e em seguida incubados a 30 °C, por período de 24 horas sob agitação constante de 150 rpm. Após 24 horas de cultivo foi retirada uma alíquota do líquido e estriada em uma placa de Petri contendo meio DYGS sólido, a qual foi incubada em estufa sob temperatura de 30 °C por um período de 48 horas. Então, foi feita verificação da pureza das culturas.

**Tabela 1.** Origem dos isolados bacterianos provenientes de duas cultivares de arroz plantados em dois solos distintos; isolamento feito por Rodrigues (2003).

Isolados	Origem dos Isolados		
	Cultivar de Arroz	Solo	Parte da Planta
62, 63, 64, 65, 66, 96	IAC4440	GO	RL <sup>1</sup>
67, 68, 169, 170, 171, 192, 252	IAC4440	GO	RE <sup>2</sup>
69, 193, 246	IAC4440	GO	PA <sup>3</sup>
71, 172, 173	IAC4440	RJ	RL
73, 74, 97, 98, 174, 175, 176, 194, 247	IAC4440	RJ	RE
75, 76, 77, 78, 79, 99, 100, 101, 102, 177, 248	IAC4440	RJ	PA
80, 81, 82, 83, 103, 104, 178, 179, 180, 195	IR42	GO	RL
84, 85, 105, 181, 182, 233	IR42	GO	RE
86, 87, 88, 89, 90, 106, 107, 183, 184, 185, 186, 187	IR42	GO	PA
91, 92, 93, 108, 109, 110, 111, 188, 189, 196, 197	IR42	RJ	RL
94, 95, 190, 191	IR42	RJ	PA

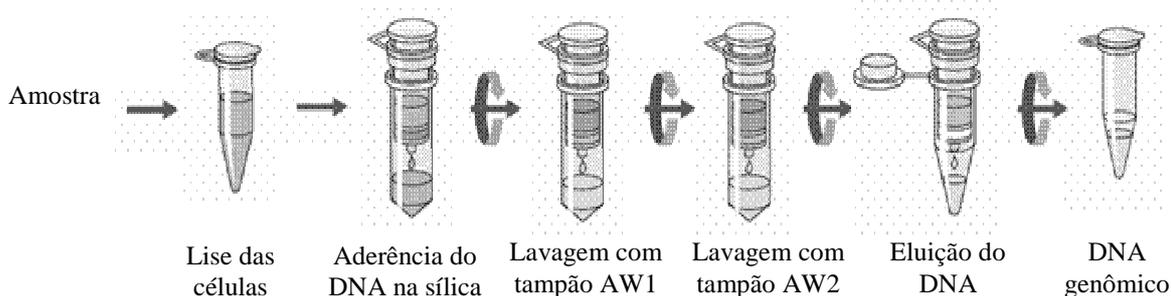
1 - RL: Raiz Lavada; 2 - RE: Raiz Esterilizada superficialmente; 3 - PA: Parte Aérea; GO – solo proveniente do Estado de Goiás; RJ – solo proveniente do Estado de Rio de Janeiro.

Um novo estoque em glicerol 50% foi feito para cada uma das estirpes. Inicialmente as colônias individuais obtidas das placas de Petri foram coletadas e reinoculadas em meio DYGS líquido, permanecendo sob temperatura de 30°C por 24 horas com agitação constante a 150 rpm. Posteriormente uma alíquota de 2 ml da cultura de bactérias foi transferida para um microtubo e procedeu-se uma centrifugação a 8.000 rpm por 15 minutos. Ao precipitado foi adicionado 500 µl de glicerol 50% estéril e estes estocados em freezer – 20°C.

### 3.2 Extração de DNA Genômico

O DNA genômico foi extraído de células bacterianas cultivadas em meio líquido DYGS por 24 horas. A extração do DNA foi feita utilizando o Kit MiniKit QUIamp DNA<sup>®</sup> (QIAGEN<sup>®</sup>) de acordo com as recomendações do fabricante (Figura 4).

A quantificação e qualificação do DNA genômico foi feita por eletroforese em gel de agarose a 1% segundo Sambrook & Russell (2001). Um  $\mu\text{l}$  de cada amostra de DNA e diferentes concentrações conhecidas de DNA lambda, juntamente com 2  $\mu\text{l}$  de tampão da amostra (0,25% de azul de bromofenol e 40% de sacarose) foram submetidos a uma voltagem de 100 volts por 2 horas em tampão TAE 1X (0,04 M Tris acetato e 1 mM de EDTA). Em seguida, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo ( $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) e visualizado sob luz ultravioleta em fotodocumentador Kodak Logic 100 (Kodak<sup>®</sup>).



**Figura 4.** Representação esquemática das etapas de extração do DNA genômico utilizando o QUIamp Minikit. Fonte: Manual de instruções do Kit MiniKit QUIamp DNA fornecido pelo fabricante.

### 3.3 Identificação de Bactérias Diazotróficas

#### a) Atividade de redução de acetileno (ARA)

A atividade da nitrogenase dos isolados foi avaliada pelo método de redução de acetileno (BODDEY et al., 1990), utilizando frascos de vidro (volume de 10 ml) contendo 5 ml de meio LGI semi-sólido (Anexo A). Estes frascos foram inoculados com 20  $\mu\text{l}$  de bactérias previamente cultivadas em meio LGI líquido e incubados sob temperatura de 30°C. Após a formação da película os frascos foram fechados com rolhas de borracha perfurável do tipo *sub-seal* e 10% da capacidade do frasco foi injetado com acetileno e estes incubados por 1 hora a 30°C. Posteriormente, 0,5 ml da fase gasosa do frasco foi introduzida no cromatógrafo de gás com ionização de chama, Perkin Elmer modelo F11, utilizando uma coluna Poropak N de 50 cm a 40°C.

Após leitura de ARA, os frascos foram submetidos ao agitador de mesa para tubos de ensaio até a completa homogeneização da película e o meio de cultura. Uma alíquota de 100  $\mu\text{l}$  da amostra homogeneizada foi colocada em tubos de ensaio, contendo 400  $\mu\text{l}$  de água destilada estéril e 500  $\mu\text{l}$  de NaOH 1M para lisar as células e posteriormente aquecidos por 5 minutos a 100°C para extração das proteínas totais e desnaturação do ágar. Em seguida, foram adicionados 2,5 ml do reagente de Lowry (pH 7,0), contendo uma mistura de 50 ml de solução de carbonato de sódio 5%, 1 ml de solução de tartarato de sódio e potássio 20 % e 1 ml de solução de sulfato de cobre 1% . Os tubos foram agitados no vortex e incubados por 10 minutos no escuro. Então, 500  $\mu\text{l}$  do reagente de Folin-Ciocalteu 1M, diluído 3X, foi adicionado a mistura e, em seguida, os tubos foram incubados no escuro por 30 minutos. Após incubação foi feita a leitura de absorbância a 750 nm em espectrofotômetro (LOWRY et al., 1951). Como controle (branco) foram utilizadas amostras contendo 100  $\mu\text{l}$  de meio de cultivo semi-sólido LGI, submetidos ao mesmo tratamento descrito anteriormente.

A concentração de proteínas foi determinada usando-se a curva padrão obtida pelos valores de absorvância das quantidades conhecidas da proteína Albumina Bovina nas seguintes concentrações: 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .

### b) Amplificação do gene *nifH*

Um fragmento de aproximadamente 390 pb do gene *nifH* (que codifica a Fe-proteína da nitrogenase) foi amplificado a partir do DNA extraído conforme descrito no item 3.2, usando o par de iniciadores degenerados descritos por Ueda et al. (1995) (Tabela 2). Cada reação de amplificação com volume final de 50  $\mu\text{l}$  foi composta de 50 ng de DNA genômico; tampão 1X; 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ ; 200 mM de cada dNTP; 0,12  $\mu\text{M}$  de cada iniciador e 1 U da enzima Taq DNA polimerase. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador PTC 100 (MJ Research). Os ciclos de amplificação constituíram-se de uma etapa de desnaturação a 94°C por 1 minuto, uma etapa de anelamento 50°C por 1 minuto e uma etapa de extensão a 72°C por 1 minuto. Depois de 35 ciclos, foi efetuada uma última etapa de extensão a 72°C por 4 minutos.

**Tabela 2.** Iniciadores utilizados nas reações de amplificação do gene *nifH* e respectivas seqüências de nucleotídeos.

Iniciador	Seqüência 5'→3'	Referência
19f	GCI WTY TAY GGI AAR GGI GG	UEDA et al., 1995
407r	AAI CCR CCR CAI ACI ACR TC	

### c) Eletroforese em gel de agarose 1%

Após a reação de amplificação, os produtos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1% segundo Sambrook & Russell (2001). 5  $\mu\text{l}$  de cada amostra, juntamente com 2  $\mu\text{l}$  de tampão da amostra foram submetidos a uma voltagem de 80 volts por 2 horas em tampão TAE 1X. Em seguida, o gel foi corado com solução de brometo de etídeo (0,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) e visualizado sob luz ultravioleta em fotodocumentador Kodak Logic 100 (Kodak®) para avaliação do produto amplificado com relação ao sucesso da reação, tamanho e concentração aproximada.

### d) Seqüenciamento do fragmento amplificado

Para o seqüenciamento do fragmento do gene *nifH* dos isolados bacterianos, foram utilizados 300 ng dos produtos de PCR purificados, 5,0  $\mu\text{M}$  de cada iniciador (Tabela 2), 4  $\mu\text{l}$  do Kit de seqüenciamento *Dye-terminator* (DYEnamic ET, Amersham Biosciences) e água ultrapura (ultraPURE<sup>TM</sup>, Invitrogen Co.) para um volume final de 20  $\mu\text{l}$ . Os ciclos de amplificação constituíram-se de uma etapa de desnaturação a 95°C por 20 segundos, uma etapa de anelamento 50°C por 15 segundos e uma etapa de extensão a 60°C por 1 minuto. Depois de 30 ciclos, foi efetuada uma última etapa de extensão a 72°C por 4 minutos. Após a reação de seqüenciamento, as amostras foram precipitadas adicionando 1,0  $\mu\text{l}$  de acetado de amônio 7,5 M e 27,5  $\mu\text{l}$  de etanol 70% e incubadas a 4°C por uma noite. Posteriormente à incubação, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 30 minutos sob temperatura de 4°C. O sobrenadante foi então descartado e o precipitado foi lavado com 150  $\mu\text{l}$  de etanol 70% e centrifugado novamente a 14.000 rpm por 5 minutos a 4°C. As amostras foram secas ao ar, ressuspendidas em 7,5  $\mu\text{l}$  de tampão de corrida e analisadas em seqüenciador automático MegaBACE 1000 (Amersham Biosystem). As seqüências contíguas foram montadas a partir das seqüências diretas e reversas utilizando-se os programas PHRED/PHRAP ou CAP3/CONSED em ambiente Linux pelo setor de bioinformática da Embrapa Agrobiologia.

### e) Análise de similaridade e filogenia

A pesquisa por similaridade foi realizada no Genbank, pelo programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) com as seqüências contíguas possuindo em média 300 pb. O programa MegaBLAST (ZHANG et al., 2000), cuja comparação se dá pela pesquisa contra banco de dados de nucleotídeos NCBI, foi utilizado para fazer as comparações. Para a construção da árvore filogenética, as seqüências foram alinhadas usando o programa CLUSTAL W (THOMPSON et al., 1994). A árvore baseada na comparação de aproximadamente 250 pb foi construída usando o método *Neighbor-Joining* (SAITOU & NEI, 1987). A topologia da árvore filogenética foi avaliada pelo método de *bootstrap* com 1000 repetições (FELSENSTEIN, 1985). A distância evolucionária foi computada usando o método *Kimura 2-parameter* (KIMURA, 1980) e a análise filogenética foi conduzida no programa MEGA4 (TAMURA et al., 2007).

## 3.4 Avaliação da Diversidade dos Isolados

### 3.4.1 Análise de restrição dos fragmentos amplificados (ARDRA)

#### a) Amplificação do gene 16S DNAr

Para a amplificação do fragmento, foi utilizada a combinação de iniciadores 27f e Amp2 (Tabela 3). Cada reação de amplificação com volume final de 50 µl foi composta de 50 ng de DNA genômico; tampão 1X; Tween 20, 1,25X; 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 200 mM de cada dNTP; 2 U de Taq DNA polimerase e 0,5 pmol de cada iniciador. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador PTC 100 (MJ Research). Os ciclos de amplificação constituíram-se de uma etapa de desnaturação a 93°C por 45 segundos, uma etapa de anelamento a 62°C por 45 segundos e uma etapa de extensão a 72°C por 2 minutos. Ao final de 35 ciclos, foi efetuada uma última etapa de extensão a 72°C por 5 minutos. Ao final da reação os produtos de PCR foram analisados em eletroforese em gel de agarose conforme descrito no item 3.3 (c).

**Tabela 3.** Iniciadores utilizados nas reações de amplificação para amplificação do gene 16S DNAr.

Iniciador	Seqüência 5'→3'	Referência
27f	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	FURUSHITA et al., 2003
Amp2	AAG GAG GTG ATC CAR CCG CA	WANG et al., 1993

#### b) Análise de restrição

As enzimas foram selecionadas com base na análise da seqüência do gene 16S DNAr de espécies bacterianas do gênero *Sphingomonas* depositadas no banco de dados, realizada pelo programa de análise de DNA pDRAW 32.

De um total de 50 µl do produto amplificado, 5 µl foram digeridos separadamente a 37°C por 2 horas, utilizando-se 10 U das enzimas de restrição *Hinf*I, *Hind*III, *Rsa*I (Gibco BRL®), *Mbo*I, *Hae*III e *Hha*I (Invitrogen™) (Tabela 4) e tampão correspondente 1X. Ao final da digestão, os produtos foram separados em eletroforese em gel de agarose 3 % em tampão TAE 1X. Todo o volume da amostra, juntamente com 4 µl de tampão de amostra, foram submetidos a uma voltagem de 50 volts por 4 horas. Em seguida, o gel foi corado conforme descrito no item 3.3 (c).

#### c) Análise dos perfis de restrição

A imagem foi analisada com o programa GelCompar II (*Molecular Analyst Programa Fingerprinting Plus*; Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.). O perfil de bandeamento foi

usado para construir um dendrograma usando o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetical Averages*) (SNEATH & SOKAL, 1962) e os coeficientes de correlação de Pearson e Jaccard.

**Tabela 4.** Sítios de restrição das endonucleases utilizadas para digestão de produtos de PCR da região 16S DNAr dos isolados e estirpes-tipo de *Sphingomonas*.

Endonuclease	Sítios de restrição	Endonuclease	Sítios de restrição
<i>HhaI</i>	5'-G C G <sup>^</sup> C-3' 3'-C <sup>^</sup> G C G-5'	<i>MboI</i>	5'- <sup>^</sup> G A T C -3' 3'- C T A G <sup>^</sup> -5'
<i>HinfI</i>	5'-G <sup>^</sup> A N T C-3' 3'-C T N A <sup>^</sup> G-5'	<i>RsaI</i>	5'-G T <sup>^</sup> A C-3' 3'-C A <sup>^</sup> T G-5'
<i>HindIII</i>	5'-A <sup>^</sup> A G C T T-3' 3'-T T C G A <sup>^</sup> A-5'	<i>HaeIII</i>	5'-G G <sup>^</sup> C C-3' 3'-C C <sup>^</sup> G G-5'

<sup>^</sup> - Sítio de corte das endonucleases

### 3.4.2 Polimorfismo do tamanho de fragmentos amplificados (AFLP)

A técnica de AFLP foi utilizada com o propósito de avaliar a diversidade dos isolados e comparação com o perfil produzido pelas estirpes-tipo do gênero *Sphingomonas*. A técnica consiste no desenvolvimento de inúmeras etapas, descritas a seguir:

#### a) Digestão com endonucleases de restrição e ligação dos adaptadores

O DNA das amostras foi digerido com as endonucleases de restrição e ligado aos adaptadores seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante do Kit AFLP - *Core Reagent* (Invitrogen<sup>TM</sup>). Em tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, foram adicionado 500 ng de DNA genômico, 5 µl de tampão 5X, 2 µl das endonucleases *EcoRI/MseI* e água de PCR para completar o volume final de 25 µl. Esta mistura foi homogeneizada, centrifugada rapidamente e incubada por 2 horas a 37°C em banho-maria. Em seguida, as amostras foram mantidas sob temperatura de 70°C em banho-maria durante 15 minutos e posteriormente acomodadas no gelo. A esta mistura foram adicionados 24 µl de solução de ligação aos adaptadores e 1 µl de T4 DNA ligase. As amostras foram incubadas a 20°C por 2 horas.

#### b) Reação de pré-amplificação

Após a ligação dos adaptadores, as amostras foram amplificadas usando uma combinação de iniciadores sem nucleotídeo adicional na extremidade 3' (*MseI*+ 0 e *EcoRI* + 0). Cada reação de amplificação com volume final de 50 µl foi composta por 5 µl do produto de ligação; tampão para PCR 1X; 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 200 mM de cada dNTP; 1U de Taq DNA polimerase e 0,5 pmol de cada iniciador. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador PTC 100 (MJ Research). A amplificação constituiu-se de 27 ciclos com uma etapa de desnaturação a 94°C por 30 segundos, uma etapa de anelamento 60°C por 1 minuto e uma etapa de extensão a 72°C por 1 minuto. O produto pré-amplificado foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1% conforme descrito no item 3.3 (c).

#### c) Marcação radioativa dos iniciadores específicos

Como o método de revelação do gel foi a autoradiografia, foi necessária a marcação do iniciador dirigido ao adaptador da endonuclease de corte raro, *EcoRI*, com o radioisótopo [<sup>32</sup>P]-ATP. A marcação foi feita com tampão 10X, 0,2 U da enzima polinucleotídeo kinase,

10 ng do iniciador e 600 ci/mmol do radioisótopo [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]-ATP. A reação foi incubada a 37°C por 1 hora, e posteriormente mantida a 80°C por 10 minutos para inativação da enzima.

#### **d) Reação de amplificação seletiva**

Nesta segunda fase, foram usados iniciadores com um nucleotídeo adicional na extremidade 3', isto para que apenas os fragmentos que possuem nucleotídeos complementares aos nucleotídeos seletivos fossem amplificados. Os produtos da pré-amplificação, foram reamplificados com os iniciadores *EcoRI*+A/*MseI*+C, *EcoRI* + C/*MseI*+G e *EcoRI*+G/*MseI*+C. As reações de amplificação com volume final de 25  $\mu$ l ocorreram com a mistura de tampão 1X; 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 200 mM de cada dNTP; 1 mM do iniciador *EcoRI* marcado com radioisótopo [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]-ATP; 1 mM do iniciador *MseI*; 2 U de Taq DNA polimerase e 5  $\mu$ l do produto da pré-amplificação diluído 5 vezes. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador PTC 100 (MJ Research). Os ciclos de amplificação constituíram-se de uma etapa de desnaturação a 94°C por 1 minuto, uma etapa de anelamento a 62°C por 30 segundos e uma etapa de extensão a 72°C por 30 segundos; este ciclo foi repetido 9 vezes com diminuição de 0,7°C da temperatura de anelamento por ciclo. O último ciclo, onde a temperatura de anelamento atingiu ~56°C, foi repetido mais 22 vezes.

#### **e) Preparação do gel e migração das amostras**

Para montagem do gel de poliacrilamida utilizou-se um par de placas de vidro com 40 cm de comprimento e 30 cm de largura. As placas foram inicialmente lavadas com detergentealconox 5% e água destilada. Posteriormente a secagem sob temperatura ambiente, as placas foram limpas com etanol P.A. e submetidas à aplicação de repelente de água para vidros (Proauto<sup>®</sup>), bem distribuído sobre as duas placas. As placas foram colocadas uma sobre a outra, separadas por espaçadores de 1 mm de espessura e vedadas com fita tipo *silver tape* (Adelbras<sup>®</sup>). O gel foi preparado pela mistura de 100 ml de solução para gel (Anexo B), 500  $\mu$ l de persulfato de amônio 10% e 100  $\mu$ l de TEMED (N, N, N', N' – tetra metiltilenodiamina). Após polimerização do gel, as placas foram acomodadas em cuba de eletroforese vertical e submersas em tampão TBE 1X (Trishidroximetilaminometano 89 mmol/l; ácido bórico 89 mmol/l e EDTA 1 mmol, pH 8,2) a 50°C e submetidas a 1568 volts por 30 minutos. As amostras foram desnaturadas por 5 minutos a 95°C e imediatamente transferidas para o gelo. Alíquotas de 10  $\mu$ l de cada amostra foram aplicadas no gel de poliacrilamida e migraram por 1 hora e 30 minutos sob as mesmas condições anteriores. Depois da eletroforese, o gel foi transferido para um papel de filtro e acomodado em uma secadora de gel (Bio-Rad), por 2 horas a 80°C. O papel, com o gel aderido, foi acomodado em cassete e exposto a um filme de raio-X a - 80°C por 2 dias. O filme de raio-X foi revelado pela imersão em solução reveladora Kodak D 79 (Anexo B). A avaliação do perfil gerado foi feita conforme descrito no item 3.4 (c).

### **3.4.3 DGGE do gene 16S DNAr**

O DNA dos isolados bacterianos foi submetido à amplificação por PCR em reação com volume final de 50  $\mu$ l, contendo 50 ng de DNA genômico, tampão 1X, 0,2  $\mu$ M de cada iniciador (Tabela 5), 200 mM de cada dNTP, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2 U de Taq DNA polimerase. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador PTC 100 (MJ Research). Os ciclos de amplificação constituíram-se de uma etapa de desnaturação a 93°C por 1 minuto, uma etapa de anelamento 55°C por 1 minuto e uma etapa de extensão a 72°C por 2 minutos. Ao final de 30 ciclos, foi efetuada uma última etapa de extensão a 72°C por 5 minutos.

Após o término da reação de amplificação, 5  $\mu$ l do produto de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% conforme descrito no item 3.3(c). Posteriormente a verificação em gel de agarose o produto amplificado foi utilizado

diretamente para análise de DGGE em gel de poliacrilamida conforme descrito por Muyzer et al. (1993) com algumas modificações. Um gel de poliacrilamida a 6% em TBE 1X com gradiente de desnaturação de 55 para 65% foi usado para análise de DGGE. A eletroforese foi realizada a uma voltagem constante de 120 volts por 16 horas em tampão de corrida TAE 0,5 x (20 mM Tris acetato e 0,5 mM EDTA), sob temperatura de 60°C em uma eletroforese vertical para DGGE (INGENYphorU-2; INGENY International BV). Após a eletroforese, o gel foi submetido à etapa de coloração com nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) para visualização das bandas segundo a metodologia descrita por Creste (2001).

**Tabela 5.** Iniciadores utilizados nas reações de amplificação para análise por DGGE e respectivas seqüências de nucleotídeos.

Inicador	Seqüência 5'→3'	Referência
R 1378	CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG	MUYZER et al., 1993
F 968 <sup>GC</sup>	CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TAC	

### 3.5 Determinação do Posicionamento Taxonômico e Relação Filogenética

#### 3.5.1 Hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) (KIRCHHOF et al., 2001)

##### a) Fixação das células bacterianas

Alíquotas de 1 ml de bactérias cultivadas em meio líquido DYGS foram centrifugadas a 5.000 rpm por 5 minutos, lavadas duas vezes em 1 ml de tampão PBS estéril e novamente centrifugadas. O precipitado formado foi ressuspenso em 1 ml de paraformaldeído 4 % (PFA:PBS), permanecendo por 1 hora sob temperatura ambiente. Logo após, foram centrifugados, lavados em PBS, novamente centrifugados, ressuspenso em 1 ml de etanol:PBS (6:4) e, por fim, armazenados em freezer - 20°C.

##### b) Montagem das lâminas

As lâminas contendo 6 campos de marcação foram previamente lavadas em água destilada e submetidas a um processo de sonicação, imersas em álcool isopropanol por 10 minutos. Posteriormente as lâminas foram secas sob temperatura ambiente e banhadas em Bacto Gelatin (Difco) a 1% em água milli-Q. Após o banho permaneceram secando durante a noite sob temperatura ambiente.

Em cada campo da lâmina de hibridização foram colocados 10 µl da suspensão de células armazenadas em etanol:PBS. Essas lâminas foram secas sob temperatura ambiente por 30 minutos e então, imersas por 3 minutos em soluções de etanol a 50, 80 e 100%, sucessivamente.

##### c) Processo de hibridização

Para o processo de hibridização foram utilizadas sondas específicas para o domínio Eubactérias e para as subclasses α e β de proteobactérias disponíveis na Embrapa Agrobiologia (Tabela 6).

**Tabela 6.** Identificação das sondas oligonucleotídias utilizadas para FISH.

Sondas	Organismo Alvo	Seqüência (5'→3')	Referência
EUB338	Eubacteria	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	AMANN et al.,1990
BET42a	β-Proteobacteria	GCC TTC CCA CTT CGT TT	MANZ et al., 1992
ALF1b	α-Proteobacteria	CGT TCG YTC TGA GCC AG	

Foram adicionados 9 µl de tampão de hibridização e 1 µl de sonda oligonucleotídica por poço da lâmina. Em seguida, as lâminas foram incubadas a 46°C em tubos cônicos (tipo Falcon), contendo papel embebido com 2 ml do tampão de hibridização correspondente, por 1 hora e 30 minutos, lavando-se logo após, com tampão de lavagem por 20 minutos a temperatura de 48°C. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água destilada para remover o excesso de tampão de lavagem e secas sob temperatura ambiente. A avaliação foi feita em microscópio de epifluorescência com adição da solução de glicerol:PBS 1:1 sob a lâmina e entre os campos.

### 3.5.2 Gênero-específico

#### a) PCR

Para a amplificação do fragmento específico do gênero *Sphingomonas*, foi utilizada a combinação de iniciadores 108f e 420r conforme descrito por Leys et al. (2004) (Tabela 7). Cada reação de amplificação com volume final de 50 µl foi composta de 50 ng de DNA genômico; tampão para PCR 1X; Tween 20 1,25X; 3,75 mM de MgCl<sub>2</sub>; 200 mM de cada dNTP; 2U de Taq DNA polimerase; 0,5 pmol de cada iniciador. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador PTC 100 (MJ Research). Os ciclos de amplificação constituíram-

se de uma etapa de desnaturação a 94°C por 1 minuto, uma etapa de anelamento 56°C por 1 minuto e uma etapa de extensão a 72°C por 2 minutos. Após 30 ciclos, foi efetuada uma última etapa de extensão a 72°C por 5 minutos. Após o término da reação de amplificação, os produtos de amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%, conforme descrito no item 3.3 (c).

**Tabela 7.** Iniciadores utilizados nas reações de amplificação para análise por PCR e DGGE de um fragmento específico do gene 16S DNAr e respectivas seqüências de nucleotídeos.

Iniciador	Seqüência 5'→3'	Referência
108f	GCG TAA CGC GTG GGA ATC TG	
Sphingo420r	TTA CAA CCC TAA GGC CTT C	LEYS et al., 2004
	CGC GGG CGG CGC GCG GCG GGC GGG	
Sphingo420r <sup>Δ</sup> GC	GCG GGG GCG CGG GGG G TTA CAA CCC TAA GGC CTT C	

#### b) DGGE

O DNA obtido foi submetido à amplificação por PCR em uma reação com volume final de 50 µl, contendo 25 ng de DNA molde, tampão 1X; 0,12 pmol dos iniciadores sphingo420r por sphingo420r<sup>Δ</sup>GC (Tabela 07); 200 mM de cada dNTP; 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 5,0 U de Hot Start Taq DNA polimerase. A reação foi colocada em termociclador PTC-100 (MJ Reserch, Inc. USA), programado para gerar uma desnaturação inicial de 15 minutos a 95°C, e 50 ciclos com uma etapa de desnaturação a 94°C por 5 segundos, uma etapa de anelamento a 62°C por 10 segundos, e uma etapa de extensão a 72°C por 30 segundos, seguidos de uma extensão final de 10 minutos a 72°C. Após o término da reação de amplificação, os procedimentos para análise de DGGE foram realizados conforme o item 3.4.3.

### 3.5.3 Seqüenciamento do gene 16S DNAr

#### a) Purificação do produto amplificado

32 µl do produto de amplificação da região 16S DNAr obtido no item 3.4 (a) foram precipitados em uma reação com 8 µl de NaCl 5M e 40 µl de polietilenglicol 8000 22 %. A

mistura foi incubada sob temperatura de 4°C durante à noite, e posteriormente centrifugada a 14.000 rpm por 30 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado lavado com 500 µl de etanol 70%. Após o processo de lavagem, a mistura foi centrifugada a 4°C por 15 minutos e mantida a temperatura ambiente para secagem. O precipitado foi ressuspendido em 20 µl de água milli-Q esterilizada.

Visando verificar a qualidade de material amplificado e estimar a concentração para posterior reação de seqüenciamento, o produto da purificação foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1% conforme o item 3.3 (c).

### **b) Reação de seqüenciamento**

A reação de seqüenciamento do gene 16S DNAr dos isolados bacterianos foi realizada conforme descrito no item 3.3 (d) com os iniciadores descritos na tabela 8.

**Tabela 8.** Iniciadores utilizados para seqüenciamento do gene 16S DNAr dos isolados bacterianos.

<b>Iniciador</b>	<b>Seqüência (5'→3')</b>	<b>Referência</b>
27f	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	FURUSHITA et al., 2003
108r	CAG ATT CCC ACG CGT TAC GC	LEYS et al., 2004
Amp2	AAG GAG GTG ATC CAR CCG CA	WANG et al., 1993
420r	TTA CAA CCC TAA GGC CTT C	LEYS et al., 2004
16S1203f	GAG GTG GGG ATG ACG TCA AGT CCT C	SOARES-RAMOS et al., 2003
16S1110r	TGC GCT CGT TGC GGG ACT TAA CC	SOARES-RAMOS et al., 2003

### **c) Análise de similaridade e filogenia**

A pesquisa por similaridade foi realizada no Genbank, pelo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) com as seqüências contíguas possuindo em média 1.400 pb conforme descrito no item 3.4 (e).

## **3.5.4 Hibridização DNA:DNA**

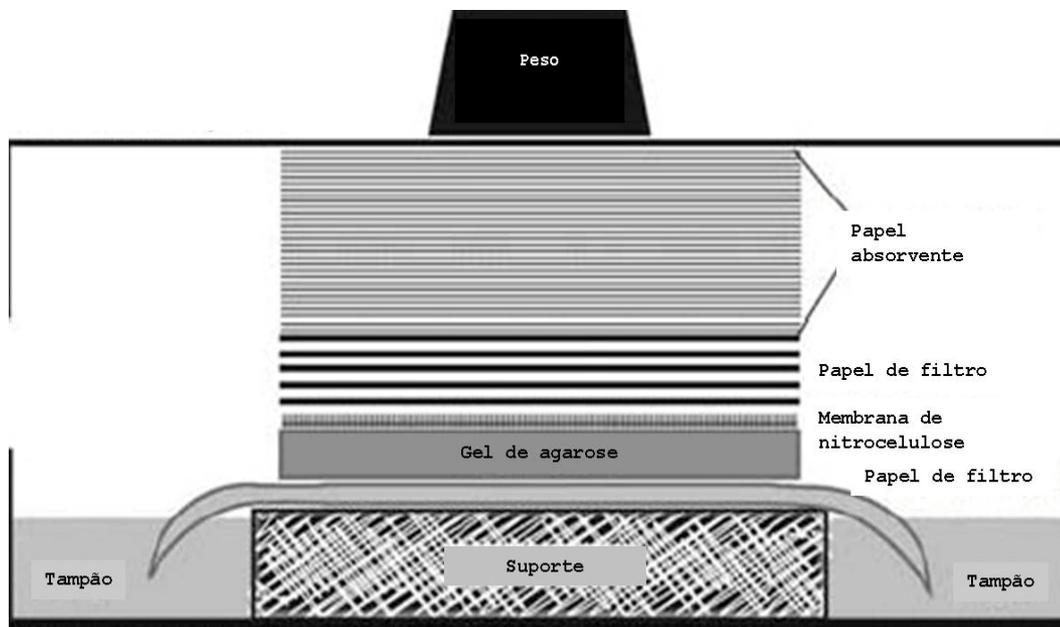
### **a) Preparação das amostras**

Inicialmente, 8 µg do DNA genômico das amostras foram digeridos com 10 U da endonuclease *EcoRI* em tampão correspondente 1 X. As amostras foram incubadas durante a noite sob temperatura de 37°C em banho-maria. Após digestão total, 3 µg do DNA digerido foi separado por eletroforese em gel de agarose 1%, submetido a uma corrente de 20 volts por 24 horas em tampão de corrida TAE 1X. Em seguida, o gel passou por um processo de lavagens sucessivas de: (i) depurinização, com uma solução de HCl 0,25 N durante 7 minutos sob leve agitação, seguida de três lavagens com água destilada; (ii) desnaturação com de NaOH 0,5 N + NaCl 1,5 M com 2 lavagens consecutivas de 45 minutos; (iii) neutralização com solução de SSC 6 X (Anexo B) com 2 lavagens de 1 hora. O processo de transferência do DNA para a membrana de nitrocelulose Hybond-C (Amershan Biosciences) ocorreu por capilaridade, com a imersão em solução de SSC 10 X, por 36 horas (Figura 5). Posteriormente, procedeu-se a fixação do DNA à membrana através da incubação por um período de 2 horas sob temperatura de 80°C.

### **b) Marcação da sonda e processo de hibridização**

Como sonda para a hibridização foi utilizado um volume 20 µl contendo 100 ng de DNA de *Shingomonas azotifigens* digerido com *EcoRI* durante à noite, sob temperatura de

37°C. A sonda passou por um processo de desnaturação por 5 minutos sob temperatura de 95°C e em seguida foi marcada com [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP, conforme descrito pelo fabricante do Kit Random primers DNA labeling system (Invitrogen<sup>TM</sup>).



**Figura 5.** Representação esquemática do processo de transferência do DNA impregnado no gel de agarose para a membrana de nitrocelulose. Fonte: adaptada de [www.gbiosciences.com/Image/BE315.jpg](http://www.gbiosciences.com/Image/BE315.jpg)

A membrana foi tratada com sonda marcada e o processo de hibridização ocorreu durante a noite à temperatura de 65°C. Em seguida, a membrana passou por lavagens sucessivas com solução de: (i) SSC 3 X SDS 10% durante 30 minutos a 65°C; (ii) solução SSC 1X durante 30 minutos a 65°C e, (iii) solução SSC 0,1X a 65°C para eliminar possíveis hibridizações inespecíficas. Encerrado o processo de lavagens, a membrana foi acomodada em cassete e exposta a um filme de raio-X a -80°C por 2 dias. Após exposição, o filme de raio-X foi revelado pela imersão em solução reveladora Kodak D 79.

### 3.6 Características Fenotípicas e Quimiotaxonômicas

#### 3.6.1 Curva de crescimento bacteriano

Para a determinação da curva de crescimento foi selecionada a estirpe 194 de *Sphingomonas* spp.. Uma alíquota de 1 ml de cultura crescida em meio DYGS por 24 horas foi adicionada a um erlenmeyer de 1 litro contendo 300 ml de meio de cultura DYGS com pH 6,0, permanecendo sob agitação constante de 150 rpm a uma temperatura de 30°C. Durante um período de 67 horas, alíquotas de 2 ml foram retiradas do tubo para determinação do número de células viáveis e densidade ótica (DO).

A estimativa do número de células viáveis foi feita através de diluições decimais da cultura bacteriana em meio DYGS, seguido do espalhamento de uma alíquota de cada diluição em placas de Petri contendo meio DYGS sólido. Nesta etapa, 100 µl da cultura foi adicionada a 900 µl de meio DYGS líquido e em seguida, diluições decimais sucessivas foram feitas até que a cultura fosse diluída 10<sup>-15</sup> vezes. Posteriormente, alíquotas de 20 µl das diluições foram plaqueadas separadamente em placas contendo meio DYGS sólido com o auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas por 48 horas sob temperatura de

30°C e após o crescimento das colônias foi realizada a contagem das placas que apresentaram um número entre 30 e 300 colônias.

O aumento da biomassa total da cultura bacteriana cultivada em meio DYGS líquido foi monitorado por medidas da densidade óptica da cultura. Alíquotas de 1 ml da cultura foram retiradas nos intervalos de tempo pré-determinadas e mediu-se a absorvância da amostra em um comprimento de onda de 600 nm (cor laranja). Os dados obtidos sobre o número de unidades formadoras de colônias e densidade óptica por unidade de tempo foram plotados em gráfico para a determinação da curva de crescimento dos isolados.

### **3.6.2 Morfologia de colônia**

Para o conhecimento da morfologia das colônias de bactérias diazotróficas de *Sphingomonas* spp. foram utilizados os meios de cultura geralmente utilizados para as demais bactérias diazotróficas: LGI (sacarose 0,5%), LGI - P (sacarose 10%), JNFb (malato), NFb (malato), JMV (manitol 0,5%), Meio 79 (manitol 1%), Batata (N, malato e sacarose), Batata - P (N, malato e sacarose 10%), NB (Nutriente - broth) e DYGS (Anexo A). Foram avaliadas características culturais como tempo em dias para o desenvolvimento das colônias, coloração, consistência, diâmetro, produção de goma, elevação, forma, bordo, superfície e detalhe óptico. A morfologia das colônias nos diferentes meios de cultura foi analisada aos 7 dias de crescimento.

### **3.6.3 Morfologia celular**

#### **a) Microscopia ótica**

A morfologia e motilidade celular foram avaliadas com células vivas. Uma alíquota da suspensão bacteriana cultivada previamente em meio DYGS por 24 horas foi posicionada entre a lâmina e a lamínula e observada ao microscópio óptico de contraste de fase, através das objetivas de 40X e 100X.

#### **b) Microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

As bactérias foram crescidas em placas contendo meio sólido DYGS por 48 horas a 30°C. Posteriormente ao período de incubação, colônias individualizadas foram isoladas com bastões de vidro oco, onde se adicionou 100 µl de água destilada estéril. Após 10 minutos, uma alíquota de 20 µl da suspensão foi depositada sobre uma placa de cera e uma grade de cobre, previamente preparada com um filme de Formvar 0,4 % em clorofórmio, foi colocada sobre a suspensão durante 2 minutos. A grade foi lavada por 2 minutos em água destilada estéril e, em seguida, adicionada sob uma solução de acetato de uranila 5% por 2 minutos. Após a retirada do excesso do contrastante, a grade permaneceu secando sob papel de filtro por 2 horas para posterior visualização ao microscópio eletrônico de transmissão (MET) (VIDEIRA, 2003).

### **3.6.4 Reação de Gram**

De acordo com o protocolo sugerido por Yano et al. (1991), as bactérias foram crescidas em meio sólido DYGS e o esfregaço preparado a partir de uma colônia isolada. A técnica consistiu na seguinte marcha: (i) preparação de um esfregaço em lâmina de vidro; (ii) secagem ao ar e fixação das células em chama; (iii) cobertura da lâmina com cristal violeta por 1 minuto; (iv) lavagem em água corrente; (v) cobertura da lâmina com lugol por 2 minutos; (vi) lavagem com água corrente; (vii) descoloramento com álcool-acetona; (viii) lavagem da lâmina com água corrente; (ix) cobertura com safranina diluída por 30 segundos e, por fim, procedeu-se a lavagem da lâmina com água, secagem e avaliação da coloração das células em microscópio óptico de contraste de fase com a objetiva de 100X com óleo de imersão.

### **3.6.5 Testes enzimáticos**

#### **a) Oxidase**

Uma alíquota de 50 µl de suspensão bacteriana cultivada previamente em meio DYGS foi depositada em tiras de papel de filtro. Posteriormente, uma gota de solução aquosa de TEMED (1%) foi depositada sob a cultura no papel de filtro. O aparecimento de uma coloração roxa indica teste positivo para a enzima. Nenhuma mudança da cor dentro de 1 minuto indica um teste negativo (KOVACS, 1956).

#### **b) Catalase**

As bactérias foram crescidas durante 7 dias sob temperatura de 35°C em meio DYGS sólido. Em seguida, uma gota de peróxido de hidrogênio a 3% (v/v) foi depositada sob as colônias bacterianas formadas no meio de cultura. A presença de enzima catalase nas bactérias é indicada pelo desprendimento de bolhas de ar (YANO et al., 1991).

#### **c) Hidrólise de tween-80**

Para a determinação da atividade esterásica foi utilizado o meio de cultura descrito por Sierra (1957), contendo (em gramas por litro): peptona 10, NaCl 5, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,1, ágar 18,0, pH 7.4. Após a esterilização do meio de cultura, adicionou-se Tween 80 (previamente esterilizado) numa concentração final de 1% (v/v). O meio foi vertido sob placas de Petri esterilizadas e após solidificação, 20 µl de suspensão bacteriana previamente cultivada em meio DYGS líquido por 24 horas foram inoculados na superfície das placas e incubadas por um período de 7 dias sob temperatura de 30°C. A atividade lipolítica positiva é indicada pelo aparecimento de zonas opacas ao redor do crescimento bacteriano.

#### **d) Gelatinase**

As bactérias foram crescidas em tubos de ensaio contendo 8 ml de meio preparado com (em gramas por litro): extrato de levedura (3), peptona (5) e gelatina (B.D.H.) (120). Após incubação por 24 horas, os tubos foram transferidos para geladeira por 2 horas sob temperatura e 4°C e depois para nova incubação, a operação foi repetida durante 5 dias. A presença das enzimas proteolíticas extracelulares é indicada pela liquefação do meio de cultura após refrigeração (YANO et al., 1991).

### **3.6.6 Condições ideais de pH e temperatura**

A influência do pH para o desenvolvimento bacteriano, foi avaliada sob condições de fixação de nitrogênio em frascos contendo 5 ml de meio de cultura LGI semi-sólido sem nitrogênio e sob condições ótimas de crescimento em tubos contendo 5 ml de meio líquido LGI acrescido de KNO<sub>3</sub> (10 mM). Os frascos e tubos contendo meios de cultura com os diferentes índices de pH (4,0; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 9,0) foram inoculados com 20 µl de bactérias previamente cultivadas em meio DYGS líquido. Os frascos foram incubados durante 10 dias a 30°C e os tubos mantidos sob agitação de 150 rpm à temperatura de 30°C por 48 horas.

A temperatura ótima para o crescimento dos isolados foi avaliada sob condições de fixação de nitrogênio, em frascos contendo 5 ml de meio de cultura LGI semi-sólido sem nitrogênio. Os frascos foram inoculados com 30 µl de bactérias cultivadas em meio líquido. Os frascos foram incubados durante 10 dias sob temperaturas de 25, 28, 30, 32, 34, 36, 38 e 40°C.

### 3.6.7 Tolerância a NaCl

Para avaliação de tolerância a NaCl, as bactérias foram crescidas em meio líquido DYGS por 24 horas a 30°C. Posteriormente, uma alíquota de 1 ml de cultura foi transferida para um tubo de microcentrífuga (tipo eppendorf) e este submetido a uma centrifugação a 8.000 rpm a 25°C por 4 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 1 ml de tampão PBS estéril. O processo de lavagem das células foi repetido 3 vezes. Em seguida, alíquotas de 100 µl das células em suspensão foram inoculadas em placas de Petri contendo meio DYGS com diferentes concentrações de NaCl em sua composição (0, 10, 20, 30, 50, 80 e 100 gramas por litro). Na avaliação de tolerância à salinidade, foi observada a presença ou ausência, assim como a intensidade de crescimento no meio de cultura, após 6 dias de incubação a 30°C.

### 3.6.8 Tolerância a sacarose

Para avaliação de tolerância à sacarose, soluções com diferentes concentrações deste açúcar (2, 5, 10 e 20 %) foram preparadas separadamente e esterilizadas em filtro milipore 0,22 µm. As soluções foram adicionadas a frascos contendo 5 ml de meio LGI semi-sólido, sem ácido málico e ajustado para pH 6,0. Em seguida, 30 µl de bactérias cultivadas em meio líquido foram inoculadas nos frascos, sendo estes incubados a 30°C e avaliados aos 3, 4, 6 e 7 dias de cultivo quanto à formação de película.

### 3.6.9 Metabolismo de carbono

#### a) Meio semi-sólido livre de nitrogênio

Para avaliar o cultivo das bactérias sob condições de fixação de nitrogênio foram utilizados diferentes meios de cultivo semi-sólidos, livres de nitrogênio, como JMV, LGI-P, LGI, JNFb, NFb e LG+79. O inóculo foi obtido a partir do cultivo das bactérias em meio LGI líquido suplementado com 10 mM de KNO<sub>3</sub> a 30°C por 24 horas, sob agitação de 150 rpm. Em seguida, 30 µl da suspensão bacteriana foi inoculada em frascos contendo 5 ml de meio de cultivo e estes incubados a 30°C. As avaliações foram feitas aos 7 e 12 dias após a inoculação, sendo considerado como crescimento positivo, aqueles frascos onde houve formação de película característica de diazotróficos.

#### b) Biolog

Os isolados foram cultivados em meio líquido DYGS sob agitação de 150 rpm sob temperatura de 30°C por 24 horas. Em seguida, uma alíquota foi estriada em meio BUG sólido (Kit BIOLOG) e as placas foram incubadas por 48 horas sob a temperatura de 30°C. As colônias puras foram retiradas cuidadosamente das placas com o auxílio de um cotonete estéril (*swab*) e suspendidas em um fluido inoculante (Kit BIOLOG) ajustando-se a concentração das células para 52% de transmitância ( $\pm$  3%) com o auxílio de um espectrofotômetro com filtro de 590 nm (TANG et al., 1998).

Com o auxílio de um pipetador multicanal, 150 µl desta suspensão foram adicionados em cada um dos 96 poços da microplaca BIOLOG GN2 (Kit BIOLOG). As placas foram tampadas e mantidas sob temperatura de 30°C, sendo as avaliações realizadas após 4 e 24 horas de incubação. A cor púrpura resultante da utilização das diferentes fontes de carbono foi caracterizada como crescimento positivo. Os resultados foram avaliados pelo banco de dados BIOLOG MICROLOG 1 Release 4.01B.

### 3.6.10 Produção de ácido-3-indolacético (AIA)

Os isolados e estirpes-tipo foram analisados quanto à produção de ácido-3-indolacético através do método de microplaca descrito por Sarwar & Kremer (1995). Para este teste, 1 µl de cultura bacteriana cultivada previamente por 24 horas em meio DYGS foi

inoculada em 20 ml de meio DYGS suplementado com L - triptofano na concentração final de  $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Os tubos permaneceram no escuro sob agitação de 150 rpm a temperatura de  $30^\circ\text{C}$ . Alíquotas de 1 ml foram retiradas após 24 e 42 horas de cultivo e centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos. Em microplacas de 96 poços, uma alíquota de 150  $\mu\text{l}$  do sobrenadante foi misturado a 100  $\mu\text{l}$  do reagente de Salkowski (1 ml de 0,5 M  $\text{FeCl}_3$  em 49 ml de ácido perclórico 35 %) previamente preparado. As amostras permaneceram no escuro por 30 minutos sob temperatura ambiente e a leitura de absorbância foi feita em um leitor de microplaca (Labsystem iems reader MF, Labsystem) em um comprimento de onda de 540 nm. A quantificação de compostos indol foi avaliada utilizando da curva de calibração preparada com diluições seriadas de padrões de AIA ( $10\text{-}80 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). Para padronização das amostras os resultados foram expressos na unidade  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de AIA por unidade de DO. Todas as amostras de AIA foram analisadas em triplicata nas placas de 96 poços e o resultado foi decorrente de uma média das 3 leituras.

### **3.6.11 Solubilização de Fosfato**

A capacidade de solubilização de fosfato insolúvel foi testada em meio de cultura GL sólido (Anexo A) conforme descrito por Sylvester-Bradley et al. (1982). Depois de esterilizado e com temperatura em torno de  $50^\circ\text{C}$ , foram adicionados a 200 ml de meio, 50 ml de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (10 %) e 100 ml de  $\text{CaCl}_2$  (10 %) para formação de precipitado insolúvel de  $\text{CaHPO}_4$ . O meio cuidadosamente foi distribuído em placas de Petri a fim de evitar a formação de bolhas que dificultam a visualização no halo.

As bactérias foram previamente cultivadas em meio DYGS por 24 horas e uma alíquota de 20  $\mu\text{l}$  foi inoculada na superfície da placa de Petri, em forma de pontuações. Foram estabelecidas 3 alíquotas por placa e 3 placas por isolado. O diâmetro do halo de solubilização, percebido como uma área translúcida em torno da colônia, foi medido após 7 dias de incubação.

### **3.6.12 Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos Celulares (FAME)**

Esta análise foi realizada pelo Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente, no Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa. Os ácidos graxos foram analisados em bactérias cultivadas em meio sólido TSA (Anexo A) por 48 horas sob temperatura de  $30^\circ\text{C}$ . Os ácidos graxos celulares foram saponificados, metilados, extraídos e analisados por cromatografia gasosa de acordo com os procedimentos descritos pelo método Sherlock Microbial Identification System (MIDI, Inc., 2008). A identificação e comparação dos resultados foram feitas utilizando o banco de dados de Sherlock Microbial Identification System (TSBA 50 5.00). O dendrograma foi construído pelo próprio programa MIDI (sistema Tracker).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Ativação dos Isolados

Durante a etapa de recuperação da coleção bacteriana, do total de 82 isolados, somente 51 puderam ser reavivados. Os isolados utilizados nas etapas subsequentes estão descritos no Anexo C.

### 4.2 Qualidade e Quantificação do DNA Genômico

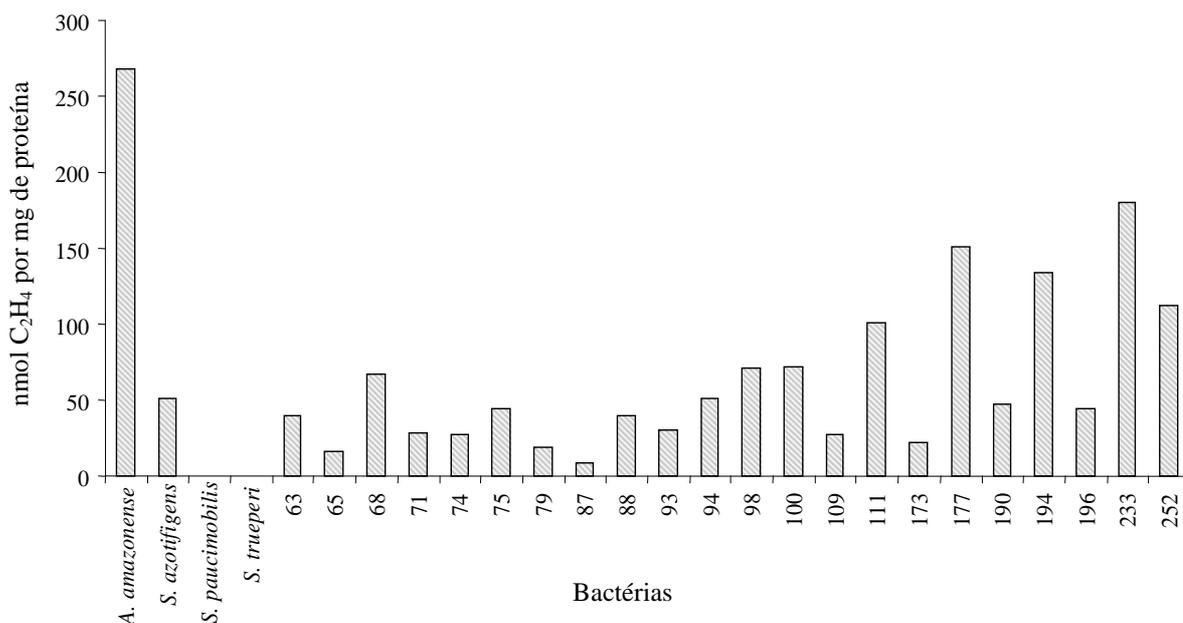
O método de extração de DNA genômico forneceu um DNA de qualidade para as análises moleculares, sem a necessidade de etapas de purificações posteriores. Foram observadas algumas variações na quantidade de DNA genômico entre as amostras, provavelmente em função da diferença do número de células de cada bactéria no momento da extração. Comparando-se com concentrações conhecidas de DNA lambda, as amostras apresentam uma média entre 50 e 100 ng  $\mu\text{l}^{-1}$ .

### 4.3 Identificação de Bactérias Diazotróficas

#### a) Atividade de nitrogenase

Durante o ensaio de redução de acetileno, somente 22 dos 51 isolados e a espécie *S. azotifigens* formaram película característica de bactérias diazotróficas e mostraram atividade da nitrogenase sob condições microrraerofílicas (Figura 6). Os isolados que apresentaram valores nulos não foram apresentados.

A figura 6 mostra que houve grande variabilidade na quantidade de etileno produzido pelos diferentes isolados, apresentando valores entre 2,5 e 180 nmol de etileno por mg de proteína total, no período de 1 hora de incubação em atmosfera de acetileno. Outros autores também encontraram grande variabilidade na atividade da nitrogenase entre isolados de bactérias dos gêneros *Herbaspirillum* isoladas de arroz (RODRIGUES et al., 2003) e *Burkholderia* isoladas de cana-de-açúcar (PERIN, 2007).



**Figura 6.** Atividade da nitrogenase (ARA) dos isolados, estirpes padrões de *Sphingomonas* e *Azospirillum amazonense*; valores referentes à média de três repetições.

O método de redução do acetileno vem sendo amplamente utilizado como uma técnica indireta para mensurar a atividade da nitrogenase em amostras naturais, organismos isolados, extratos de células ou tecidos vegetais (STAAL et al., 2001). A técnica de ARA foi desenvolvida por Stewart et al. (1967) e Hardy et al. (1968), tornando-se uma técnica popularizada por apresentar baixo custo, sensibilidade e um rápido tempo de resposta.

Esta técnica determina teoricamente a quantidade de N que o organismo ou o sistema estaria fixando, entretanto, muitos fatores interferem nos resultados desta análise incluindo a luminosidade, quantidade de oxigênio, concentração de acetileno, difusão de gás por longos períodos de incubação, limite de detecção do cromatógrafo utilizado, entre outros (FAY, 1992; ZUCKERMANN et al., 1997; STAAL et al., 2001), além do estado fisiológico dos organismos fixadores de nitrogênio. Por isso, apesar de ser considerada por muitos autores uma análise quantitativa, optou-se neste estudo por atribuir um caráter qualitativo a esta análise, não tendo como objetivo quantificar com exatidão a taxa de fixação biológica de nitrogênio das bactérias em estudo.

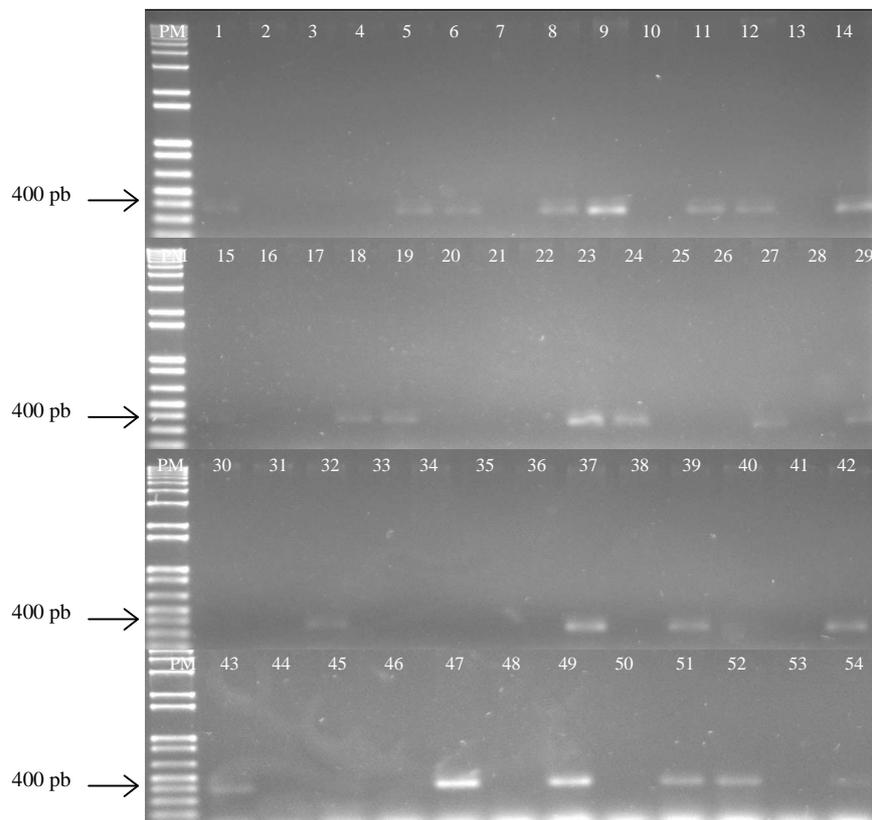
### **b) Amplificação e seqüenciamento do gene *nifH***

Durante muitos anos a amplificação por PCR do gene *nifH* tem sido realizada em comunidades de diazotróficos do solo (ROSADO et al., 1998; POLY et al., 2001; BURGMANN et al., 2004; WAKELIN et al., 2007) e em associação com plantas (UEDA et al., 1995; BURGMANN et al., 2004; KNAUTH et al., 2005; ZHANG et al., 2007). Embora a seqüência do gene *nifH* seja altamente conservada entre os diazotróficos, diversos iniciadores para PCR tem sido desenhados para amplificar regiões deste gene muito semelhantes ou com diferentes níveis de degeneração a fim de estudar certos grupos ou populações dentro de comunidades microbianas (AUMAN et al. 2001; MEHTA et al. 2003).

Neste estudo optou-se por utilizar o par de iniciadores degenerados para o gene *nifH* (codifica para Fe-proteína da nitrogenase) descrito por Ueda et al. (1995). Todos os isolados recuperados foram utilizados nesta análise. Os resultados mostraram que somente os isolados que apresentaram atividade da nitrogenase *in vitro* e *S. azotifigens*, amplificaram um fragmento de aproximadamente 390 pb correspondente ao gene *nifH*. O isolado 103 não mostrou atividade da nitrogenase pela ARA, entretanto amplificou o fragmento correspondente ao gene *nifH*. Outros autores também relatam que algumas estirpes amplificam genes relacionados com a nitrogenase, mas não apresentam atividade da mesma (ACHOUAK et al., 1999; BERGE et al., 2002; DING et al., 2005).

*Sphingomonas trueperi* e *S. paucimobilis* não mostraram resultado de amplificação para o gene *nifH* (Figura 7). Resultados semelhantes foram encontrados por outros autores para estas estirpes. Kämper et al. (1997) demonstraram que a atividade da nitrogenase e fragmentos de genes relacionados com a nitrogenase não foram detectados em *S. trueperi*. Embora alguns trabalhos relatem que algumas estirpes de *S. paucimobilis* apresentam atividade da nitrogenase (REINHOLD-HUREK & HUREK, 2000; FERNANDES et al., 2001; XIE & YAKOTA, 2005a), nenhum trabalho comprova sua capacidade de fixar nitrogênio através da detecção de genes relacionados com a FBN. Xie & Yakota (2006) reportaram que um fragmento do gene *nifH* foi amplificado por PCR em *S. azotifigens* e a atividade da nitrogenase foi comprovada pela ARA, descrevendo então a primeira espécie diazotrófica deste gênero.

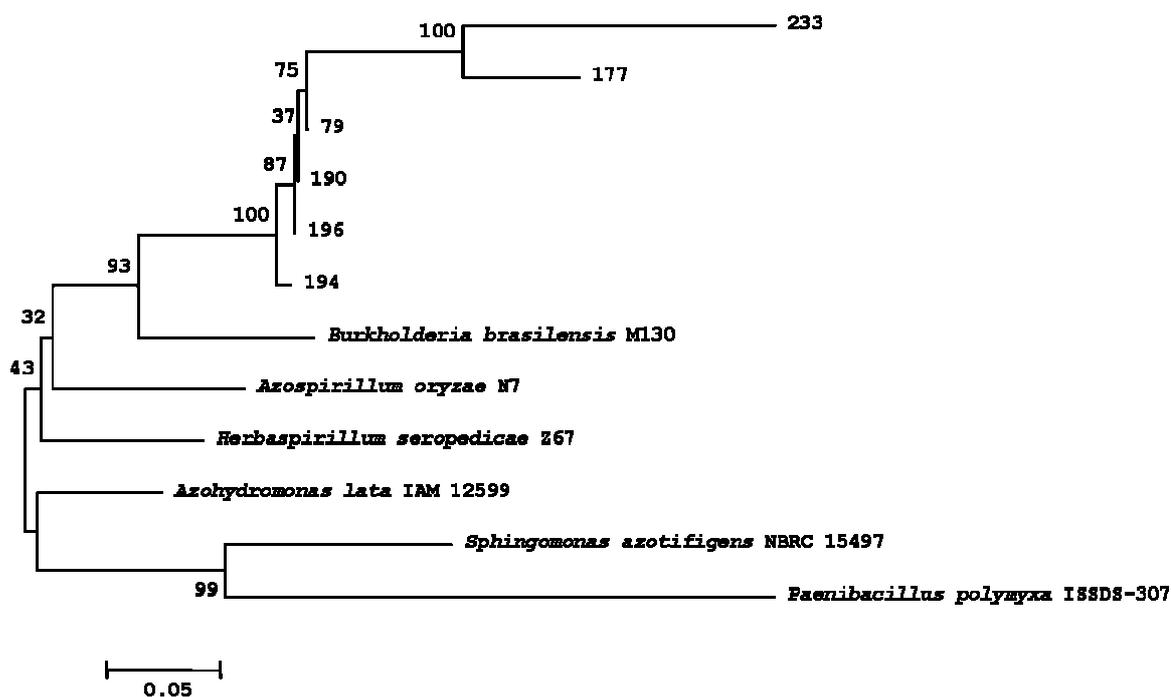
Dentre os fragmentos do gene *nifH* amplificados por PCR, 6 foram selecionados ao acaso para a etapa de seqüenciamento. As seqüências foram alinhadas com seqüências de outras proteobactérias e o alinhamento foi utilizado para gerar a árvore filogenética. A análise de similaridade realizada pelo programa MegaBLAST (ZHANG et al., 2000) no banco de dados NCBI, mostrou que as seqüências parciais do fragmento do gene *nifH* amplificado apresentaram elevada similaridade com seqüências da Fe-proteína da nitrogenase (*nifH*) de



**Figura 7.** Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de amplificação da região flanqueada pelo par de iniciadores 19f e 407r para o gene *nifH*. PM: Marcador de Peso Molecular 1 Kb DNA ladder - Invitrogen, Sa: *S. azotifigens*, Sp: *S. paucimobilis* e St: *S. trueperi*, Isolados (4-54).

*Sphingomonas azotifigens* (nº de acesso no GenBank AB217474.1) e clones de diferentes bactérias diazotróficas não cultiváveis obtidas de *Spartina alterniflora*. Similaridades moderadas foram encontradas para seqüências do gene *nifH* de outros representantes de proteobactérias.

A seqüência do gene *nifH* foi selecionada como um outro marcador filogenético para elucidar as relações evolucionárias entre bactérias diazotróficas. Este gene tem sido examinado como parte do grupo dos genes da FBN (*nifHDK*), apresentando regiões muito conservadas e algumas regiões variáveis, e sua análise tem sido altamente consistente com a filogenia do gene 16S DNAr (YOUNG, 1992; ROSADO et al., 1998; ZEHR et al., 2003; RAYMOND et al., 2004; XIE & YOKOTA, 2004). Baseado na análise de filogenia do *nifH*, foi observado que os isolados apresentam grande similaridade entre si, formando um grupo separado das outras bactérias diazotróficas utilizadas, inclusive *Sphingomonas azotifigens* (Figura 8). Para a análise filogenética as seqüências foram alinhadas e submetidas a uma edição para que todas apresentassem o mesmo número de nucleotídeos, ~ 250 pb. Embora a análise de similaridade mostre que as bactérias apresentam maior identidade com *Sphingomonas azotifigens*, é provável que durante a edição das seqüências, a região de maior similaridade tenha sido removida, utilizando-se então uma região com maior variabilidade genética.

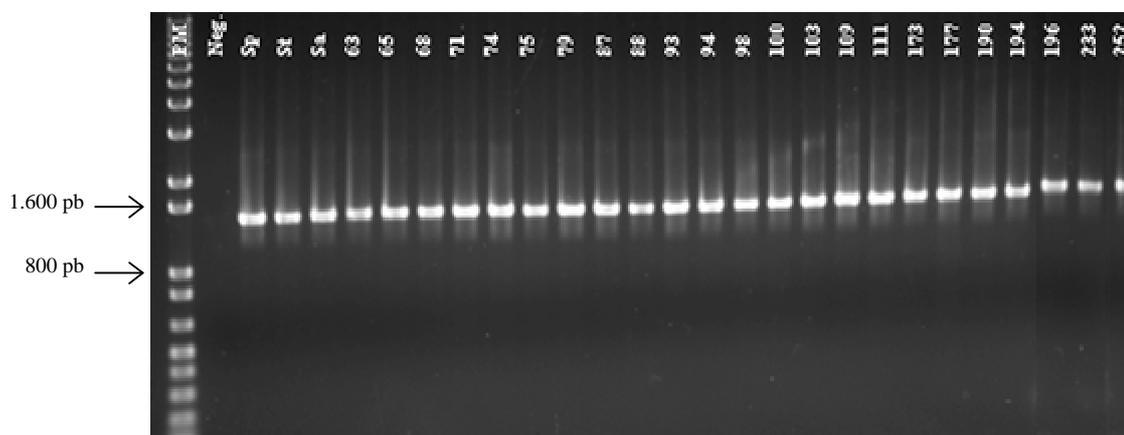


**Figura 8.** Árvore filogenética baseada nas seqüências parciais do *nifH*, incluindo as seqüências dos isolados e outras proteobactérias fixadoras de nitrogênio do banco de dados NCBI. A árvore foi gerada pelo método *neighbour-joining*. A análise de *bootstrapping* foi calculada com 1000 repetições.

#### 4.4 Diversidade Genética

##### 4.4.1 ARDRA

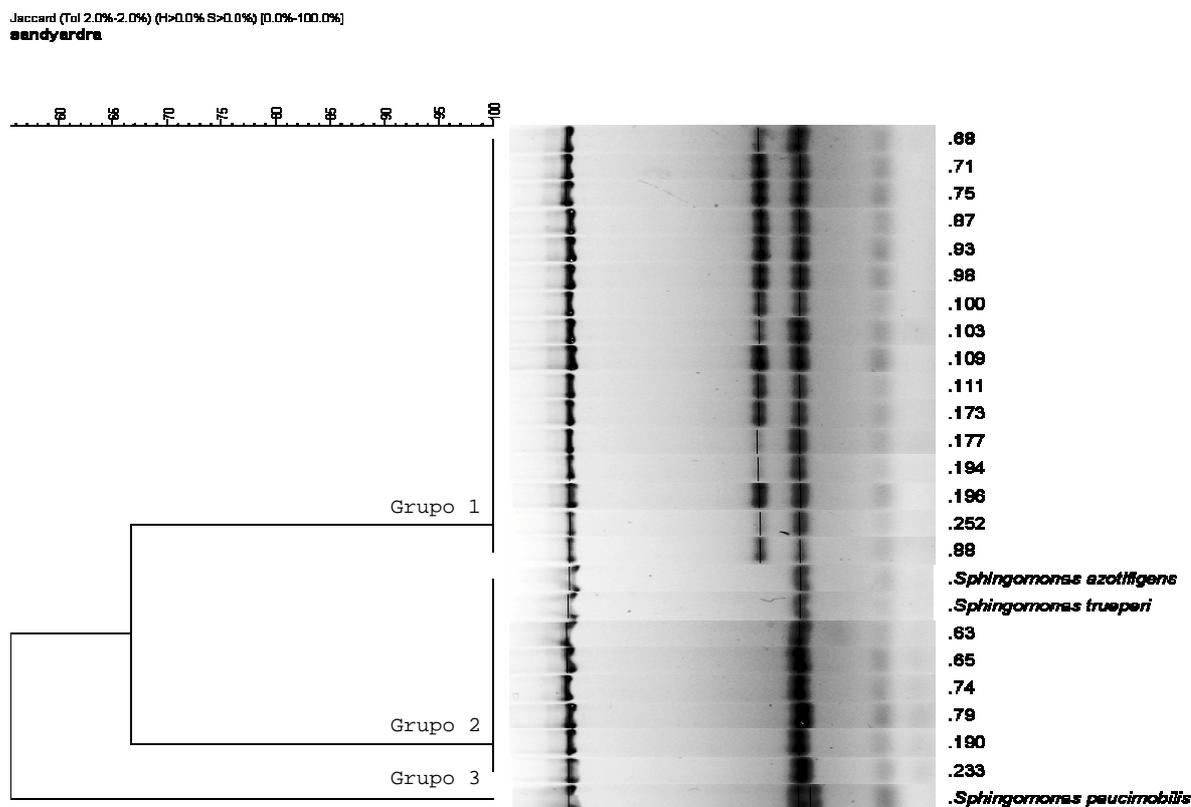
A amplificação por PCR usando os 2 iniciadores degenerados para amplificação do fragmento correspondente ao gene 16S DNAr, 27f e Amp2, foi testada com DNA cromossomal dos 23 isolados bacterianos que apresentaram a capacidade de fixar nitrogênio e as 3 estirpes-tipo de *Sphingomonas*. Foi obtido um fragmento único de aproximadamente 1.500 pb, que corresponde ao tamanho esperado para o gene 16S DNAr (Figura 9).



**Figura 9.** Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de amplificação do gene 16S DNAr flanqueado pelos iniciadores 27f e Amp2 para os isolados bacterianos e estirpes-tipo. PM: Marcador de Peso Molecular 1 Kb DNA ladder - Invitrogen, Neg.: controle negativo, Sa: *S. azotifigens*, Sp: *S. paucimobilis* e St: *S. trueperi*.

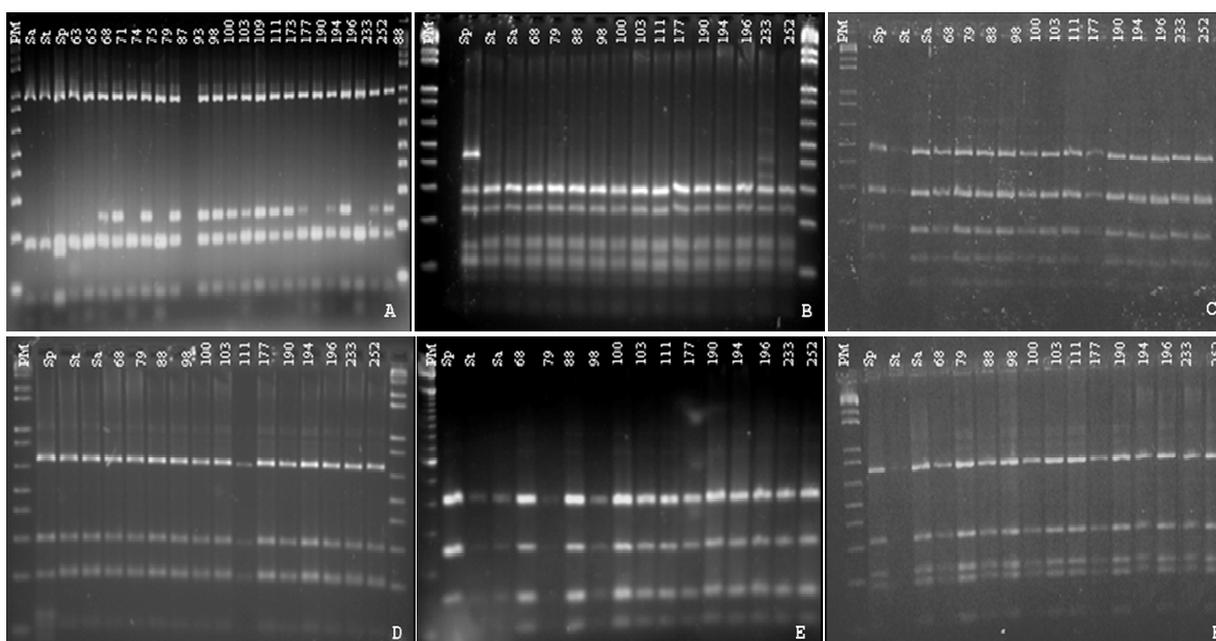
O método de ARDRA foi primeiro aplicado aos isolados e estirpes tipo usando a enzima *MboI* para verificar se o método era capaz de promover a discriminação entre as bactérias. A análise do perfil de ARDRA obtido com a endonuclease *MboI* mostrou que o método foi capaz de diferenciar as bactérias testadas em 3 grupos polimórficos distintos (Figura 10).

De acordo com o dendrograma (Figura 10), os isolados foram divididos em dois grupos distintos, sendo os isolados 68, 71, 75, 87, 93, 98, 100, 103, 109, 111, 173, 177, 194, 196 e 252 componentes do grupo 1, e os isolados 63, 65, 74, 79, 190, 233 constituem o segundo grupo polimórfico juntamente com as espécies *S. azotifigens* e *S. trueperi*. A estirpe de *S. paucimobilis* apresentou um perfil com bandas semelhantes e uma banda diferenciada, formando um grupo separado.



**Figura 10.** Dendrograma de ARDRA gerado pela eletroforese em gel de agarose 3% ilustrando a relação entre os diferentes isolados e estirpes-tipo de *Sphingomonas* spp. O perfil de ARDRA foi obtido pela digestão do gene 16S DNAr amplificado por PCR com a endonuclease *MboI*. O dendrograma foi construído com o programa GelCompar II e o agrupamento feito pelo método UPGMA.

Representantes de cada grupo formado na digestão com *MboI* foram selecionados e o fragmento do gene 16S DNAr, amplificado por PCR, foi utilizado para novas digestões individuais com as endonucleases *HinfI*, *HindIII*, *HaeIII*, *HhaI* e *RsaI*. O resultado gerado com estas endonucleases mostrou perfis de restrição idênticos para todos os isolados e estirpes-tipo, com exceção para a endonuclease *HhaI* que revelou um perfil diferenciado para *S. paucimobilis*. Em todos os casos, a soma dos tamanhos de fragmentos gerados no perfil de restrição foi aproximadamente 1.500 pb, tamanho da banda do fragmento da 16S (Figura 11 – A-F).



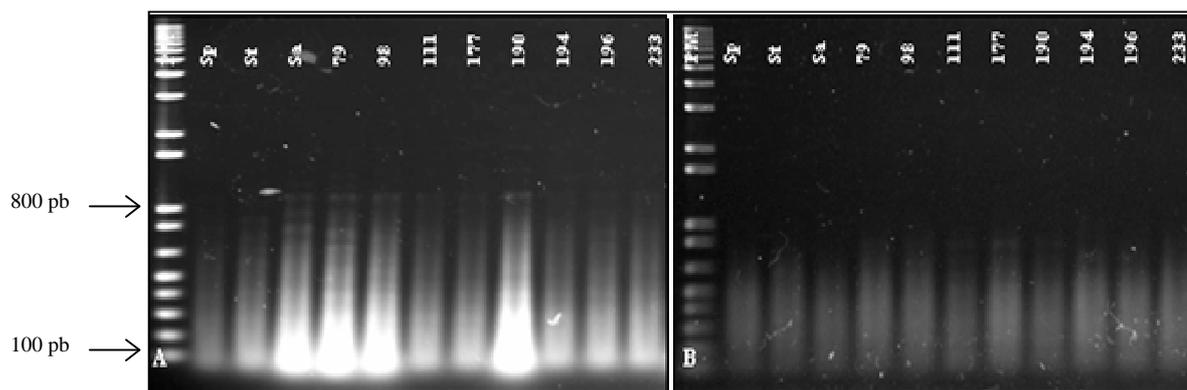
**Figura 11.** Eletroforese em gel de agarose 3% com perfil de restrição dos fragmentos amplificados do gene 16S DNAr gerados após digestão com as enzimas *MboI* (A), *HhaI* (B), *HinfI* (C), *HindIII* (D), *RsaI* (E), *HaeIII* (F). PM: Marcador de Peso Molecular 1 Kb DNA ladder - Invitrogen, Sa: *S. azotifigens*, Sp: *S. paucimobilis* e St: *S. trueperi*.

Lindström et al. 1998 em estudos de taxonomia de bactérias diazotróficas, mostraram que este método é uma ferramenta poderosa para a estimativa rápida de relações filogenéticas. Muitos estudos têm mostrado que além da separação de gêneros, esta técnica pode ser utilizada para separar espécies e estirpes. Diferentes espécies de bactérias diazotróficas dos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia* têm sido facilmente distinguidas através da utilização desta técnica (ECKERT et al., 2001; REIS JUNIOR, 2002; RODRIGUES, 2003; BRASIL et al., 2005; PERIN, 2007). Para avaliar a diversidade intraespecífica de estirpe de *Azospirillum amazonense*, Reis Junior et al., (2004) utilizaram os genes 16S e 23S DNAr e o espaço intergênico 16-23S DNAr (IGS). Estes autores constataram maior variabilidade genética apresentada pela IGS quando comparada com as regiões 16S e 23S DNAr (regiões mais conservadas). Brasil (2001) utilizou com sucesso essa mesma técnica para o agrupamento de isolados de *Azospirillum* provenientes de gramíneas forrageiras da região do Pantanal Sul Mato-Grossense.

De acordo com os resultados citados anteriormente, é possível que a utilização da IGS para as análises de ARDRA forneça resultados mais significativos quanto à diversidade dos isolados bacterianos e estirpes-tipo testados neste estudo.

#### 4.4.2 AFLP

A análise de AFLP foi realizada com DNA genômico de 11 bactérias dos diferentes grupos gerados pela ARDRA. Fragmentos de restrição entre 50 e 800 nucleotídeos foram obtidos durante a etapa de digestão com as endonucleases de corte raro *EcoRI* e de corte freqüente *MseI* (Figura 12-A). Os fragmentos foram ligados aos adaptadores para as respectivas endonucleases e o produto da ligação foi utilizado para a etapa de pré-amplificação. A maior parte dos produtos resultantes da pré-amplificação apresentou um tamanho variando de 50 e 600 nucleotídeos (Figura 12-B).

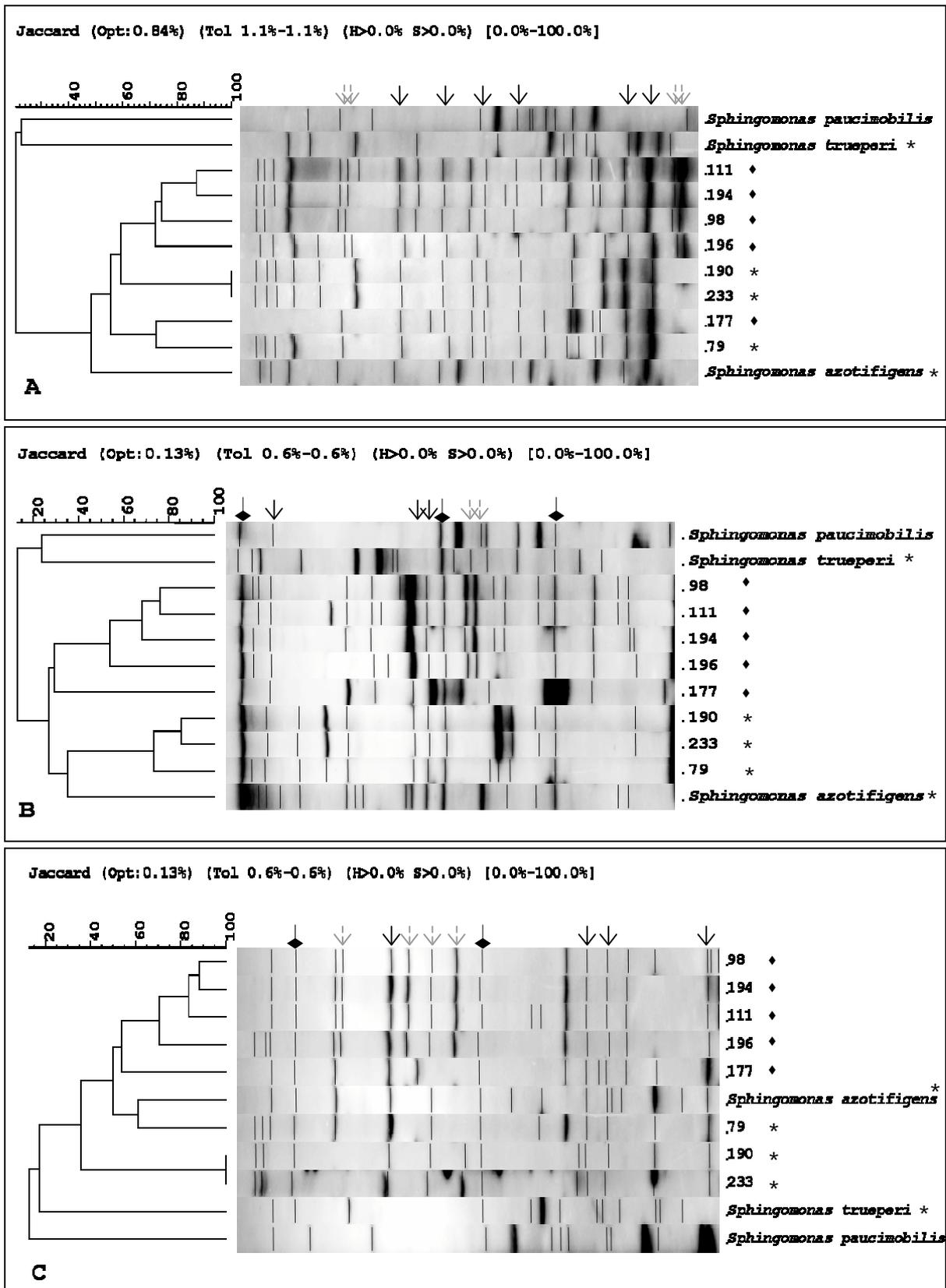


**Figura 12.** Eletroforese em gel de agarose 1% com produto de digestão do DNA total das bactérias com as endonucleases *EcoRI* e *MseI* (A) e fragmentos gerados pela pré-amplificação com iniciadores *EcoRI*+0/*MseI*+0. PM: Marcador de Peso Molecular 1 Kb DNA ladder - Invitrogen, Sa: *S. azotifigens*, Sp: *S. paucimobilis* e St: *S. trueperi*.

No AFLP, o número de bandas gerado é determinado pelo tamanho e complexidade do genoma e número de nucleotídeos seletivos presentes nas extremidades 3' dos iniciadores na etapa de amplificação seletiva (LIN et al., 1996; VOS et al., 1995). Blears et al. (1998), em revisão sobre a técnica de AFLP e suas aplicações, afirmaram que genomas pequenos (como das bactérias) necessitam de apenas um ou dois nucleotídeos seletivos na extremidade 3' de cada iniciador para que o polimorfismo do DNA seja observado.

Neste estudo, optou-se por utilizar um nucleotídeo seletivo para cada iniciador nas combinações *EcoRI*+A/*MseI*+C; *EcoRI*+C/ *MseI*+G e *EcoRI*+G/*MseI*+C. Considerando somente as bandas de alta intensidade no gel, por não gerarem ambigüidade, foram observadas uma média de 150 bandas para cada combinação. Os perfis de AFLP obtidos foram analisados com o programa GelCompar II (Figura 13). Analisando-se os 3 dendrogramas, é possível observar a formação de 3 grupos distintos com ~ 20% de similaridade, sendo os isolados e *S. azotifigens* constituintes de um único grupo, *S. trueperi* e *S. paucimobilis* formando dois outros grupos polimórficos distintos. Este resultado mostrou que esta técnica, diferentemente de ARDRA, foi capaz de gerar um perfil de AFLP característico para cada espécie de *Sphingomonas* testada, diferenciados pelo número e distribuição das bandas (Figura 13).

A maior semelhança dos isolados com *S. azotifigens* é decorrente do grande número de bandas monomórficas encontradas entre eles (setas sólidas). O perfil dos isolados apresentou ~ 50% de similaridade com o perfil gerado por *S. azotifigens*. Dentro do grupo formado pelos isolados, foi observado uma divisão em dois subgrupos, constituindo o subgrupo 1 os isolados 190, 233, 79 e o subgrupo 2 os isolados 177, 194, 98, 196 e 111. Este resultado mostra que a classificação por AFLP foi correlacionada com os dados obtidos no ARDRA (indicados pelos símbolos no dendrograma). Dentro destes subgrupos, os isolados 190 e 233 mostraram um perfil de AFLP altamente homogêneo para todas as combinações de iniciadores testadas. Resultado semelhante foi observado entre os isolados 194, 111, 98 e 196, que revelaram bandas específicas entre si (seta em traço) (Figura 13).



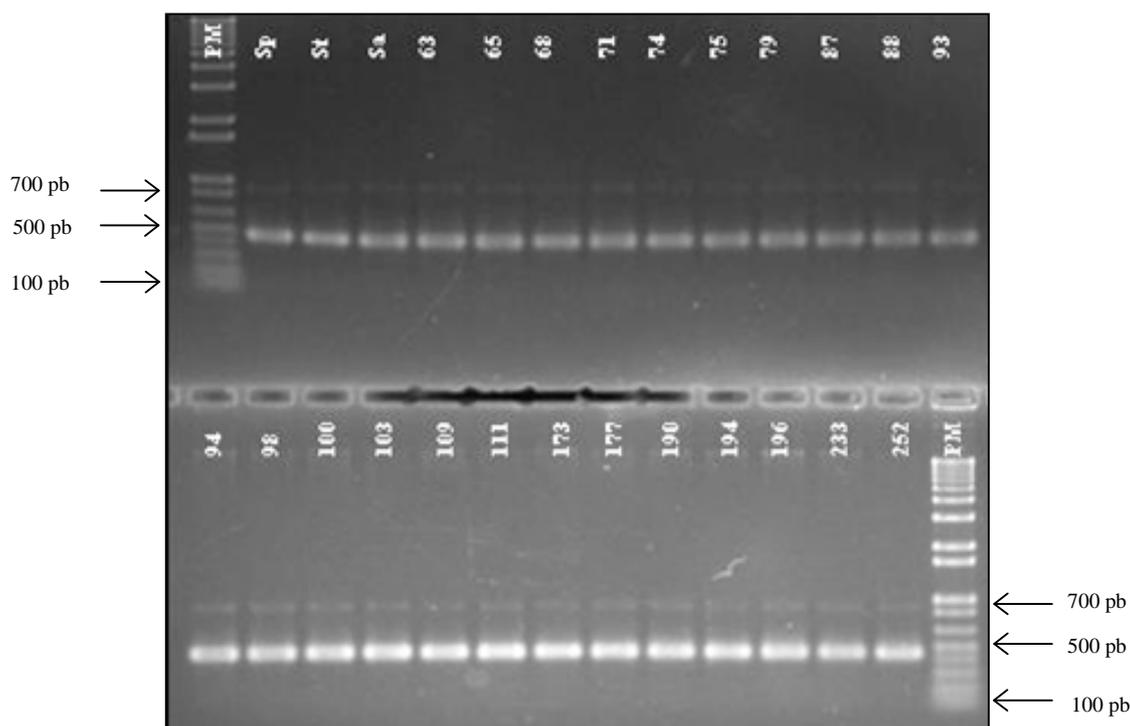
**Figura 13.** Dendrograma gerado pelo método UPGMA, construído com base no coeficiente de correlação de Pearson, a partir da análise dos perfis gerados por AFLP de isolados e estripes-tipo. Os iniciadores usados foram: A - *EcoRI*+A/*MseI*+C; B - *EcoRI*+C/ *MseI*+G e C -*EcoRI*+G/*MseI*+C. ♦ Isolados do grupo 1 de ARDRA; \* Isolados do grupo 2 de ARDRA.

Na técnica de AFLP, quando se faz uma comparação de todo o genoma de organismos com certo grau de parentesco, é comum e imprescindível que bandas monomórficas sejam obtidas em todos os perfis. Dentre as combinações utilizadas, foi possível observar claramente a presença destas bandas somente nas combinações B e C (seta em losango).

De acordo com Jansenn et al. (1996), a combinação de iniciadores utilizada neste estudo, *EcoRI/MseI*, é mais adequada para genomas pobres em G+C e combinações como *ApaI/TaqI* para genomas ricos em G+C, como por exemplo bactérias do gênero *Sphingomonas* que apresentam % G+C entre 58 e 69%. Embora a combinação de iniciadores utilizada tenha mostrado que o AFLP pode ser considerado uma poderosa técnica para diferenciação das espécies de *Sphingomonas* testadas, é possível que combinações de endonucleases de restrição mais apropriadas para os genomas estudados revelem resultados mais promissores na análise de diversidade genética de bactérias deste gênero.

#### 4.4.3 DGGE

O produto amplificado por PCR com iniciadores universais para o gene 16S DNAr R1378 e F968-CG desenhados por Muyzer et al. (1993), geraram uma banda de tamanho esperado (450 pb), e uma banda inespecífica (750 pb) para todos os isolados e estirpes-tipo utilizadas (Figura 14). Este produto foi utilizado diretamente para a análise de DGGE.

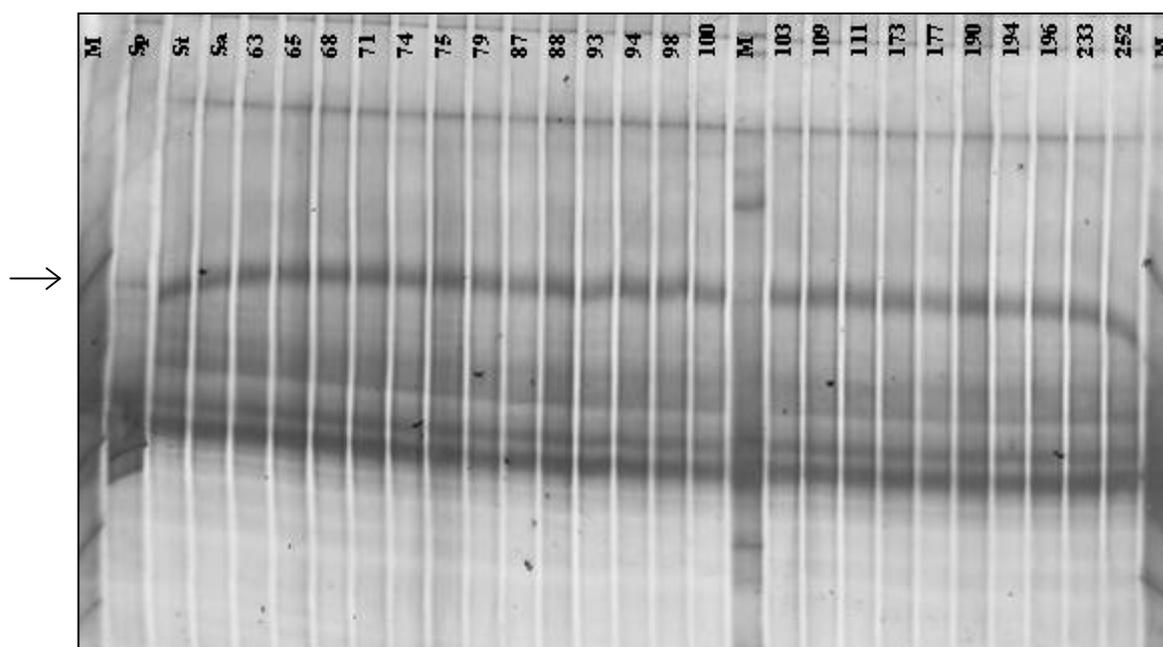


**Figura 14.** Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de PCR amplificado com o par de iniciadores R1378 e F968-CG. PM: Marcador de Peso Molecular 1 Kb DNA ladder - Invitrogen, Sa: *S. azotifigens*, Sp: *S. paucimobilis* e St: *S. trueperi*.

Na análise de DGGE, o produto de PCR amplificado a partir de uma amostra, contendo fragmentos de DNAr do gene 16S de mesmo comprimento, mas com seqüências de bases diferentes, pode ser separado de acordo com o comportamento de desnaturação particular de cada fragmento, relacionado ao conteúdo total de G+C e à distribuição destas ao longo do fragmento (CANHOS & MANFIOS, 2001).

O resultado desta análise mostrou um padrão idêntico de bandas de DNA, distribuído ao longo do gradiente de desnaturação do gel para o fragmento do gene 16S DNAr dos

isolados e estirpes tipo (Figura 15). Embora os valores de %G+C total sejam diferentes entre as espécies testadas (*S. paucimobilis* – 64%; *S. trueperi* - 65,6% e *S. azotifigens* – 68%) e a seqüência do 16S DNAr de *S. paucimobilis* apresente similaridade menor que 96% com as outras duas espécies testadas, o perfil de migração em gel de DGGE não foi diferenciado. Este resultado sugere que a técnica de DGGE utilizando o par de iniciadores R1378 e F968-CG é inviável como ferramenta para determinação da diversidade genética dos membros do gênero *Sphingomonas* testados.



**Figura 15.** Análise de DGGE do fragmento de DNA amplificado com os iniciadores R1378 e F968-CG. M: Marcador, Sa: *S. azotifigens*, Sp: *S. paucimobilis* e St: *S. trueperi*.

Alguns autores têm relatado a dificuldade em separar diferentes seqüências bacterianas através desta metodologia (KOWALCHUK et al., 1997; VALLAEYS et al., 1997; JACKSON et al., 1999). Jackson et al. (1999) observaram que duas seqüências que apresentaram o mesmo perfil de migração em gel de DGGE, embora apresentassem o mesmo conteúdo de % G+C, diferiam em 5% de seus pares de base, o que poderia teoricamente revelar uma migração diferenciada das bandas. Posteriormente, estes autores demonstraram experimentalmente que seqüências parciais do gene 16S DNAr diferentes por mais de um par de base podem migrar em posições idênticas no gel de DGGE, sem necessariamente confirmar a presença de uma mesma espécie bacteriana.

Embora estas limitações não eliminem a utilização do DGGE nos estudos de avaliação de diversidade de espécies microbianas, alguns autores sugerem que outras análises complementares sejam feitas para gerar conclusões mais precisas (JACKSON et al., 1999; MARIEL et al., 2005).

## 4.5 Posicionamento Taxonômico e Relação Filogenética

### 4.5.1 FISH

Neste estudo foram utilizados 23 isolados bacterianos *nifH*<sup>+</sup>, estirpes-tipo de *Sphingomonas* e outras bactérias fixadoras de nitrogênio pertencentes às diferentes subclasses de proteobactéria. Como sondas foram utilizadas EUB338, ALF1b e Bet42a disponíveis na

Embrapa Agrobiologia. Na avaliação da técnica de FISH para a identificação dos isolados e diferentes estirpes-tipo, verificou-se que todas as bactérias testadas apresentaram sinal de hibridação positivo com a sonda EUB338, universal para o domínio específico Eubateria (AMANN et al., 1990). Todos os isolados e *Rhizobium tropici*, *Azoarcus* sp, *Azospirillum amazonense* e *Gluconacetobacter diazotrophicus* apresentaram também sinal de hibridação positivo para a sonda específica para membros da subclasse  $\alpha$  de Proteobacteria (ALF1b). A fim de verificar a confiabilidade dos resultados, optou-se por utilizar uma sonda específica para um outro grupo de proteobactérias. Conforme o esperado, nenhum isolado e outras bactérias da subclasse  $\alpha$  de Proteobacteria hibridizou com a sonda Bet42a, específica para a subclasse  $\beta$  de Proteobacteria. Somente *Burkholderia tropica* e *Herbaspirillum seropedicae* apresentaram sinal positivo para Bet42a, confirmando assim a especificidade desta sonda (Tabela 9).

Thomas et al. (1997), desenharam uma sonda, SPHIN (5'-ATCCAGCCGAACTGAAGGAAAGTG-3'), específica para diversas espécies de *Sphingomonas* (não especificadas pelo autor), entretanto, somente uma estirpe de *S. paucimobilis* foi identificada pela sonda. No mesmo ano, Snaidr et al., desenvolveram uma sonda para FISH específica para a espécie *S. capsulata*. Nenhum trabalho até o momento relatou a síntese de sondas de FISH para identificação da maioria das espécies do gênero *Sphingomonas*.

**Tabela 9.** Resultados da técnica de FISH dos isolados e estirpe padrões de outras proteobactérias.

Estirpes/Sondas	EUB338	ALF1b	BET42a
<i>Rhizobium tropici</i>	+ <sup>1</sup>	+	- <sup>2</sup>
<i>Burkholderia tropica</i>	+	-	+
<i>Azoarcus</i> sp.	+	+	-
<i>Azospirillum amazonense</i>	+	+	-
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	+	-	+
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	+	+	-
<i>Sphingomonas trueperi</i>	+	+	-
<i>Sphingomonas azotifigens</i>	+	+	-
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	+	+	-
Isolados	+	+	-

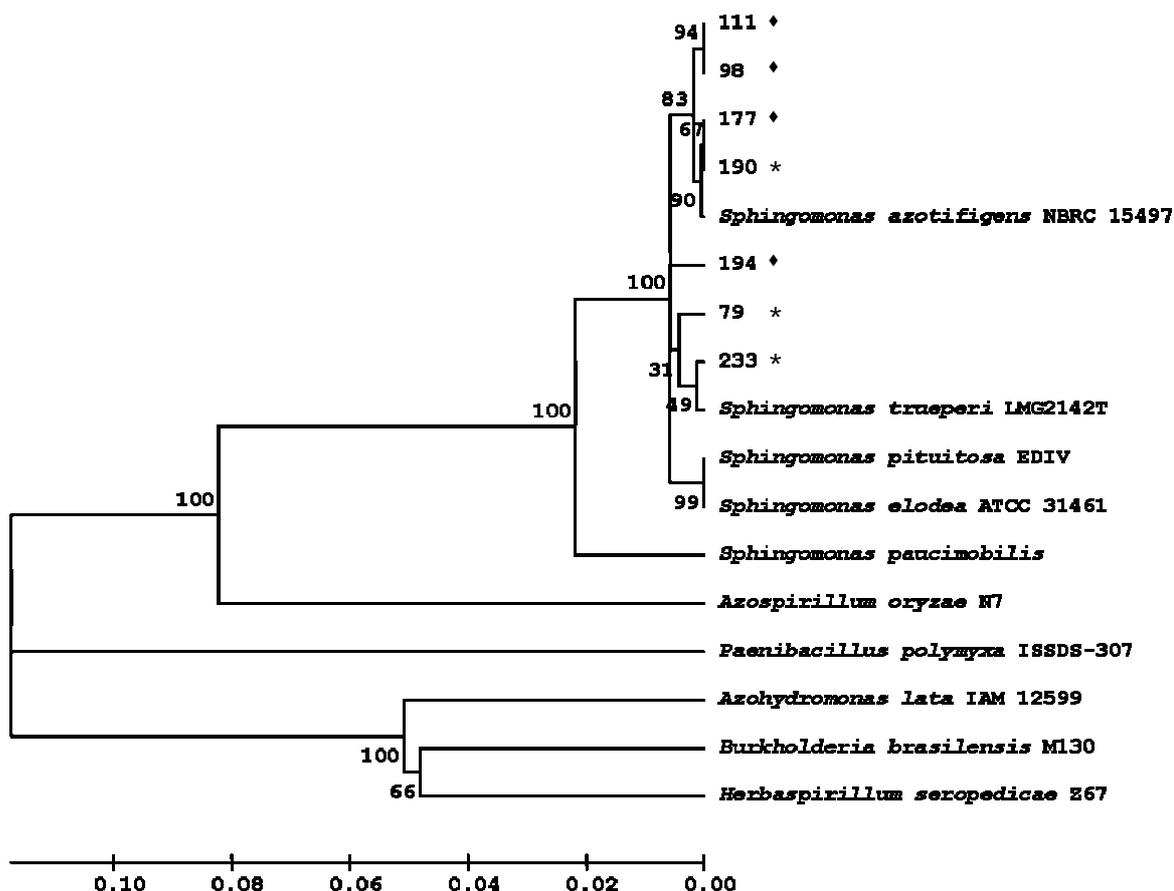
1. presença de sinal; 2. ausência de sinal.

### 3.5.2 Sequenciamento e análise filogenética da região 16S DNAr

Depois de amplificados, os produtos de PCR da região 16S DNAr foram purificados e sequenciados em um sequenciador automático MegaBace 1000. Os nucleotídeos foram reunidos e submetidos à montagem de seqüências contíguas com o auxílio de programas PHRED/PHRAP pelo setor de bioinformática da Embrapa Agrobiologia.

De forma geral, o resultado da análise de similaridade realizada no GenBank pelo programa BLASTn para os isolados mostrou similaridade de até 99% com estirpes do gênero *Sphingomonas*.

A árvore filogenética baseada na seqüência do gene 16S DNAr mostrou que os isolados apresentam similaridade maior que 95% com *S. azotifigens* (nº de acesso no GenBank AB217471.1) e *S. trueperi* (nº de acesso no GenBank X97776.1), confirmando os resultados da análise de BLAST (Figura 16). Embora os isolados e estirpes tipo, exceto *S. paucimobilis*, tenham apresentado elevado nível de similaridade, os isolados foram distribuídos em 2 grupos semelhantes aos encontrados por ARDRA e AFLP.



**Figura 16.** Árvore filogenética baseada nas seqüências parciais do gene 16S DNAr dos isolados, estirpes-tipo de *Sphingomonas* e outras proteobactérias fixadoras de nitrogênio. A árvore foi gerada pelo método *neighbour-joining*. A análise de *bootstrapping* foi calculada com 1000 repetições.

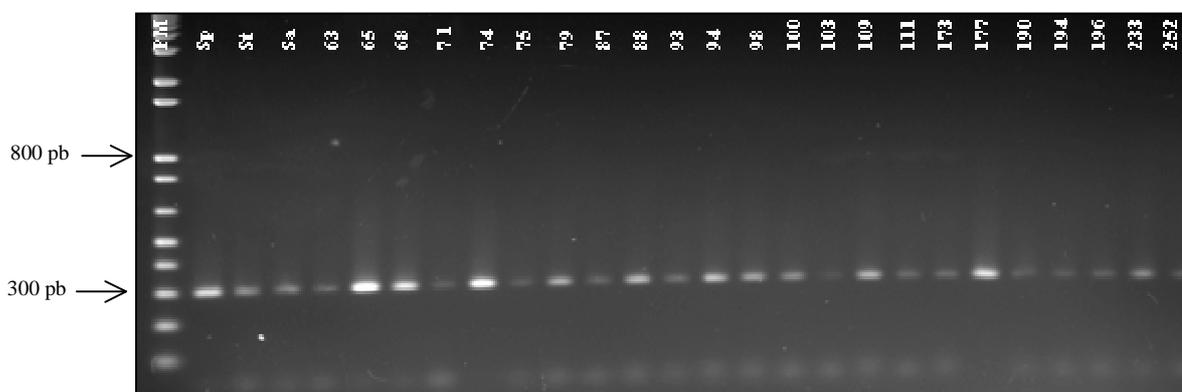
O gene 16S DNAr é considerado atualmente o melhor marcador filogenético para procariotos, principalmente por apresentar um elevado nível de conservação ao longo dos tempos (ROSADO et al., 1997). Entretanto, alguns autores vêm discutindo o uso desta técnica para classificar espécies de bactérias muito próximas (PEARCE et al., 2003). Algumas espécies podem apresentar até 99,5% de similaridade na seqüência deste gene, e ainda assim serem consideradas espécies distintas, como por exemplo, *S. azotifigens* e *S. trueperi* (XIE & YAKOTA, 2006), *Herbaspirillum frisingense* e *H. seropedicae* (KIRCHHOF et al., 2001). Ash et al. (1991) também demonstraram que as espécies de *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, e *B. thuringiensis* apresentam nível de similaridade nas seqüências do gene 16S DNAr maior que 97%.

A recomendação da utilização de outras técnicas baseadas em DNA genômico total, como AFLP e hibridização DNA:DNA, são procedentes, visto que a análise do gene 16S DNAr pode apresentar elevado nível de conservação e desta forma revelar baixo polimorfismo entre diferentes espécies.

#### 4.5.3 Identificação com iniciadores específicos

##### a) PCR

O produto amplificado por PCR com os iniciadores específicos, sphingo108f e sphingo420r, desenhados por Leys et al. (2004), geraram uma única banda de tamanho esperado (300 pb) para todos os isolados e estirpes-tipo utilizadas (Figura 17). Embora *S. azotifigens* não tenha sido utilizada para desenho dos iniciadores, apresentou amplificação do fragmento, confirmando a especificidade dos iniciadores para os membros do gênero *Sphingomonas*.



**Figura 17.** Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de amplificação da região flanqueada pelos iniciadores sphingo108f e sphingo420r. PM: Marcador de Peso Molecular 1 Kb DNA ladder - Invitrogen, Sa: *S. azotifigens*, Sp: *S. paucimobilis* e St: *S. trueperi*.

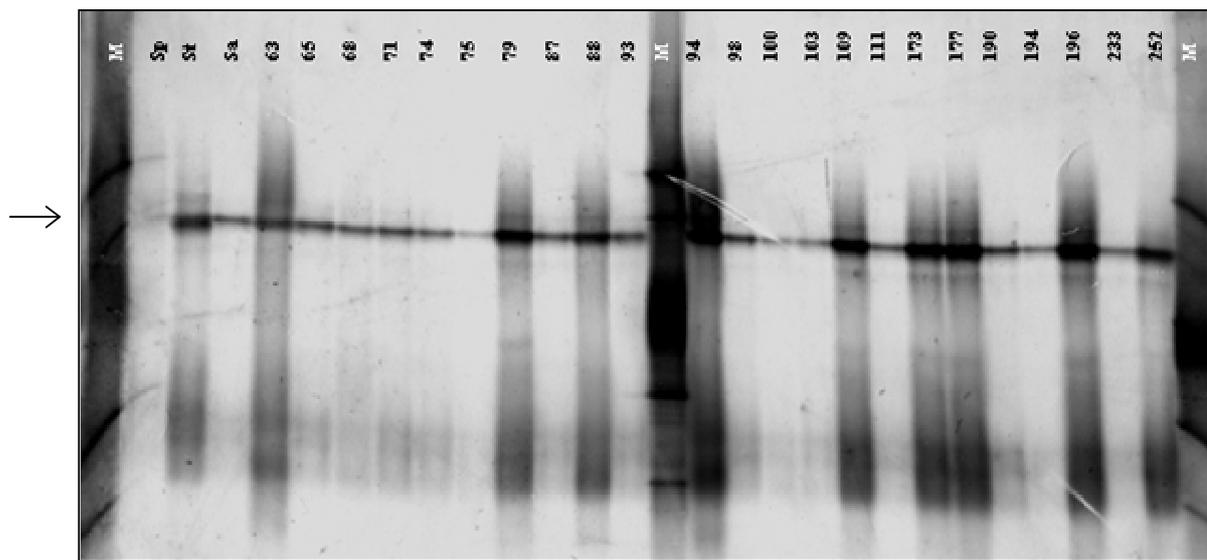
Bactérias do gênero *Sphingomonas* têm sido encontradas em muitos ambientes. Entretanto, um número limitado de estudos tem reportado técnicas para detecção específica deste gênero. Leung et al. (1997) foram os primeiros a desenvolverem um par de iniciadores degenerados (SPf-190/SPr1-852) para detecção por PCR de diferentes espécies de *Sphingomonas* presente nos solos. Entretanto, estes iniciadores não apresentaram uma cobertura total das espécies descritas e, a degeneração feita nos iniciadores foi direcionada para detectar diretamente a diversidade de *Sphingomonas* nos solos por DGGE. Posteriormente, Leys et al. (2004) desenharam um par de iniciadores - sphingo108f e sphingo420r - não-degenerados para detecção específica de todas as espécies de *Sphingomonas* conhecidas por PCR e permitindo a diferenciação das mesmas por análise de DGGE. Posteriormente ao desenvolvimento destes iniciadores específicos, muitos trabalhos mostram a eficiência dos mesmos na detecção de bactérias do gênero *Sphingomonas* de diversos ambientes (CUNLIFFE et al., 2006; UYTTEBROEK et al., 2007; SHI & BENDING, 2007).

##### b) DGGE

Conforme citado anteriormente, os iniciadores - sphingo108f e sphingo420r<sup>GC</sup> - têm sido utilizados para avaliar a diversidade de espécies de *Sphingomonas* por análise de DGGE. No intuito de verificar o perfil de DGGE dos isolados e estirpes tipo do gênero, analisou-se todas as amostras com os iniciadores citados em gel de DGGE 6%. Todas as estirpes testadas

amplificaram um único fragmento de aproximadamente 350 pb. A análise do gel de DGGE mostrou que as diferentes espécies e os isolados apresentaram o mesmo perfil nas condições testadas (Figura 18). Correlacionando este resultado com aquele obtido pela análise de DGGE para o gene 16S DNAr, era esperado que as espécies testadas não apresentassem perfis diferenciados. Leys et al. (2004), embora tenham desenhado um par de iniciadores para verificar a diversidade de bactérias do gênero *Sphingomonas*, também mostraram que diferentes espécies com similaridade > 97% do gene 16S DNAr apresentaram o mesmo perfil de DGGE.

De forma geral, a utilização deste par de iniciadores foi eficiente na identificação de bactérias do gênero *Sphingomonas*, mas a avaliação da diversidade para as espécies testadas e isolados foi inviável.



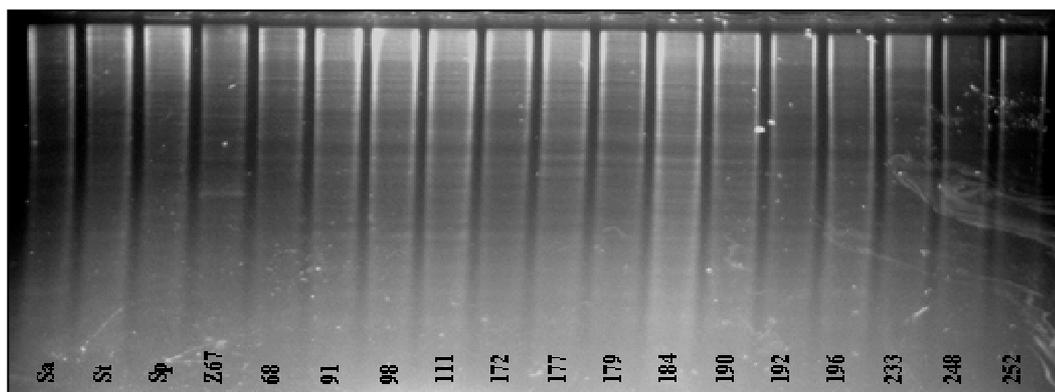
**Figura 18.** Análise de DGGE do fragmento de DNA amplificado com os iniciadores sphingo108f e sphingo420r<sup>CG</sup>. Marcador (M), *S. paucimobilis* (Sp), *S. trueperi* (St) e *S. azotifigens* (Sa).

#### 4.5.4 Hibridização DNA:DNA

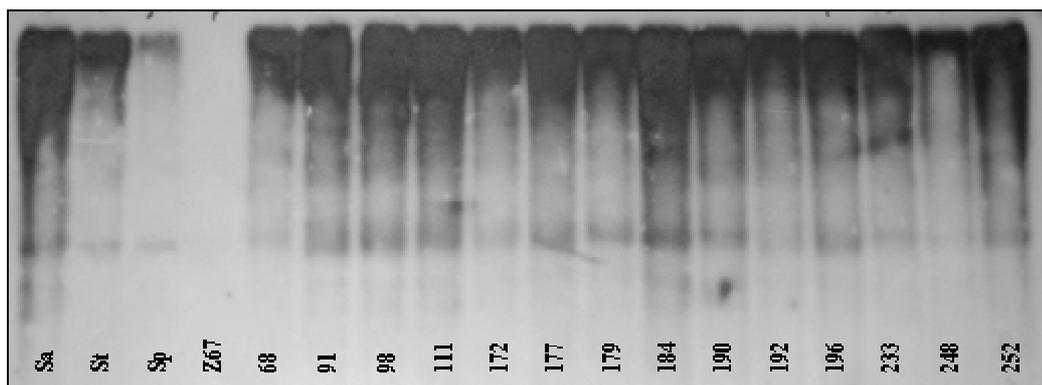
Após digestão total do DNA genômico com a endonuclease *EcoRI*, a eletroforese em gel de agarose 1% mostrou uma elevada concentração de fragmentos de alto peso molecular (Figura 19). Provavelmente, este resultado foi obtido pela existência de um baixo número de sítios de corte desta endonuclease no genoma das bactérias estudadas. Uma grande quantidade de fragmentos de tamanhos semelhantes interfere no processo de marcação com a sonda radioativa e na revelação da autoradiografia, devido à alta sensibilidade do filme de raio-X utilizado. Conforme o esperado, após o processo de revelação da autoradiografia, observou-se grande intensidade de sinal na parte superior das amostras, ocasionando uma saturação de sinal, impossibilitando a quantificação para análise da % de homologia das bactérias testadas (Figura 20).

Embora o processo não tenha sido concluído sob condições ideais, foi possível observar que o DNA de *S. azotifigens* digerido apresentou maior intensidade de sinal, seguido por *S. trueperi* que apresenta maior similaridade quando comparada com *S. paucimobilis*. Os isolados também apresentaram elevada intensidade de sinal. Os isolados 172, 179, 184, 192 e 248 foram identificados previamente como bactérias do gênero *Sphingomonas* não fixadores de nitrogênio. Dentre estes isolados, com exceção do isolado 248, o sinal de marcação foi semelhante aos demais isolados identificados como fixadores de nitrogênio. *Herbaspirillum*

*seropedicae* (ZAE67) foi utilizada como controle negativo e nenhum grau de marcação foi observado, confirmando a especificidade da sonda utilizada.



**Figura 19.** Digestão total do DNA genômico com a enzima *EcoRI* em gel de agarose 1% de Sa: *S. azotifigens*, Sp: *S. paucimobilis* e St: *S. trueperi*, ZAE67: *Herbaspirillum seropedicae*.



**Figura 20.** Autoradigrafia da membrana após hibridização com sonda de DNA genômico de Sa: *S. azotifigens*, Sp: *S. paucimobilis* e St: *S. trueperi*, ZAE67: *Herbaspirillum seropedicae*.

Esta técnica, assim como o seqüenciamento do gene 16S DNAr, são primordiais para o posicionamento taxonômico de novas estirpes, por isso, novas análises estão sendo feitas para que esta metodologia seja concluída de maneira precisa e eficiente. Resultados preliminares mostram que a digestão do DNA genômico total com a endonuclease de restrição, *RsaI*, apresenta distribuição mais homogêna dos fragmentos gerados (análise em andamento).

A avaliação geral dos testes moleculares utilizados para determinação da diversidade e posicionamento taxonômico dos isolados indicam que os mesmos se dividem em dois grupos distintos, onde um dos grupos apresenta maior similaridade genética com *S. azotifigens* quando comparado com *S. trueperi* e *S. paucimobilis*.

## 4.5 Características Fenotípicas e Quimiotaxonômicas

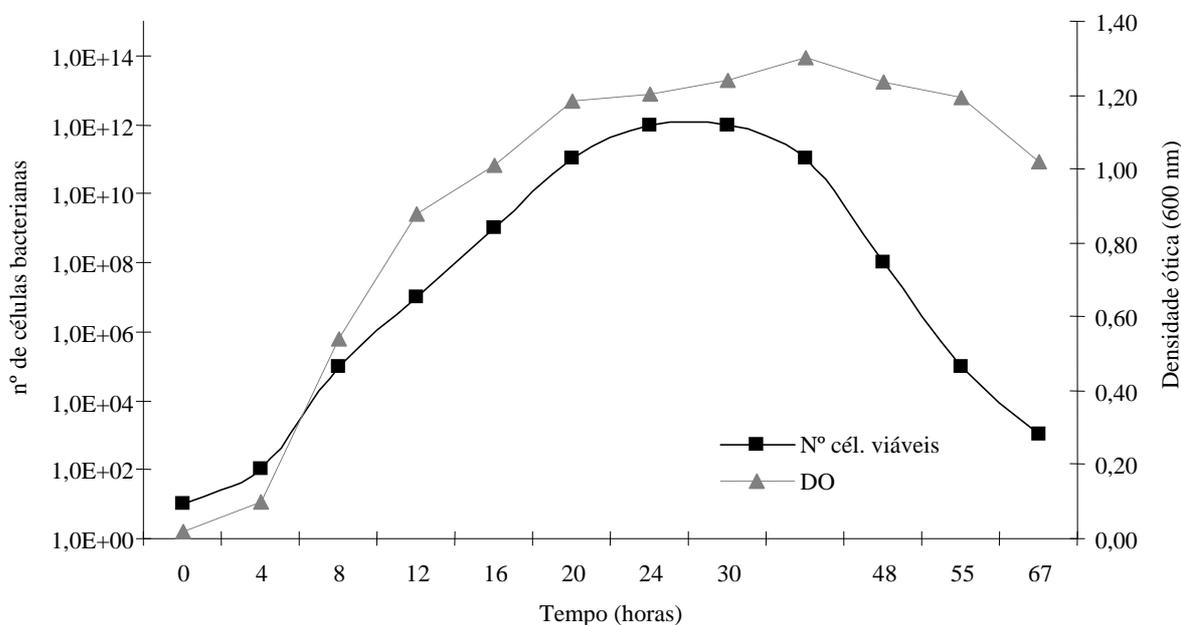
### 4.5.1 Curva de crescimento

O cultivo dos organismos em condições laboratoriais é um pré-requisito para um estudo adequado e, portanto, é necessário o conhecimento de suas exigências. Quando

bactérias são transferidas para um meio de cultivo, sem que qualquer mudança tenha sido feita no mesmo, o crescimento segue uma curva típica onde tempo e forma de cada fase desta curva varia entre as diferentes bactérias. Embora as bactérias desenvolvam-se bem em meios de cultura sólidos, os estudos de crescimento são feitos essencialmente em meios líquidos e as considerações que seguem são válidas para essas condições.

Ao se fazer o experimento para estimativa do número de células viáveis, através da contagem do número de células, e a determinação do aumento da massa bacteriana com medidas da densidade ótica (DO) de *Sphingomonas* spp. (estirpe 194), observou-se que os resultados obtidos foram estreitamente correspondentes (Anexo C) e o seu crescimento seguiu uma curva característica apresentando 4 fases distintas (Figura 21).

Na Fase Lag, obtida no período de 0 a 4 horas após inoculação, não houve aumento significativo do número de células. Este período é considerado pelos microbiologistas como o período para adaptação das células ao novo ambiente.



**Figura 21.** Curva de crescimento de *Sphingomonas* spp. (estirpe 194) em meio de cultivo DYGS, pH 6,0 mantido sob agitação de 150 rpm e temperatura de 30°C.

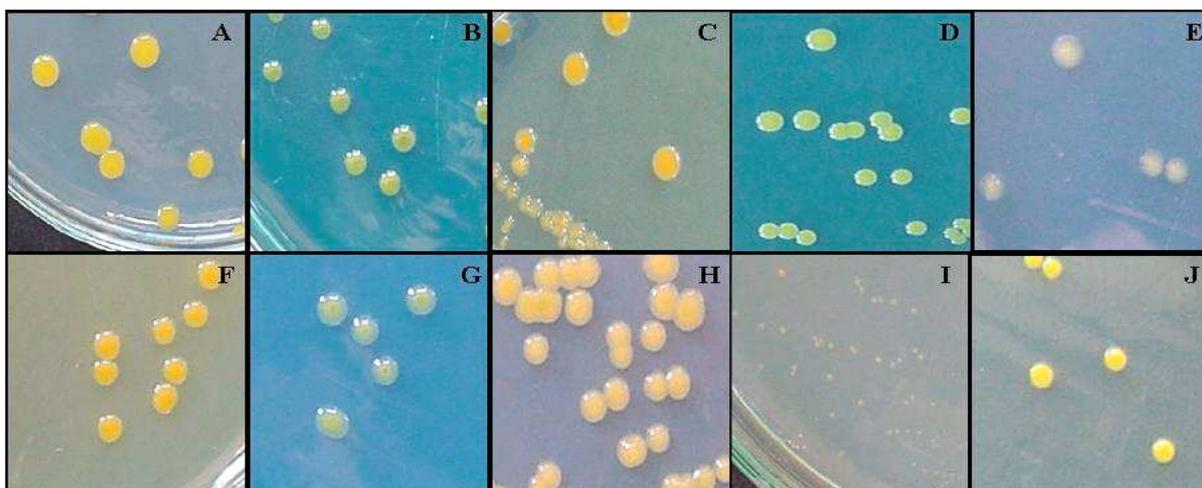
A segunda fase, denominada Fase Exponencial ou Log, ocorrida entre 4 e 20 horas de cultivo, as células se multiplicaram a uma taxa constante até atingir um máximo de crescimento. Após 20 horas de cultivo, iniciou-se a Fase Estacionária, onde a relação entre o número total de células em divisão e ao número de células mortas, resulta na verdadeira população celular estacionária. Geralmente, esta fase chega ao final devido à escassez de nutrientes essenciais, diminuição de oxigênio em cultura aeróbia ou acúmulo de metabólitos tóxicos. Na última fase da curva, a Fase de Declínio, foi possível observar que o número de células viáveis diminuiu, assim como o valor de DO. Nesta fase, as condições se tornam fortemente impróprias para o crescimento, as células se reproduzem mais lentamente e as células mortas aumentam em números crescentes (ALTERTHUM, 2004).

Em todas as fases da curva de crescimento foi claramente observado que o número de células viáveis está diretamente relacionado à medida de DO do meio de cultivo. As informações geradas por este ensaio são de extrema importância para o conhecimento do comportamento fisiológico destas bactérias nas condições testadas. Além disso, a estimativa

do número de células viáveis a partir de mensurações de DO é uma grande vantagem, visto que a técnica de contagem, embora eficiente, é muito mais laboriosa.

#### 4.5.2 Morfologia de colônias

As colônias apresentaram coloração variada de acordo com o meio de cultivo utilizado: amarela em meios sem indicador; verde com corante azul de bromotimol e laranja em meios com sacarose, de forma circular com bordo regular, elevação lente, superfície lisa e de característica opaca. Nos meios ricos como DYGS e Batata, houve maior produção de goma quando comparados com os outros meios de cultivo. A maioria dos isolados apresentou maior semelhança de colônias com *S. azotifigens*, com exceção do isolado 103 que foi mais similar a *S. paucimobilis*. A figura 22 mostra o aspecto geral das colônias de *Sphingomonas* spp. (estirpe 194) nos diferentes meios de cultivo utilizados. De forma geral, a morfologia de colônias corrobora com os dados descritos na literatura, onde a coloração amarela surge como indicativo da produção do carotenóide nosthandina e o aspecto gomoso das colônias, provavelmente está relacionado à produção de exopolissacarídeo por membros do gênero *Sphingomonas* (YABUCCHI et al., 1990).



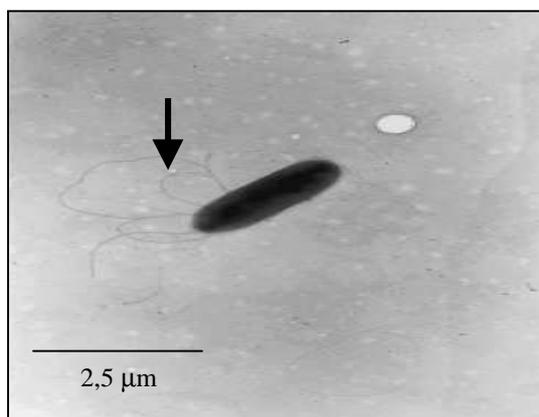
**Figura 22.** Morfologia das colônias de *Sphingomonas* spp. (estirpe 194) com 7 dias de cultivo nos meio Batata (A), NFb 3x (B), LGI (C), DYGS (D); 79 (E); LGI-P (F); JNFb (G); Batata-P (H); JMV (I) e NB (J).

#### 4.5.3 Morfologia celular

De forma geral, os isolados apresentam células individualizadas em forma de bastonete, movimento espiralóide, semelhantes às células de *Herbaspirillum* spp., com dimensões de 2,5 a 3,0  $\mu\text{m}$  x 1,0 a 1,5  $\mu\text{m}$ . Ao microscópio eletrônico de transmissão foi possível observar a presença de flagelos polares, caracterizando as bactérias como lofotríquia (Figura 23).

#### 4.5.4 Reação de gram e testes enzimáticos

As bactérias foram identificadas como Gram-negativas, apresentando testes de oxidase, hidrólise de Tween-80 e gelatinase negativos e catalase positivo (Tabela 10). Sob condições ótimas de crescimento em meio líquido sob agitação os isolados cresceram em uma faixa de pH entre 5,0 a 7,5, e sob condições de fixação de nitrogênio a faixa foi mais restrita, de 5,5 a 6,5.



**Figura 23.** Micrografia de microscopia eletrônica de transmissão (MET) de *Spingomonas* spp. (estirpe 194), evidenciando a célula em forma de bastonete e a estrutura da inserção dos flagelos.

Os isolados foram capazes de crescer sob temperaturas entre 22 a 34°C (Tabela 10). De acordo com as faixas de pH e temperatura encontradas, as bactérias foram classificadas como neutrófilas e mesófilas, respectivamente.

Os resultados encontrados para faixas de pH e temperatura, reação de gram e testes enzimáticos estão de acordo com as características gerais encontradas em bactérias do gênero *Spingomonas* descritas por Yabucchi et al. (1990). No nível de espécie, a grande maioria segue o padrão descrito no gênero. Resultados semelhantes foram encontrados por Xie & Yakota (2006) no trabalho de descrição da espécie fixadora de nitrogênio, *S. azotifigens*.

#### 4.5.5 Tolerância a NaCl

Neste estudo, a concentração máxima tolerada pelos isolados cultivados em meio DYGS suplementado com diferentes concentrações de NaCl foi de 50 g l<sup>-1</sup> (5 %) para a maioria dos isolados testados. Alguns isolados foram capazes de se desenvolver na concentração de 80 g l<sup>-1</sup> (8 %) (Tabela 10).

Em 2001, Daane et al. detectaram a presença de bactérias do gênero *Spingomonas* associadas a plantas de ambientes salinos, entretanto não avaliaram o nível de tolerância das estirpes. *S. azotifigens*, também isolada de plantas de arroz, apresentou inibição de crescimento na concentração de 2,5 % de NaCl (XIE & YAKOTA, 2006). Nóbrega et al., (2004) trabalhando com *Azospirillum irakense*, espécie isolada de raízes de arroz, mostraram que esta espécie foi tolerante a 5 % de NaCl.

Estes resultados sugerem que, provavelmente, as bactérias testadas possuem um mecanismo de osmo adaptação que evita a desidratação das células, apresentando resposta adaptativa a condições salinas.

#### 4.5.6 Tolerância à sacarose

Foi possível observar crescimento dos isolados nos meios com concentração de até 10 % de sacarose (Tabela 10). Este resultado sugere que os isolados testados apresentam alta tolerância osmótica, assim como outras bactérias dizotróficas como *Burkholderia* spp. (PERIN, 2007) e *Gluconacetobacter diazotrophicus* (DÓBEREINER et al., 1995) encontradas no interior de plantas de cana-de-açúcar. Perin (2007), na etapa de identificação de isolados obtidos do interior de plantas de cana-de-açúcar, obteve 4 bactérias identificados pelo sistema Biolog como *Spingomonas* spp.. (comunicação pessoal).

**Tabela 10.** Resumo de algumas características fisiológicas das estirpes tipo *S. trueperi* e *S. azotifigens* e isolados bacterianos.

<b>Características</b>	<b><i>S. trueperi</i></b>	<b><i>S. azotifigens</i></b>	<b>Isolados</b>
Cor da Colônia	Amarela	Amarela	Amarela
Reação de Gram	-*	-*	-
Motilidade	+	+	+
Flagelos	+*	+*	+
Tolerância a NaCl	Até 10%*	Até 2,5%*	Até 8%
Tolerância a sacarose	nd	nd	Até 10%
Temperatura	nd	25 a 37°C*	25 a 34°C
pH	nd	nd	5 - 7,5
Oxidase	+*	v*	-
Tween 80	+*	+*	-
Catalase	+*	+*	+
Gelatinase	-*	v*	-
Cresc. semi-sólido	-	+	+
ARA	-	+	+
Solubilização de fosfato	-	-	-
Produção de AIA	+	+	+

\* Informações extraídas dos trabalhos de descrição das espécies *S. trueperi* (KAMPFER et al., 1997) e *S. azotifigens* (XIE & YAKOTA, 2006); v - dados variáveis entre estirpes; nd - não determinado.

A cana-de-açúcar foi identificada com hospedeira de diversas espécies de bactérias diazotróficas endofíticas, sendo as principais *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* spp. e *Azospirillum* spp. (JAMES & OLIVARES, 1997; BALDANI et al., 1997; JAMES, 2000; BODDEY et al., 2003). Sabe-se que o interior de plantas de cana-de-açúcar apresenta teores de sacarose elevados, podendo ser considerado um fator limitante para o estabelecimento de microrganismos pelo potencial osmótico gerado. Desta forma, é possível que as bactérias testadas apresentem um mecanismo de osmo adaptação, podendo colonizar plantas como a cana-de-açúcar.

#### 4.5.7 Metabolismo de carbono

Döbereiner et al. (1995) descreveram uma metodologia específica para o isolamento de bactérias diazotróficas, apresentando como fator principal o desenvolvimento de meios de cultivos semi-sólidos. Admitindo-se que o metabolismo de carbono bacteriano apresenta grandes variações, cultivamos os isolados nos meios utilizados para os diferentes gêneros e espécies de diazotróficos, conforme descrito por Döbereiner et al. (1995). Os isolados formaram película característica de diazotróficos somente nos meios JNFb, LGI, LGI-P e NFb. O tempo para a formação da película variou de 5 a 10 dias de incubação.

O sistema BIOLOG é uma ferramenta comumente utilizada na geração de perfis fisiológicos bacterianos (BIOLOG manual, 1993; McCAIG et al., 2001; TORSVIK et al., 1996). As microplacas de BIOLOG GN (Gram-negativo) são tipicamente empregadas nos

estudos de diversas estirpes bacterianas e a análise é baseada na utilização de 95 diferentes fontes de carbono.

Os isolados 79, 98, 111, 177, 190, 194, 196 e 233 e *Sphingomonas azotifigens* e *S. trueperi* foram cultivados no meio de cultura BUG e posteriormente testados em microplacas de BIOLOG GN. Comparando-se o perfil de utilização de fontes de carbono gerado com resultados do banco de dados Microlog, todos os isolados foram identificados como *Sphingomonas* spp., apresentando similaridade com as espécies *S. paucimobilis* e *S. sanguis*. O teste auxiliou na identificação do gênero, mas não é possível utilizá-lo para determinar o posicionamento taxonômico dos isolados. A utilização das 95 fontes de carbono apresentou variabilidade entre isolados e estirpes tipo. Entretanto, 11 fontes de carbono foram usadas por todas as bactérias testadas e somente 4 diferiram de *S. azotifigens* e *S. trueperi* (Tabela 11).

Embora este teste seja muito eficiente na determinação do perfil fisiológico, proporciona uma boa resolução a nível de espécie, mas tem mostrado uma menor eficiência na discriminação de estirpes (McSPADDEN-GARDENER et al., 2000; McCAIG et al., 2001). Outra limitação deste teste é que ele consome muito tempo (McCAIG et al., 2001). Além disso, o sistema BIOLOG<sup>®</sup> pode identificar incorretamente os isolados bacterianos devido à limitação do bando de dados da Microlog (ACHOUAK et al., 1999; PICARD et al., 2000).

**Tabela 11.** Perfil geral do teste em microplacas de BIOLOG GN dos isolados e *S. azotifigens* e *S. trueperi*.

Fontes de carbono	<i>S. azotifigens</i>	<i>S. trueperi</i>	Isolados
$\alpha$ -ciclodextrina, dextrina, glicogênio, tween 40, tween 80, N-acetil-glucosamina, gentiobiose, $\alpha$ -D-glucose, maltose, ácido succinico, D-galactose, L-arabinose, celobiose	+	+	+
L-alanina	-	+	+
L-aspartato	+	+	-
Frutose	+	+	-
Piruvato	+	-	-

#### 4.5.8 Solubilização de fosfato

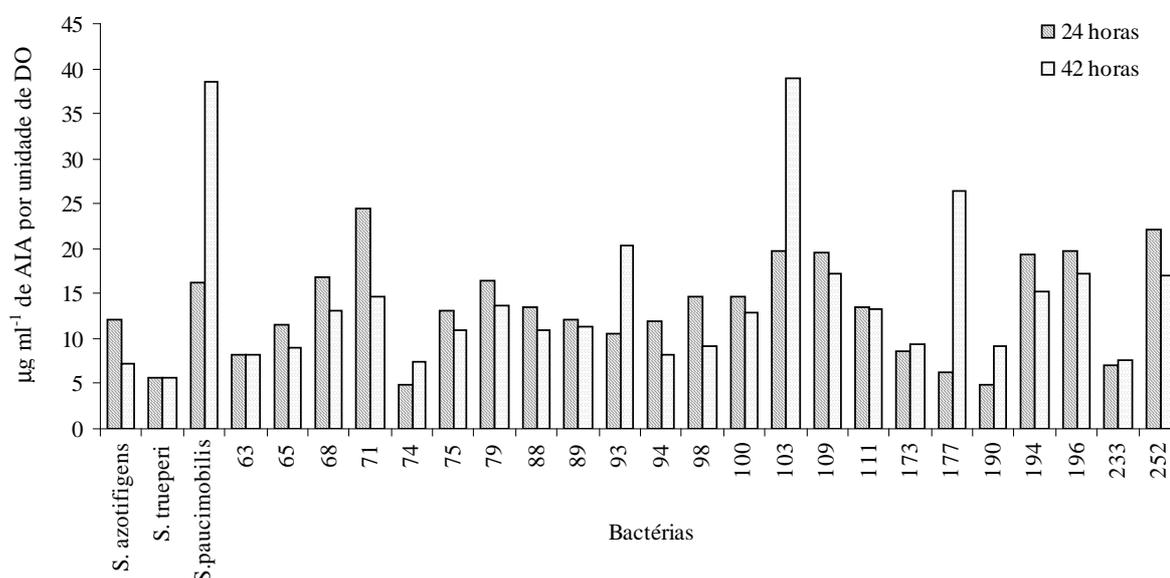
Das estirpes testadas neste estudo, *Burkholderia vietnamiensis* e *B. tropica* utilizadas como controles positivos, formaram em torno de si um halo facilmente visível por contraste com o meio opaco, indicando capacidade de solubilização de fosfato *in vitro*, conforme descrito por Perin (2007). Já *B. silvatlantica*, os isolados bacterianos, *S. azotifigens*, *S. paucimobilis* e *S. trueperi* não solubilizaram fosfato nas condições testadas.

O fósforo é um nutriente essencial às plantas, mas encontra-se em baixa disponibilidade em solos tropicais. Muitos microrganismos participam no ciclo do fósforo transformando e disponibilizando esse elemento para as plantas, através da imobilização de fosfato solúvel ou pela solubilização de fosfato insolúvel, apresentando potencial de uso na forma de inoculante (SILVA FILHO et al., 2002; SOUCHIE et al., 2005). Um maior entendimento da capacidade e da eficiência de microrganismos em solubilizar diferentes fosfatos pode levar à seleção de isolados com alto potencial de uso para a inoculação em plantas (SOUCHIE et al., 2007).

#### 4.5.9 Produção de AIA

O triptofano é considerado o principal precursor da biosíntese de AIA, por isso foi utilizado como substrato no meio de cultivo para análise de compostos indólicos, principalmente AIA. A produção de AIA pelos isolados e estirpes-tipo foi detectada por colorimetria usando o reagente de Salkowski. As avaliações foram feitas com 24 e 42 horas. Alguns trabalhos de produção de compostos indol por bactérias mostram que o maior acúmulo de AIA ocorre na fase estacionária de crescimento (TSAVKELOVA et al., 2005; 2007). Para determinar a fase de maior acúmulo de AIA das bactérias em estudo, foi realizado um ensaio preliminar com *Sphingomonas* spp. (estirpe 194), cultivada em meio DYGS acrescido de 200  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de L-triptofano. Este ensaio mostrou que a produção de AIA começou a partir de 4 horas de cultivo e obteve uma produção máxima após 42 horas. Confrontando estes dados com a curva de crescimento realizada previamente (Figura 21), concluiu-se que efetivamente a maior acumulação de AIA ocorreu durante a fase estacionária.

Todos os isolados bacterianos e estirpes-tipo foram capazes de produzir AIA na presença de L-triptofano nas condições testadas. Houve grande variação na produção deste fitohormônio entre os isolados (Figura 24). A maioria dos isolados e *S. azotifigens*, apresentaram uma produção média de 15  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de AIA por unidade de DO. *S. trueperi* e os isolados 63, 74, 173, 190 e 233 mostraram os menores valores na produção deste fitohormônio, enquanto os isolados 194, 177, 103 e *S. paucimobilis* apresentaram a maior produção. Durante o cultivo, houve acúmulo de AIA para alguns isolados, enquanto outros mostraram diminuição na sua concentração (Figura 24).



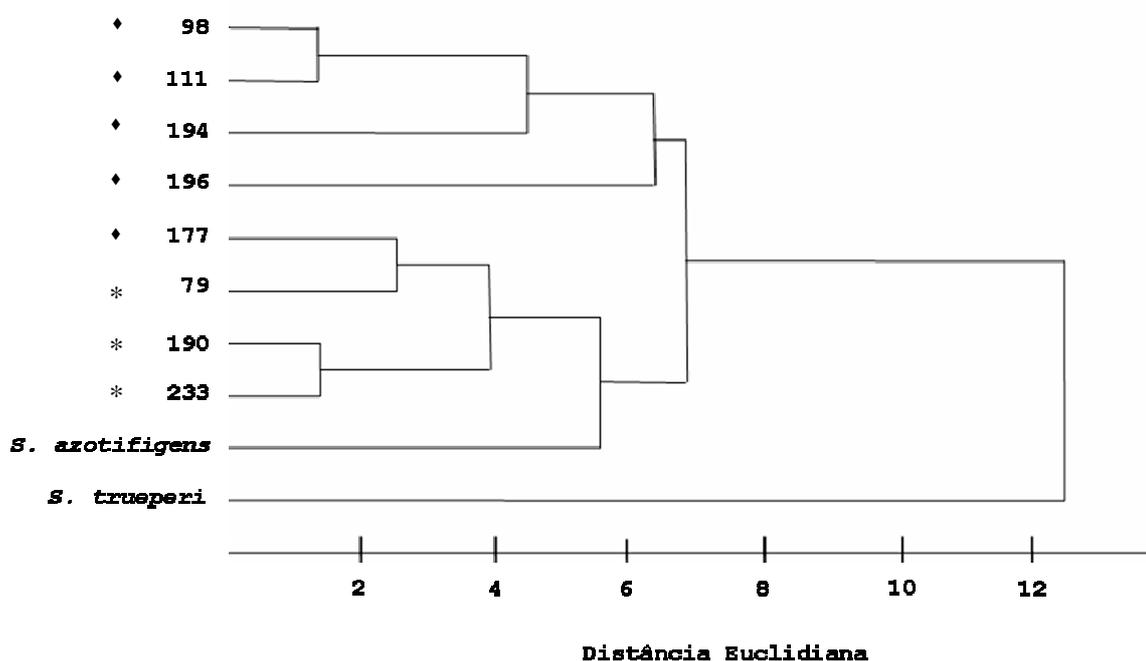
**Figura 24.** Produção de AIA *in vitro* por estirpes-tipo de *Sphingomonas* e isolados bacterianos.

Muitos trabalhos relatam a variabilidade na produção deste composto por bactérias fixadoras de nitrogênio, apresentando uma média de produção de 20 a 100  $\mu\text{g}$  de AIA  $\text{ml}^{-1}$  (RADWAN et al., 2002; PEDRAZA et al., 2004; REIS JUNIOR, 2004; MARCHIORO, 2005). Tsavkelova et al. (2005; 2007) relatam a ocorrência de uma estirpe de *Sphingomonas* spp., isolada de plantas de orquídeas, com elevado potencial de produção de AIA. Estes autores mostram que com 200  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de DL-triptofano, a estirpe de *Sphingomonas* spp.

testada foi capaz de produzir  $68 \mu\text{g ml}^{-1}$  de AIA por unidade de DO. Além da produção de AIA, também foi demonstrado por estes autores o efeito estimulatório de AIA produzido por *Sphingomonas* spp., na formação do sistema radicular de plântulas de feijão e na germinação de sementes de orquídeas.

#### 4.5.10 FAME

A composição de ácidos graxos de bactérias do gênero *Sphingomonas* tem sido muito utilizada na identificação de diferentes espécies. A análise de FAME foi feita com os isolados, 79, 98, 111, 177, 190, 194, 196, 233, *S. trueperi* e *S. azotifigens*. O resultado da análise de ácidos graxos mostrou que houve uma baixa similaridade entre os perfis dos isolados, *Sphingomonas azotifigens* e *S. trueperi* e a biblioteca de referência do sistema Sherlock da MIDI. Todos os isolados e *S. azotifigens* apresentaram maior similaridade com a espécie *Novoshingobium capsulatum*, embora com índice de similaridade muito próximo ao limite mínimo aceitável pelo sistema Sherlock (0,300) (Figura 25). A espécie *S. trueperi* não foi similar às espécies do banco de dados utilizado, apresentando valores de similaridade de 0,594. Neste teste, uma boa identificação apresenta valores de índice de similaridade  $> 0,500$ . Valores acima de 0,300 indicam que o isolado é um representante atípico dentro de uma espécie. Este resultado indica que os isolados e as estirpes de *Sphingomonas* testadas não pertencem a qualquer espécie presente na biblioteca de referência TSBA 50 5.00, entretanto apresentam uma elevada relação com bactérias do gênero *Sphingomonas*, visto que o gênero *Novoshingobium* é uma subdivisão de *Sphingomonas* porposta por Takeuchi et al. (2001).



**Figura 25.** Dendrograma de similaridade construído com base no perfil de ácidos graxos celulares dos isolados e estirpes-tipo de *Sphingomonas*.

A análise do agrupamento dos perfis de ácidos graxos (sistema Tracker) indicou que todos os isolados e *S. azotifigens* pertencem à mesma espécie (distância euclidiana  $< 10$ ). Esta análise também mostrou que os isolados 190 e 233 apresentam perfis idênticos, assim como 98 e 111 (distância euclidiana  $< 2$ ) (Figura 25). Os isolados foram subdivididos em dois grupos semelhantes aos encontrados por ARDRA e AFLP (indicados pelos símbolos). O perfil de ácidos graxos dos isolados e estirpes-tipo encontra-se na tabela 12. Conforme o

esperado, o ácido oléico (C18:1) foi o maior componente dos ácidos graxos totais, e o ácido mirístico (C14:0 2-OH) o maior ácido graxo hidroxilado em todos os isolados e estirpes-tipo testados. Nenhum ácido graxo 3-OH foi encontrado nos isolados e estirpes-tipo.

Quando se comparou os resultados obtidos nesta análise com os descritos por Xie & Yakota (2006), no trabalho de descrição da espécie *S. azotifigens*, observou-se uma variação nos valores encontrados e presença de ácido palmitoléico (16:1 $\omega$ 5c) em *S. azotifigens* e o ácido pentadecanóico (2-OH 15:0) em *S. trueperi*, ambos não encontrados pelos autores. Outra diferença observada foi a presença de ácido láurico (2-OH 12:0) nos isolados de *Sphingomonas* spp. e sua ausência em *S. azotifigens* (Tabela 12).

Os perfis de lipídeos têm encontrado muitas aplicações na quimiotaxonomia bacteriana, incluindo a circunscrição de *Sphingomonas* spp. Características distintivas destes organismos incluem a ausência de ácidos 3-OH, e a presença de ácidos mirísticos (2-OH-14:0) e oléico (18:1) como principais componentes, juntamente com uma série de glicosfingolipídeos (YAMAMOTO et al., 1978; YABUUCHI et al., 1999; KAWAHARA et al., 1991; TAKEUCHI et al., 1995; KAMPFER et al., 1997). Com o avanço desta técnica, o método MIDI foi desenvolvido para extrair ácidos graxos de culturas puras de isolados bacterianos com propósito de identificação destes organismos (SCHUTTER & DICK, 2000).

**Tabela 12.** Composição de ácidos graxos celulares (%) dos isolados, *S. azotifigens* e *S. trueperi*.

Ácidos graxos	190	233	79	177	98	111	194	196
<b>Ácidos saturados</b>								
C14:0	0,73	0,58	0,96	0,00	0,53	0,68	0,95	0,84
C16:0	19,34	19,68	17,96	17,35	19,25	18,83	19,69	17,24
C18:0	0,63	0,51	0,95	0,80	0,68	0,55	0,91	0,94
Summed feature3*	1,17	1,19	2,24	1,27	1,04	1,04	1,70	1,54
<b>Ácidos insaturados</b>								
C17:1 $\omega$ 6c	1,41	1,77	3,27	3,76	1,10	1,07	1,94	2,34
C18:1 $\omega$ 7c	53,16	52,64	52,83	49,79	57,56	57,18	57,70	53,83
C18: $\omega$ 5c	2,49	0,00	3,14	2,35	1,54	1,66	2,05	2,21
11 methyl 18:1 $\omega$ 7c	4,46	4,02	6,15	5,59	4,38	3,74	5,25	5,57
<b>Ácidos hidroxilados</b>								
2-OH C14:0	12,77	14,79	9,02	14,30	10,56	11,56	7,06	12,74
2-OH C16:0	0,77	1,27	0,00	1,00	0,82	0,95	0,84	0,85

## 5. CONCLUSÕES

- ✓ Dos 50 isolados provenientes de plantas de arroz, somente 22 apresentam o gene *nifH* e fixam nitrogênio em condições microaerofílicas;
- ✓ O resultado da análise de diversidade genética revelou que os isolados se dividiram em 2 grupos distintos;
- ✓ A análise da seqüência de nucleotídeos do gene 16S DNAr, juntamente com os demais testes realizados para obtenção do posicionamento taxonômico dos isolados, permitiram identificá-los como membros do gênero *Sphingomonas*;
- ✓ Em nível de espécie, *S. azotifigens* apresentou maior similaridade genética com as bactérias testadas;
- ✓ A análise polifásica baseada nos testes moleculares, bioquímicos e fisiológicos foi consistente na classificação dos organismos em estudo;
- ✓ Nenhuma estirpe-tipo e os isolados testados foram capazes de solubilizar fosfato;
- ✓ Todos os isolados testados foram capazes de utilizar o L-triptofano como precursor na biossíntese de AIA.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A maioria dos estudos de bactérias associadas a arroz está relacionada à fixação biológica de nitrogênio, entretanto, estudos de identificação e avaliação de diversidade da população de bactérias do gênero *Sphingomonas* de tecidos de plantas de arroz ainda não foram realizados.

Na presente dissertação, as bactérias diazotróficas obtidas de tecidos de arroz e isoladas em estudos prévios, foram identificadas e caracterizadas de acordo com uma abordagem polifásica. A taxonomia das bactérias foi baseada em testes moleculares como ARDRA, AFLP, DGGE, seqüenciamento parcial do 16S DNAr e na análise do perfil fisiológico e bioquímico. Primeiramente foi demonstrado que somente 50% dos isolados obtidos de tecidos de plantas de arroz apresentaram o gene relacionado à FBN e foram capazes de mostrar atividade da nitrogenase *in vitro*. Dentre os isolados fixadores de nitrogênio, os resultados obtidos pelo ARDRA, AFLP e FAME mostraram claramente que os isolados se dividiram em dois grupos distintos, onde 27 % dos isolados apresentaram maior similaridade com a espécie *S. azotifigens*. As análises da seqüência parcial do gene 16S DNAr e as demais técnicas utilizadas para posicionamento taxonômico dos isolados permitiram a sua classificação no nível de gênero. Embora a técnica de hibridização DNA:DNA não tenha sido finalizada, os resultados preliminares sugerem que os isolados apresentam maior similaridade genética com as espécies *S. azotifigens* seguida da espécie *S. trueperi*. Na classificação polifásica utilizada, embora na maioria das vezes os métodos tenham sido concordantes, em alguns casos esses resultados foram ambíguos, resultando na alocação dos isolados em grupos diferentes pelos métodos utilizados. Isso pode ser devido ao fato de que, às vezes, uma mesma espécie de bactéria pode apresentar perfis bioquímicos e fisiológicos diferenciados em função da expressão diferenciada dos seus genes.

Os resultados dos testes fisiológicos mostram que estas bactérias têm potencial para contribuir no desenvolvimento das plantas hospedeiras através da combinação dos mecanismos de fixação biológica de nitrogênio e produção de AIA. Vale a pena ressaltar que estas bactérias podem apresentar outros mecanismos de ação na promoção de crescimento vegetal, por isso, estudos posteriores devem ser realizados.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, Ângela Alexandra Valente. **Identificação de Bactérias Filamentosas em Processos de Lamas Activadas através da Técnica de Hibridização in-situ de Fluorescência (FISH)**. 2004. 142p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) - UM/DEB, Braga, Portugal.

ACHOUAK, W.; NORMAND, P.; HEULIN, T. Comparative phylogeny of *rrs* and *nifH* genes in the Bacillaceae. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 961-967, 1999.

ADHIKARI, T. B.; JOSEPH, C. M.; YANG, G.; PHILLIPS, D. A.; NELSON, L. M. Evaluation of bacteria isolated from rice for plant growth promotion and biological control of seedling disease of rice. **Canadian Journal Microbiology**, v.47, nº10, p.916-924, 2001.

ALTERTHUM, F. Crescimento bacteriano. In: TRABULSI, L. R. & ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. - São Paulo: Editora Atheneu, 2004. p. 31-36.

AMANN, R.; BINDER, B. J.; OLSON, R. J.; CHISHOLM, S. W.; DEVEREUX, R.; STAHL, D. A. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.1919-1925, 1990.

AMANN, R.; SNAIDR, J.; WAGNER, M.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. -H. *In situ* visualization of high genetic diversity in a natural microbial community. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 178, p. 3496-3500, 1995.

AMANN, R.; FUCHS, B. M.; BEHRENS, S. The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. **Current Opinion in Biotechnology**, v.12, nº 3, p. 231-236, 2001.

ANDERSON A. J. & DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.54, p. 450-472, 1990.

ANDERSON, G. R. Nitrogen fixation by *Pseudomonas*-like soil bacteria. **Journal of Bacteriology**, v.70, p.129-133, 1955.

ASH, C.; FARROW, J. A.; DORSCH, M.; STACKEBRANDT, E.; COLLINS, M. D. Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.41, p. 343-346, 1991.

AST, J. C.; CLEENWERCK, I.; ENGELBEEN, K.; URBANCZYK, H. Y. K.; THOMPSON, F. L.; DE VOS, P.; DUNLAP, P. V. *Photobacterium kishitanii* sp. nov., a luminous marine bacterium symbiotic with deep-sea fishes **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.57, p.2073 - 2078, 2007.

AUMAN, A. J.; SPEAKE, C. C.; LIDSTROM, M. E. *nifH* Sequences and Nitrogen Fixation in Type I and Type II Methanotrophs **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p. 4009 - 4016. 2001.

AYYADURAI, N.; NAIK, P. R.; RAO, M. S.; KUMAR, R. S.; SAMRAT, S. K.; MANOHAR, M.; SAKTHIVE, N. Isolation and characterization of a novel banana rhizosphere bacterium as fungal antagonist and microbial adjuvant in micropropagation of banana. **Journal of Applied Microbiology**, v.100, nº5, p. 926-37, 2006.

AZEVEDO, M. S. **Influência do solo e da planta hospedeira sobre a diversidade gênica de isolados de *Azospirillum amazonense* associados às raízes de arroz, milho e sorgo.** 1998. 110p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

BALAJEE, S. A.; GRIBSKOV, J.; BRANDT, M.; ITO, J.; FOTHERGILL, A.; MARR, K. A. Mistaken identity: *Neosartorya pseudofischeri* and its anamorph masquerading as *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p.5996 -5999, 2005.

BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 29, nº 5/6, p. 911-922, 1997.

BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. S.; BALDANI, V. L. D. Potencial biotecnológico de bactérias diazotróficas associativas e endofíticas. In: SERAFINI, L. A., BARROS, N. M., AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**, Caxias do Sul: EDUCS, p. 195-232, 2002.

BALDANI, Vera Lúcia Divan **Efeito da Inoculação de *Herbaspirillum* spp.. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz, e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica.** 1996. 238 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, RJ.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp.. **Biology and Fertility of Soils**, v. 30, p. 485–491, 2000.

BALKWILL, D. L.; FREDRICKSON, J. K.; ROMINE, M. F. "*Sphingomonas* and Related Genera" In: DWORKIN M., FALKOW S., ROSENBERG E., SCHLEIFER K-H. & STACKEBRANDT E., eds **The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community**, Springer-Verlag New York Inc.; 3 rev Ed , 2006. Disponível em <http://www.springerlink.com/content/v3654176x2651434/>. Acessado em 23 de setembro de 2007.

BECKER, K.; HARMSSEN, D.; MELLMANN, A.; MEIER, C.; SCHUMANN, P.; PETERS, G.; VON EIFF C. Development and Evaluation of a Quality-Controlled Ribosomal Sequence Database for 16S Ribosomal DNA-Based Identification of *Staphylococcus* Species **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p. 4988 – 4995, 2004.

BEN-HAIM, Y.; THOMPSON, F. L.; THOMPSON, C. C.; CNOCKAERT, M. C.; HOSTE, B.; SWINGS, J.; ROSENBERG E. *Vibrio coralliilyticus* sp. nov., a temperature-dependent

pathogen of the coral *Pocillopora damicornis* **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.53, p. 309-315, 2003.

BERG, G.; ROSKOT, N.; STEIDLE, A.; EBERL, L.; ZOCK, A.; SMALLA, K. Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different *Verticillium* host plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p.3328-3338, 2002.

BERWANGER, A. L. da S.; SCAMPARINI, A. R. P.; DOMINGUES, N. M.; VANZO, L. T.; TREICHEL, H.; PADILHA F. F. Produção de biopolímero sintetizado por *Sphingomonas capsulata* a partir de meios industriais **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 31, nº1, 2007. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-70542007000100026&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542007000100026&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 25 Jan 2008. doi: 10.1590/S1413-70542007000100026

BISHOP, D. H.; PANDYA, K. P.; KING H. K. Ubiquinone and vitamin K in bacteria. **Biochemical Journal**, v.83, p. 606-614, 1962.

BLEARS, M. J.; DE GRANDIS, S. A.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its application. **Journal of Indian Microbiology and Biotechnology**, v. 21, p.99-114, 1998.

BODDEY, R. M.; BODDEY, L. H.; URQUIAGA, S. **A técnica de redução de acetileno na medição da fixação biológica de nitrogênio**. Itaguaí: Editora Universidade Rural, 1990. 37p. (EMBRAPA-CNPBS. Documentos, 6).

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

BORRESEN, A. L.; HOVIG, E.; BROGGER, A. Detection of base mutations in genomic DNA using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) followed by transfer and hybridization with gene-specific probes. **Mutation Research**, v.202, nº1, p. 77-83, Nov 1988.

BRASIL, Marivaine da Silva. **Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas forrageiras nativas e exóticas cultivadas no Pantanal da Nhecolândia - MS**. 2001. 105f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

BRASIL, M. S.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Occurrence and diversity of diazotrophic bacteria associated to forage grasses of the Pantanal in the state of Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 29, n. 2, p. 179-190, 2005.

BULL, A. T.; GOODFELLOW, M.; SLATER, J. H. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.46, p.219-252, 1992.

BULL, A. T.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 64, n. 3, p. 573-606, 2000.

BUONAURIO, R.; STRAVATO, V. M.; KOSAKO, Y.; FUJIWARA, N.; NAKA, T.; KOBAYASHI, K.; CAPPELLI, C.; YABUUCHI, E. *Sphingomonas melonis* sp. nov., a novel pathogen that causes brown spots on yellow Spanish melon fruits **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.52, p. 2081–2087, 2002.

BÜRGMANN, H.; WIDMER, F.; VON SIGLER, W.; ZEYER J. New Molecular Screening Tools for Analysis of Free-Living Diazotrophs in Soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p. 240 – 247, 2004.

BUSCONI, M.; REGGI, S.; FOGHER, C. Evaluation of biodiversity of lactic acid bacteria microbiota in the calf intestinal tracts. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Jan 2008. Disponível em <http://www.springerlink.com/content/65877w6216044057/>. Acesso em: 03 de Janeiro de 2008.

BUSSE J. & AULING G. Polyamine pattern as a chemotaxonomic marker within the proteobacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, v.11, p.1–8, 1988.

CACCIARI, I.; LIPPI, D.; PIETROSANTI, T.; PIETROSANTI W. Phytohormone-Like Substances Produced by Single and Mixed Diazotrophic Cultures of *Azospirillum* and *Arthrobacter*. **Plant and Soil**, v.115, p.151–153, 1989.

CANHOS V. P. & MANFIO G. P. Recursos Microbiológicos para Biotecnologia, 2001 Disponível em [www.mct.gov.br/Temas/biotec/Tendencias%20\\_Vanderlei%20Fina\\_.pdf](http://www.mct.gov.br/Temas/biotec/Tendencias%20_Vanderlei%20Fina_.pdf). Acessado em: 20 de Setembro de 2007.

CASSIDY, M.; LEE, H.; TREVORS, J.; ZABLOTOWICZ, R. Chlorophenol and nitrophenol metabolism by *Sphingomonas* sp UG30. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.23, p.232-241, 1999.

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**, Brasília, v. 42, nº, 10, 2007. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-204X2007001000019&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2007001000019&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 12 Feb 2008. doi: 10.1590/S0100-204X2007001000019

CAUGANT D. A. From multi locus enzyme electrophoresis to multi locus sequence typing. In: DIJKSHOORN L., TOWNER K.J., STRUELENS M. (eds.). **New approaches for the generation and analysis of microbial typing data**, Amsterdam: Elsevier Science, 2003, p. 299–350.

CHENG, J.; PARK T. S.; CHIO, L. C.; FISCHL, A. S.; YE, X. S. Induction of apoptosis by sphingoid long-chain bases in *Aspergillus nidulans*. **Molecular Cell Biology**, v.23, p.163-177, 2003.

CLARRIDGE, J. E. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v.17, p.840 – 862, 2004.

COENYE, T.; GEVERS, D.; PEER, Y. V.; VANDAMME, P.; SWINGS, J. Towards a prokaryotic genomic taxonomy. **FEMS Microbiology Reviews**, v.29, p.147-167, 2005.

COHAN, F. M. What are bacterial species? **Annual Reviews Microbiology**, v.56, p.457-487, 2002.

COLWELL, R. R. Polyphasic taxonomy of bacteria. In: IIZUKA H. & HASEGAWA T. (eds.). **Culture Collections of Microorganisms**, Tóquio: University of Tokyo Press, 1970, p. 421-436.

COSTACURTA, A. & VANDERLEYDEN, J. Synthesis of phytohormones by plant associated bacteria. **Critical Review in Microbiology**, v.21, p.1-18, 1995.

CROSA, J. H.; BRENNER, D. J.; FALKOW, S. Use of a single-strand specific nuclease for analysis of bacterial and plasmid deoxyribonucleic acid homo- and heteroduplexes. **Journal of Bacteriology**, v.115, p.904-911, 1973.

CUNLIFFE, M.; KAWASAKI, A.; FELLOWS, E.; KERTESZ, A. M. Effect of inoculum pretreatment on survival, activity and catabolic gene expression of *Sphingobium yanoikuyae* B1 in an aged polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. **FEMS Microbiology Ecology**, v.58, p.364-372, 2006.

DA MOTA, F. F.; GOMES, E. A.; PAIVA, E.; ROSADO, A. S.; SELDIN, L. Use of *rpoB* gene analysis for identification of nitrogen-fixing *Paenibacillus* species as an alternative to the 16S rRNA gene. **Letters in Applied Microbiology**, v.39, p.34-40, 2004.

DAANE, L. L.; HARJONO, I.; ZYLSTRA, G. J.; HÄGGBLÖM, M. M. Isolation and Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacteria Associated with the Rhizosphere of Salt Marsh Plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.2683 - 2691, 2001.

DAHLLOF, I. Molecular community analysis of microbial diversity. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 13, p. 213-217, 2002.

DAVIES, P. J. The plant hormone concept: concentration, sensitivity, and transport. In: DAVIES, P. J. (ed) **Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995, p.13-18.

DAVISON, A. D.; KARUSO, P.; JARDINE, D. R.; VEAL, D. A. Halopicolinic acids, novel products arising through the degradation of chloro- and bromo-biphenyl by *Sphingomonas paucimobilis* BPSI-3. **Canadian Journal of Microbiology**, v.42, p.66-71, 1996.

DE OLIVEIRA, V. M.; MANFIO, G. P.; COUTINHO, H. L. de C.; KEIJZER-WOLTERS, A. C.; VAN ELSAS, J. D. A ribosomal RNA gene intergenic spacer based PCR and DGGE fingerprinting method for the analysis of specific rhizobial communities in soil. **Journal of Microbiology Methods**, v.64, n°3, p.366-79, 2006.

DE VUYST, L. & DEGEEST, B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v.23, p.157-177, 1999.

DEUTSCHBAUER, A. M.; CHIVIAN, D.; ARKIN, A. P. Genomics for environmental microbiology. **Current Opinion in Biotechnology**, v.17, p.229-235, 2006.

DICK, R. P.; MYROLD, D. D.; RITCHIE, N. J.; SCHUTTER, M. E. Use of length heterogeneity pcr and fatty acid methyl ester profiles to characterize microbial communities in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.1668 – 1675, 2000.

DING, Y.; WANG, J.; LIU, Y.; CHEN, S. Isolation and identification of nitrogen-fixing bacilli from plant rhizospheres in Beijing region. **Journal Applied Microbiology**, v.99, n°5, p.1271-81, Jan 2005.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v.22, n.2, p.107-149, 2003.

DÖBEREINER J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: Endophytic N<sub>2</sub> fixing bacteria. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 44, p. 310-313, 1992.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. 60 p. Embrapa-SPI, Brasília, 1995.

DOWNIE, J. A. Functions of rhizobial nodulation genes. In: ESPANHAK, H.P., KONDOROSI, A., HOOYKAAS, P.J.J. (Ed.) **The Rhizobiaceae, molecular biology of model plant-associated bacteria**, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 387- 402, 1998.

DOWNING, K. J.; LESLIE, G.; THOMSON, J. A. Biocontrol of the sugarcane borer *Eldana saccharina* by expression of the *Bacillus thuringiensis cryIAc7* and *Serratia marcescens chiA* genes in sugarcane-associated bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 7, p. 2804-2810, 2000.

DUBOC, P. & MOLLET, B. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 759-768, 2001.

DUINEVELD, B. M.; ROSADO, A. S.; VAN ELSAS, J. D.; VAN VEEN, J. A. Analysis of the Dynamics of Bacterial Communities in the Rhizosphere of the Chrysanthemum via Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Substrate Utilization Patterns **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n°. 8, p. 2770-2779, 1998.

ECKERT, B.; WEBER, O B.; KIRCHHOF, G.; HALBRITTER, A.; STOFFELS, M.; HARTMANN, A. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C<sub>4</sub>-grass Miscanthus, **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, p. 17-26, 2001.

ELASRI, M. O. & MILLER, R.V. Study of the Response of a Biofilm Bacterial Community to UV Radiation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.2025 – 2031, 1999.

ENGELHARD, M.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azoarcus* spp., in wild rice species and land races of *Oriza sativa* in comparasion with modern races. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 2, p. 131-141, 2000.

FAY, P. Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.56, p.340–373, 1992.

FEIL, E. J.; COOPER, J. E.; GRUNDMANN, H.; ROBINSON, A. D.; ENRIGHT, M. C.; BERENDT, T.; PEACOCK, S. J.; SMITH, J. M.; MURPHY, M.; SPRATT, B. G.; MOORE, C. E.; DAY, N. P. J. How clonal is *Staphylococcus aureus*? **Journal of Bacteriology**, v.185, p.3307-3316, 2003.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution** v.39, p.783-791, 1985.

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M.; RODRIGUES, L. da S. Bactérias diazotróficas associadas a coqueiros na região de baixada litorânea em Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, nº 12, p. 1509-1517, 2001.

FERRIS, M. J.; MUYZER, G.; WARD, D. M. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.340 – 346, 1996.

FORNEY, L. J.; ZHOU, X.; BROWN C. J. Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king. **Current Opinion in Microbiology**, v.7, nº3, p.210-20, 2004.

FRY, J. Bacterial diversity and ‘unculturables’. **Microbiol Today**, v.27, p.86–188, 2000.

FUJII, H.; VERSLUES, P. E.; ZHU J. K. Identification of two protein kinases required for abscisic acid regulation of seed germination, root growth, and gene expression in *arabidopsis*. **The Plant Cell**, v.19, p.485 - 494, 2007.

FURUSHITA, M.; SHIBA, T.; MAEDA, T.; YAHATA, M.; KANEOKA, A.; TAKAHASHI, Y.; TRII, K.; HASEGAWA, T.; OHTA, M. Similarity of tetracycline resistance genes isolated from fish farm bacteria to those from clinical isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.5336–5342, 2003.

GEVERS, D.; COHAN, F. M.; LAWRENCE, J. G.; SPRATT, B. G.; COENYE, T.; FEIL, E. J.; STACKEBRANDT, E.; VAN DE PEER, Y.; VANDAMME, P.; THOMPSON, F. L.; SWINGS, J. Opinion: re-evaluating prokaryotic species. **Nature Review Microbiology**, v.3, p.733–739, (doi:10.1038/nrmicro1236), 2005.

GIAVASIS, I.; HARVEY, L. M.; MCNEIL, B. Gellan gum. **CRC Critical Review in Biotechnology**, Boca Raton, v.20, nº3, p.177-211, 2000.

GICH, F. B.; AMER, E.; FIGUERAS, J. B.; ABELLA, C. A.; BALAGUER, M. D.; POCH M. Assessment of microbial community structure changes by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). **International Microbiology**, v.3, nº2, p.103-106, 2000.

GLICK, B. R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v.41, p.109-117, 1995.

GUNARTO, L.; ADACHI, K.; SENBOKU, T. Isolation and selection of indigenous *Azospirillum* spp.. from a sub-tropical island and effect of inoculation on growth of lowland

rice under several levels of N-application **Biology and Fertility of Soils**, v.28, p.129-135, 1999.

GURTLER, V.; WILSON, V. A.; MAYALL, B. C. Classification of medically important clostridia using restriction endonuclease site differences of PCR-amplified 16S rDNA. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 137, p. 2673-2679, 1991.

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.

HANZLIKOVA, A.; JANDERA, A.; KUNC, F. Poly-3-hydroxybutyrate production and changes of bacterial community in the soil. **Folia Microbiologica**, v.30, p.58-64, 1985.

HARDY, R. W. F.; HOLSTEN, R. D.; JACKSON, E. K.; BURNS, R. C. The Acetylene - Ethylene Assay for N<sub>2</sub> Fixation: Laboratory and Field Evaluation **Plant Physiology**, v.43, p.1185-1207, 1968.

HASHIDOKO, Y. Ecochemical studies of interrelationships between epiphytic bacteria and host plants via secondary metabolites. **Bioscience, Biotechnology & Biochemistry**, v.69, n<sup>o</sup>8, p.1427-41, Aug 2005.

HASHIDOKO, Y.; TOMA, Y.; TAKAKAI, F.; DARUNG, U.; MELLING, L.; TAHARA, S.; HATANO, R. Acid-tolerant *Janthinobacterium* sp. actively emitting N<sub>2</sub>O from deforested tropical peatland. **Applied and Environmental Microbiology**, (in submission), 2006.

HEBBAR, K. P.; GUENIOT, B.; HEYRAUD, A.; COLIN-MOREL, P.; HEULIN, T.; BALANDREAU, J.; RINAUDO, M. Characterization of exopolysaccharides produced by rhizobacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 38, p. 248-253, 1992.

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

HEUNG, L. J.; LUBERTO, C.; DEL POETA, M. Role of sphingolipids in microbial pathogenesis. **Infection and Immunity**, v.74, p.28 - 39, 2006.

HILL, K. K.; SMITH, T. J.; HELMA, C. H.; TICKNOR, L. O.; FOLEY, B. T.; SVENSSON R. T.; BROWN, J. L.; JOHNSON, E. A.; SMITH L. A., OKINAKA R. T., JACKSON P. J., MARKS J. D. Genetic Diversity among Botulinum Neurotoxin-Producing Clostridial Strains. **Journal of Bacteriology**, v.189, p.818 – 832, 2007.

HILL, S. & POSTGATE, J. R. Failure of putative nitrogen-fixing bacteria to fix nitrogen. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v.58, n<sup>o</sup>2, p.277-285, 1969.

HIRAISHI, A.; KURAISHI, H.; KAWAHARA, K. Emendation of the description of *Blastomonas natatoria* (Sly 1985) Sly and Cahill 1997 as an aerobic photosynthetic bacterium and reclassification of *Erythromonas ursincola* Yurkov et al. 1997 as *Blastomonas ursincola*

comb. nov. **International Journal of Systematics Evolution Microbiology**, v.50, p. 1113-1118, 2000.

HUYS, G.; COOPMAN, R.; JANSSEN, P.; KERSTERS, K. High-resolution genotypic analysis of the genus *Aeromonas* by AFLP fingerprinting. **International Journal of Systematics Bacteriology**, v.46, p. 572-580, 1996.

IIZUKA, H. Microbial flora of rice paddies. In: **IAM Symposia on Microbiology**. University of Tokyo: The Institute of Applied Microbiology, n°2, p.250-266, 1960.

IKUSHIRO, H.; HAYASHI, H.; KAGAMIYAMA, H. A Water-soluble Homodimeric Serine Palmitoyltransferase from *Sphingomonas paucimobilis* EY2395<sup>T</sup> Strain. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, p.18249 – 18256, 2001.

JACKSON, C. R. & CHURCHILL, P. F. Analysis of microbial communities by denaturing gradient gel electrophoresis: Applications and limitations. **Recent Research Developments in Microbiology**, v.3, p.81-91, 1999.

JACKSON, C. R.; RODEN E. E.; CHURCHILL, P. F. Changes in bacterial species composition in enrichment cultures with varying inoculum dilution as monitored by denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.5046-5048, 1998.

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

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

JANDA, J. M. & ABBOTT, S. L. Bacterial identification for publication: when is enough enough? **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.1887–1891, 2002.

JANSSEN, P.; COOPMAN R.; HUYS, G.; SWINGS, J.; BLEEKER H.; DE VOS P.; ZABEAU, M.; KERSTERS, K. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. **Microbiology**, New York, v.142, p.1881-1893, 1996.

JENKINS, C. L. & STARR, M. P. Formation of halogenated arylpolyene (xanthomonadin) pigments by the type and other yellow pigmented strains of *Xanthomonas maltophilia*. **Annales Del Institute Pasteur**, v.136B, p.257-264, 1985.

JENKINS, C. L.; ANDREWES, A. G.; McQUADE, T. J.; STARR, M. P. The pigment of *Pseudomonas paucimobilis* is a carotenoid (nostoxanthin), rather than a brominated arylpolyene (xanthomonadin). **Current Microbiology**, v.48, p.1-4, 1979.

KAMNEVA, S. V. & MURONETS E. M. Genetic control of the processes of interaction of bacteria with plants in associations, **Genetika**, v. 35, n°11, p. 1480–1494, 1999.

KÄMPFER, P.; DENNER, E. B. M.; MEYER, S.; MOORE, E. R. B.; BUSSE, H.-J. Classification of “*Pseudomonas azotocolligans*” Anderson 1955, in the genus *Sphingomonas*

as *Sphingomonas trueperi* sp. nov. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Washington, v.47, p.577–583, 1997.

KAWAHARA, K.; MIZUTA, I.; KATABAMI, W.; KOIZUMI, M.; WAKAYAMA, S. Isolation of *Sphingomonas* strains from ears of rice and other plants of family *Gramineae*. **Bioscience, Biotechnology & Biochemistry**, v. 58, p. 600–601, 1994.

KAWAHARA, K.; KURAIISHI, H.; ZHRINGER, U. Chemical structure and function of glycosphingolipids of *Sphingomonas* spp. and their distribution among members of the alpha-4 subclass of Proteobacteria. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.23, n°4/5, p. 408-413, 1999.

KAWAHARA, K.; MOLL, H.; KNIREL, Y. A.; SEYDEL, U.; ZHRINGER, U. Structural analysis of two glycosphingolipids from the lipopolysaccharide-lacking bacterium *Sphingomonas capsulata*. **European Journal of Biochemistry**, v.267, n°6, p.1837-1846, 2000.

KAWAHARA, K.; SEYDEL, U.; MATSUURA, M.; DANBARA, H.; RIETSCHER, E. T.; ZHRINGER, U. Chemical structure of glycosphingolipids isolated from *Sphingomonas paucimobilis*. **FEBS Letters**, v.292, n°1/2, p.107-110, 1991.

KAWASAKI, S.; MORIGUCHI, R.; SEKIYA, K.; NAKAI, T.; ONO, E.; KUME, K.; KAWAHARA, K. The cell envelope structure of the lipopolysaccharide-lacking gram-negative bacterium *Sphingomonas paucimobilis*. **Journal of Bacteriology**, v.176, p.284-290, 1994.

KENNEDY, A. C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture, ecosystems and Environment**, v. 74, p.65-76, 1999.

KHALID, A.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z. A. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. **Journal of Applied Microbiology**, v.96, n°3, p. 473-80, 2004.

KIM, B. Y.; AHN, J. B.; LEE, H. W.; KANG, S. K.; LEE, J. H.; SHIN, J. S.; AHN, S. K.; HONG, C. I.; YOON, S. S. Synthesis and biological activity of novel substituted pyridines and purines containing 2,4-thiazolidinedione. **European Journal of Biochemistry**, v. 39, p. 433-447, 2004.

KIM, H.; NISHIYAMA, M.; KUNITO, T.; SENOO, K.; KAWAHARA, K.; MURAKAMI, K.; OYAIZU, H. High Population of *Sphingomonas* species on plant surface. **Journal of Applied Microbiology**, v.85, p.731-736, 1998.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v.16, p.111-120, 1980.

KIRCHHOF, G.; ECKERT, B.; STOFFELS, M.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C<sub>4</sub>-fibre plants. **International Journal of Systematics Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, p. 157-168, 2001.

KNAUTH, S.; HUREK, T.; BRAR, D.; REINHOLD-HUREK, B. Influence of different *Oryza* cultivars on expression of *nifH* gene pools in roots of rice. **Environmental Microbiology**, v.7, n°11, p.1725-1733, 2005.

KOHLER, H. P. E. *Sphingomonas herbicidivorans* MH: a versatile phenoxyalkanoic acid herbicide degrader. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.23, p.336-340, 1999.

KOVACS, N. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. **Nature**, London, v. 178, p. 703, 1956.

KOWALCHUK, G. A.; STEPHEN, J. R.; DE BOER, W.; PROSSER, J. I.; EMBLEY, T. M.; WOLDENDORP, J. W. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.1489 – 1497, 1997.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAUJO, W. L.; MENDES, R.; GERALDI, I. O.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of soybeab-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 12, p. 1244-1251, 2004.

KUNITSKY, C.; OSTERHOUT, G.; SASSER, M. **Identification Of Microorganisms Using Fatty Acid Methyl Ester (Fame) Analysis And The Midi Sherlock Microbial Identification System Midi**, Inc. Newark, DE, USA. Disponível em [https://store.pda.org/bookstore/TableOfContents/ERMM\\_V3\\_Ch01.pdf](https://store.pda.org/bookstore/TableOfContents/ERMM_V3_Ch01.pdf). Acesso em: 20 de setembro de 2007.

KUSS, Anelise Vicentini. **Fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado**. 2006. 109p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, RS.

LA SCOLA, B.; ZEAITER, Z.; KHAMISAND, A.; RAOULT, D. Gene-sequence-based criteria for species definition in bacteriology: the Bartonella paradigm. **Trends in Microbiology**, v.11, p.318-321, 2003.

LAGACÉ, L.; PITRE, M.; JACQUES, M.; ROY, D. Identification of the bacterial community of maple sap by using amplified ribosomal DNA (rDNA) restriction analysis and rDNA sequencing. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.2052 - 2060, 2004.

LAN, R. & REEVES, P. R. When does a clone deserve a name? A perspective on bacterial species based on population genetics. **Trends in Microbiology**, v. 9, n° 9, p. 419-424, 2001.

LECHNER, M. & TELHADA, M. Expressão dos genes - transcrição. In: **Biologia celular**. Azevedo, C., (ed.) Lidel – Edições técnicas, 1994, p. 159-172.

LEE, S. Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome c biogenesis genes. **Journal of Bacteriology**, v.186, n°16, p. 5384-91, 2004.

LEE, S.Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates. **Biotechnology & Bioengineering**, v.49, p.1-14, 1996.

LEUNG, K. T.; CHANG, Y.-J.; GAN, Y.-D.; PEACOCK, A.; MACNAUGHTON, S. J.; STEPHEN, J. R.; BURKHALTER, R. S.; FLEMMING, C. A.; WHITE D. C. Detection of *Sphingomonas* spp. in soil by PCR and sphingolipid biomarker analysis **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.23, p. 252-260, 1997.

LEYS, N. M. E. J.; RYNGAERT, A.; BASTIAENS, L.; VERSTRAETE, W.; TOP, E. M.; SPRINGAEL, D. Occurrence and phylogenetic diversity of *Sphingomonas* strains in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n° 4, p.1944-1955, 2004.

LIN, J.-J.; KUO, J.; JIN, M. A. A PCR-based DNA fingerprinting technique: AFLP for molecular typing of bacteria **Nucleic Acids Research**, v. 24, n°18, p.3649–3650, 1996.

LINDREA, K. C.; SEVIOUR, E. M.; SEVIOUR, R. J.; BLACKALL, L. L.; SODDELL, J. A. Practical methods for the examination and characterization of activated sludge. In: SEVIOUR R. J. & BLACKALL L. L. **The Microbiology of Activated Sludge**, Dordrecht: Kluwer, p. 257–300, 1999.

LINDSTROM, K.; LAGUERRE, G.; NORMAND, P.; RASMUSSEN, U.; HEULIN, T.; JARVIS, B.D.W.; DE LAJUDIE, P.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; CHEN, W.-X. Taxonomy and phylogeny of diazotrophs. In: ELMERICH, C.; KONDOROSI, A.; NEWTON, W.E. eds. **Biological Nitrogen Fixation for the 21<sup>st</sup> century**, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. p. 559-570.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MAIDAK, B. L.; OLSEN, G. J.; LARSEN, N.; OVERBEEK, R.; McCAUGHEY, M. J.; WOESE, C. R. The Ribosomal Database Project (RDP) **Nucleic Acids Research**, v.24, p.82 – 85, 1996.

MAIDEN, M. C.; BYGRAVES, J. A.; FEIL, E.; MORELLI, G.; RUSSELL, J. E.; URWIN, R.; ZHANG, Q.; ZHOU, J.; ZURTH, K.; CAUGANT, D. A. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 95, p.3140-3145, 1998.

MANO, H.; TANAKA, F.; WATANABE, A.; KAGA, H.; OKUNISHI, S.; MORISAKI, H. Culturable surface and endophytic bacterial flora of the maturing seeds of rice plants (*Oryza sativa*) cultivated in a paddy field. **Microbes Environmental**, v. 21, n2, p.86-100, 2006.

MANZ, W.; AMANN, R.; LUDWIG, W.; WAGNER, M.; SCHLEIFER, K.-H. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. **Systematic and Applied Microbiology**, v.15, p.593–600, 1992.

MARCHIORO, Luiz Eduardo Tedesco. **Produção de ácido indol acético e derivados por bactérias fixadoras de nitrogênio**. 2005. 74p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MARRIEL, I. E.; OLIVEIRA, C. A.; RAPOSEIRAS, R.; GOMES, E. A.; LANNA, U. G. P.; CARNEIRO, A. A.; PORTILHO, N. **Aplicação da Técnica de Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE) na Caracterização de Microrganismos Dominantes na Rizosfera de Plantas Cultivadas em Solo Ácido**. Embrapa. Sete Lagoas, 2005 (Circular Técnica 72). 8 p.

MARTÍNEZ-MORALES, F.; SCHOBERT, M.; LÓPEZ-LARA, I. M.; GEIGER, O. Pathways for phosphatidylcholine biosynthesis in bacteria. **Microbiology**, v.149, 3461-3471, 2003.

MAUGERI, F. Produção de polissacarídeos. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: E. Blucher, v. 3, 2001, p. 125-154.

MAYNARD SMITH, J. M.; FEIL, E. J.; SMITH N, H. Population structure and evolutionary dynamics of pathogenic bacteria. **BioEssays**, v. 22, p.1115-1122, 2000.

MAYR E. & ASHLOCK P. D. **Principles of Systematic Zoology** 2<sup>nd</sup> ed. McGraw-Hill, Inc., 1991, p. 1-12.

McCAIG, A. E.; GRAYSTON, S. J.; PROSSER, I.; GLOVER, L A. Impact of cultivation on characterisation of species composition of soil bacterial communities **FEMS Microbiology Ecology**, v.35, n°1, p.37-48, 2001.

McLAUHLIN, J.; SALMON, J. E.; AHMED, S.; BRAZIER, J. S.; BRETT, M. M.; GEORGE, R. C.; HOOD, J. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Clostridium novyi*, *C. perfringens* and *Bacillus cereus* isolated from injecting drug users during 2000. **Journal of Medical Microbiology**, v.51, n°11, p. 990-1000, 2002.

McSPADDEN-GARDENER, B. B.; SCHROEDER, K. L.; KALLOGER, S. E.; RAAIJMAKERS, J. M.; THOMASHOW, L. S.; WELLER, D. M. Genotypic and phenotypic diversity of *phlD*-containing *Pseudomonas* strains isolated from the rhizosphere of wheat. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.1939-1946, 2000.

MEHLEN, A.; GOELDNER, M.; RIED, S.; STINDL, S.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Development of a fast DNA:DNA hybridization method based on melting profiles in microplates. **Systematic and Applied Microbiology**, v.27, n°6, p.689-695, 2004.

MEHNAZ S. & LAZAROVITS G. Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. **Microbial Ecology**, v.51, n°3, p.326-35, 2006.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 57, p. 620-624, 2007.

MEHTA, M. P.; BUTTERFIELD, D. A.; BAROSS, J. A. Phylogenetic Diversity of Nitrogenase (*nifH*) Genes in Deep-Sea and Hydrothermal Vent Environments of the Juan de Fuca Ridge. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p. 960 – 970, 2003.

MIDI Bacterial ID, Inc .**Sherlock® Microbial Identification System (MIS) References**. Disponível em <http://www.midi-inc.com/pages/GCproducts.html>. Acessado em: 20/07/2008.

MIRZA, M. S.; RASUL, G.; MEHNAZ, S.; LADHA, J. K.; SO, R. B.; ALI, S.; MALIK, K. A. Beneficial effects of inoculated nitrogen-fixing bacteria on rice. In: LADHA, J.K. & REDDY, P.M. (Eds.). **The Quest for Nitrogen Fixation in Rice**. International Rice Research Institute, Los Banos, p. 191–204, 2000.

MORRIS, C. E.; MONIER, J.-M.; JACQUES, M.-A. A technique to quantify the population size and composition of the biofilm component in communities of bacteria in the phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p. 4789-4795, 1998.

■

MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.695 – 700, 1993.

MUYZER, G.; TESKE, A.; WIRSEN, C. O.; JANNASCH, H. W. Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. **Archives of Microbiology**, v.164, n°3, p.165-72, 1995.

NAGATA, Y.; MIYACHI, K.; TAKAGI, M. Complete analysis of genes and enzymes for g-hexachlorocyclohexane degradation in *Sphingomonas paucimobilis* UT26. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.23, p.380-390, 1999.

NAKATSU, C. H. Soil microbial community analysis using denaturing gradient gel electrophoresis. **Soil Science Society of America Journal**, v.71, p.562 – 571, 2007.

NEWMAN D. K. & BANFIELD J. F. Geomicrobiology: How molecular-scale interactions underpin biogeochemical systems, **Science**, v.296, p.1071-1077, 2002.

NISHIYAMA, M.; SENOO, K.; WADA, H.; MATSUMOTO, S. Identification of soil microhabitats for growth, death and survival of a bacterium, g-1,2,3,4,5,6-hexachlorocyclohexane-assimilating *Sphingomonas paucimobilis*, by fractionation of soil. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 101, p. 145–150, 1992.

NOBREGA, R. S. A.; ABRAHÃO, R. S; MOTTA, J. S.; LACERDA, A. M.; MOREIRA, F. M. S. Tolerância de bactérias diazotróficas simbióticas à salinidade in vitro. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 4, p. 899-905, 2004.

NOEL G. J., BRITTINGHAM A., GRANATO A. A., MOSSER D. M. Effect of amplification of the Cap b locus on complement-mediated bacteriolysis and opsonization of type b *Haemophilus influenzae*. **Infection and Immunity**, v.64, p. 4769 - 4775, 1996.

O'DONNELL, K.; SUTTON, D. A.; RINALDI, M. G.; MAGNON, K. C.; COX, P. A.; REVANKAR, S. G.; SANCHE, S.; GEISER, D. M.; JUBA, J. H.; VAN BURIK, J. A.; PADHYE, A.; ANAISSIE, E. J.; FRANCESCONI, A.; WALSH, T. J.; ROBINSON, J. S. Genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium oxysporum* complex inferred from multilocus dna sequence data and amplified fragment length polymorphism analyses: evidence for the recent dispersion of a geographically widespread clonal lineage and nosocomial origin. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p. 5109-5120, 2004.

OBEID, L. M.; OKAMOTO, Y.; MAO, C. Yeast sphingolipids: metabolism and biology. **Biochimica e Biophysica Acta**, v.1585, n°2/3, p.163-171, 2002.

OGITA, N.; HASHIDOKO, Y.; LIMIN, S. H.; TAHARA, S. Linear 3-hydroxybutyrate tetramer (HB4) produced by *Sphingomonas* sp. is characterized as a growth promoting factor for some rhizomicrofloral composers. **Bioscience, Biotechnology & Biochemistry**, v.70, n°9, p. 2325-2329, 2006.

OHTA, H.; HATTORI, R.; USHIBA, Y.; MITSUI, H.; ITO, M.; WATANABE, H.; TONOSAKI, A.; HATTORI, T. *Sphingomonas oligophenolica* sp. nov., a halo- and organo-sensitive oligotrophic bacterium from paddy soil that degrades phenolic acids at low concentrations. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 54, p.2185-2190, 2004.

On, S .L .W & HOLMES B. Reproducibility of tolerance tests that are useful in the identification of campylobacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, p.1785 – 1788, 1991.

OREN, A. Prokaryote diversity and taxonomy: current status and future challenges. **Philosophical Transactions of the Royal Society Biological**, v. 359, n°1444, p.623-638, 2004.

OYAIZU-MASUCHI, Y. & KOMAGATA, K. Isolation of free-living nitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of rice. **Journal of General and Applied Microbiology**, v.34, p.127–164, 1988.

PEARCE, D. A.; VAN DER GAST, C. J.; LAWLEY, B.; ELLIS-EVANS, J. C. Bacterioplankton community diversity in a maritime Antarctic lake, determined by culture-dependent and culture-independent techniques. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 45, p. 59–70, 2003.

PEDRAZA, R. O.; RAMIREZ-MATA, A.; XIQUI, M. L.; BACA, B. E. Aromatic amino acid aminotransferase activity and indole-3-acetic acid production by associative nitrogen-fixing bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 233, n°1, p.15-21, 2004.

PERIN, Liamara. **Estudo da Comunidade de Bactérias Diazotróficas do Gênero *Burkholderia* em Associação com Cana-de-açúcar e Descrição de *Burkholderia silvatlantica***. 2007. 120 f. Tese (Doutorado em Agronomia - Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

PICARD, C.; DI CELLO, F.; VENTURA, M.; FANI, R.; GUCKERT, A. Frequency and biodiversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing bacteria isolated from the maize

rhizosphere at different stages of plant growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.948–955, 2000.

POLLOCK, T. J. Gellan-related polysaccharides and the genus *Sphingomonas*. **Journal of General Microbiology**, v.139, p.1939-1945, 1993.

POLY, F.; MONROZIER, L. J.; BALLY, R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. **Research in Microbiology**, v.152, p.95-103, 2001.

PRAKASH, O.; VERMA, M.; SHARMA, P.; KUMAR, M.; KUMARI, K.; SINGH, A.; KUMARI, H.; JIT, S.; GUPTA, S. K.; KHANNA, M. Polyphasic approach of bacterial – An overview of recent advances **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.47, p. 98-108, 2007.

RADWAN, S. S.; DASHTI, N.; EL-NEMR, I. M. Enhancing the growth of *Vicia faba* plants by microbial inoculation to improve their phytoremediation potential for oily desert areas. **International Journal of Phytoremediation**, v.7, n°1, p.19-32, 2005.

RAYMOND, J.; SIEFERT, J. L.; STAPLES, C. R.; BLANKENSHIP, R. E. The Natural History of Nitrogen Fixation. **Molecular Biology and Evolution**, v.21, p.541 - 554, Mar 2004.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T.; GILLIS, M.; HOSTE, B.; VANCANNEYT, M.; KERSTERS, K.; DE LEY, J. *Azoarcus* gen. nov., nitrogen-fixing Proteobacteria associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth), and description of two species, *Azoarcus indigenus* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 43, n°3, p. 574-584, 1993.

REINHOLD-HUREK, B. & HUREK, T. Reassessment of the taxonomic structure of the diazotrophic genus *Azoarcus* sensu lato and description of three new genera and new species, *Azovibrio restrictus* gen. nov., sp. nov., *Azospira oryzae* gen. nov., sp. nov. and *Azonexus fungiphilus* gen. nov., sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.50, p. 649–659, 2000.

REIS JUNIOR, F. B.; da SILVA, M. F.; TEIXEIRA, K. R. S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Intra-Specific Diversity Study of the Nitrogen Fixing Bacterium *Azospirillum amazonense* Isolated from Different *Brachiaria* Species. **Symbiosis**, v. 36, n° 1, p. 41-56, 2004.

REIS JUNIOR, F. B. **Ecologia e diversidade de bactérias do gênero *Azospirillum* em associação com pastagens de *Brachiaria* spp.**. 2002. 97p. Tese (Doutorado em Agronomia – Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

REIS JUNIOR, F. B.; REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. S. Restrição do 16S-23S DNAr intergênico para avaliação da diversidade de *Azospirillum amazonense* isolado de *Brachiaria* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n° 3, p. 431-438, 2006.

REIS, V. M.; OLIVEIRA, A. L. M.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I. Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: FERNANDES, M. S. (Ed.).

**Nutrição mineral de plantas.** Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p. 153-174.

RIVAS, R.; ABRIL, A.; TRUJILLO, M. E.; VELÁZQUEZ, E. *Sphingomonas phyllosphaerae* sp. nov., from the phyllosphere of *Acacia caven* in Argentina. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 54, p.2147 – 2150, 2004.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR, V. A; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. **Summa Phytopathologica**, Campinas, v. 12, nº 1-2, p. 16, 1986.

RODRIGUES, Luciana da Silva. **Estudo da diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a cultivares de arroz inundado.** 2003, 94 f. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo)- Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

RODRIGUES, L. da S.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M., BALDANI, J. I. Diversity of endophytic diazotrophic bacteria of the genus *Herbaspirillum* and *Burkholderia* in wetland rice. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, nº 2, 2006.

ROSADO, A. S., SELDIN, L., VAN ELSAS, J. D. Reclassification of *Paenibacillus durum* (formerly *Clostridium durum* Smith and Cato 1974) Collins et al. 1994 as a member of the species *P. azotofixans* (formerly *Bacillus azotofixans* Seldin et al. 1984) Ash et al. 1994. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.47, p. 569-572, 1997.

ROSADO, A. S.; DUARTE, G. F.; SELDIN, L.; VAN ELSAS, J. D. Genetic diversity of *nifH* gene sequences in *Paenibacillus azotofixans* strains and soil samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.2770 – 2779, 1998.

ROSSELLÓ-MORA, R. & AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 25, p. 39–67, 2001.

RUAS-MADIEDO, P.; HUGENHOLTZ, J.; ZOON, P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 163-171, 2002.

RUZICKA, K.; LJUNG, K.; VANNESTE, S.; PODHORSKÁ, R.; BEECKMAN, T.; FRIML, J.; BENKOVÁ, E. Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution. **The Plant Cell**, v.19, p.2197 – 2212, 2007.

SAITOU, N. & NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v.4, p.406-425, 1987.

SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 745 p.

SNAIDR, J.; AMANN, R.; HUBER, I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p. 2884-2896, 1997.

SAWAR, M. & KREMER, R. J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. **Letters in Applied Microbiology**, v.20, p.282-285, 1995.

SCHILDKRAUT, C. L.; MARMUR, J.; DOTY, P. The formation of hybrid DNA molecules and their use in studies of DNA homologies. **Journal of Molecular Biology**, v.3, p.595-617, 1961.

SCHLEIFER, K. H. & KANDLER, O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.36, p.407 - 477, 1972.

SCHLEIFER, K. H. Microbial diversity: facts, problems and prospects. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, p.3-9, 2004.

SCHUTTER M. E. & DICK R. P. Comparison of fatty acid methyl ester (FAME) methods for characterizing microbial communities **Soil Science Society of America Journal**, v.64, p.1659 – 1668, 2000.

SEVIOUR, R. J.; LINDREA, K. C.; GRIFFITHS, P. C.; BLACKALL, L. L. In: SEVIOUR, R. J. & BLACKALL, L.L. (Eds.) **The Microbiology of Activated Sludge** Springer-Verlag New York, LLC, 1999. p. 44–74.

SHI S. & BENDING G. D. Changes to the structure of *Sphingomonas* spp.. communities associated with biodegradation of the herbicide isoproturon in soil. **FEMS Microbiology Letters**, v.269, nº1, p.110–116, 2007.

SILVA FILHO, G. N.; NARLOCH, C.; SCHARF, R. Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de cultivos de *Pinus* e *Eucalyptus* de Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, nº 6, p. 847-854, 2002.

■

SIMPSON, G. G. A Classification of Living Animals. London, Wiley, New York, **Science**, v.134, p. 1745-1745, 1961.

SMALLA, K.; WACHTENDORF, U.; HEUER, H.; LIU, W.-T.; FORNEY, L. Analysis of BIOLOG GN Substrate Utilization Patterns by Microbial. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.1220 - 1225, 1998.

SNEATH, P. H. & SOKAL, R. R. Numerical taxonomy. **Nature**, v.193, p.855-860, 1962.

SOARES-RAMOS, J. R. L.; RAMOS, H. J. O.; CRUZ, L. M.. CHUBATSU, L. S. Comparative molecular analyses of *Herbaspirillum* strains by RAPD, RFLP, and 16S rDNA sequencing. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 26, p. 537-543, 2003.

SOUCHIE, E. L.; ABOUD, A. C. de S.; CAPRONI, A. L. Solubilização de fosfato *in vitro* por microrganismos rizosféricos de guandu. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 23, nº2, p. 53-60, 2007.

SOUCHIE, E. L.; CAMPELLO, E. F. C.; SAGGIN-JÚNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R. Mudanças de espécies arbóreas inoculadas com bactérias solubilizadoras de fosfato e fungos micorrízicos arbusculares. **Floresta**, Curitiba, v. 35, nº 2, p. 329-334, 2005.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, v.31, nº4, p. 425-448, 2007.

STAAL, M.; TE LINTEL-HEKKERT, S.; HARREN, F.; STAL, L. Nitrogenase activity in cyanobacteria measured by the acetylene reduction assay: a comparison between batch incubation and on-line monitoring. **Environmental Microbiology**, v.3, nº5, p. 343-351, 2001.

STACKEBRANDT, E. & GOEBEL B. M. A place for DNA:DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.44, p.846-849, 1987.

STACKEBRANDT, E. & GOEBEL, B. M. Taxonomic note: a place for DNA:DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, p. 846-849, 1994.

STACKEBRANDT, E.; FREDERIKSEN, W.; GARRITY, G. M.; GRIMONT, P. A.; KAMPFER, P.; MAIDEN, M. C.; NESME, X.; SWINGS, J.; TRUPER, H. G.; VAUTERIN L.; WARD, A. C.; WHITMAN, W. B. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.52, p. 1043-1047, 2002.

STEWART, W. D.; FITZGERALD, G. P.; BURRIS, R. H. *In situ* studies on N<sub>2</sub> fixation using the acetylene reduction technique. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v.58, nº5, p.2071–2078, 1967.

STOLZ, A.; SCHMIDT-MAAG, C.; DENNER, E. B. M.; BUSSE, H. J.; EGLI, T.; KAMPFER, P. Description of *Sphingomonas xenophaga* sp. nov. for strains BN6(T) and N,N which degrade xenobiotic aromatic compounds. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.50, p.35, 2000.

STONER, D. L.; BROWNING, C. K.; BULMER, D. K.; WARD, T. E.; MacDONELL, M. T. Direct 5S rRNA Assay for Monitoring Mixed-Culture Bioprocesses. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.1969 – 1976, 1996.

STROBEL, G. & DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.67, nº 4, p.491-502, 2003.

SWAMINATHAN, B. & GHASSAN, M. M. Molecular typing methods. In: PERSING, D.H., SMITH, T. H.; TENOVER, F. C.; WHITE, T. J. (eds) **Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications**. Mayo Foundation, Rochester, MN 55905, 1993. p. 26–50.

SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; LA TORRACA, S.; MAGALHÃES, F. M. M.; OLIVEIRA, L.; PEREIRA, R. M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazônica, Manaus**, v.12, nº1, p.15-22, 1982.

TAKEUCHI, M.; HAMANA, K.; HIRAISHI, A. Proposal of the genus *Sphingomonas sensu stricto* and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.51, p. 1405-1417, 2001.

TAKEUCHI, M.; SAKANE, T.; YANAGI, M.; YAMASATO, K.; HAMANA, K.; YOKOTA A. Taxonomic study of bacteria isolated from plants: proposal of *Sphingomonas rosa* sp. nov., *Sphingomonas pruni* sp. nov., *Sphingomonas asaccharolytica* sp. nov., and *Sphingomonas mali* sp. Nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 45, p.334-341, 1995.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) programa version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, 10.1093/molbev/msm092, 2007.

TANAKA, Y.; HANADA, S.; MANOME, A.; TSUCHIDA, T.; KURANE R.; NAKAMURA K.; KAMAGATA, Y. *Catellibacterium nectariphilum* gen. nov., sp. nov., which requires a diffusible compound from a strain related to the genus *Sphingomonas* for vigorous growth **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 54, p.955 – 959, 2004.

TANG, Y.W.; ELLIS, N.M.; HOPKINS, M. K.; DODGE, D.E.; PERSING, D.H. Comparison of phenotypic and genotypic techniques of identification of unusual aerobic pathogenic gram negative Bacilli. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 3674-3679, 1998.

TANGAROMSUK, J.; POKETHITIYOOK, P.; KRUAETRACHUE ,M.; UPATHAM, E. S. Cadmium biosorption by *Sphingomonas paucimobilis* biomass. **Bioresource technology**, v.85, n°1, p. 103-5, 2002.

TEALE, W. D.; PAPONOV, I. A.; PALME, K. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.7, n°11, p.847-59, 2006.

THOMAS, J.-C.; ST-PIERRE, Y.; BEAUDET, R.; VILLEMUR, R. Monitoring by laser-flow-cytometry of the polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading *Sphingomonas* sp. strain 107 during biotreatment of a contaminated soil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 433–440, 2000.

THOMAS, P. M.; GOLLY, K. F.; ZYSKIND, J. W.; VIRGINIA, R. A. Variation of clonal, mesquite-associated rhizobial and bradyrhizobial populations from surface and deep soils by symbiotic gene region restriction fragment length polymorphism and plasmid profile analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.1146-1153, 1994.

THOMPSON, F. L.; IIDA, T.; SWINGS, J. Biodiversity of *Vibrios* Microbiol. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.68, p.403 - 431, 2004.

THOMPSON, F. L. & SWINGS, J. Taxonomy of *Vibrios*. In: THOMPSON, F. L.; AUSTIN B.; SWINGS J. (Org.). **The Biology of Vibrios**. 1 ed. Maryland: ASM, American Society for Microbiology, 2006. p.29-43.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v.22, p.4673-4680, 1994.

TORSVIK, V.; OVREAS, L.; THINGSTAD, T. F. Prokaryotic diversity--magnitude, dynamics, and controlling factors. **Science**, v. 10, n° 296, p. 1064-1066, 2002.

TORSVIK, V.; SORHEIM, R.; GOKSOYR, J. Total bacterial diversity in soil and sediment communities - A review. **Journal of Industrial Microbiology**, v.17, p.170-178, 1996.

TSAVKELOVA, E. A.; LOBAKOVA, E. S.; KOLOMEITSEVA, G. L.; CHERDYNTSEVA, T. A.; NETRUSOV, A. I. Localization of associative cyanobacteria on the roots of epiphytic orchids. **Mikrobiologiya**, v.72, p.86-91, 2003.

TSAVKELOVA, E. A.; CHERDYNTSEVA, T. A.; NETRUSOV, A. I. Auxin production by bacteria associated with orchid roots. **Mikrobiologiya**, v.74, n°1, p. 55-62, 2005.

TSAVKELOVA, E. A.; CHERDYNTSEVA, T.A.; KLIMOVA, S. YU.; SHESTAKOV, A. I.; BOTINA, S. G.; NETRUSOV, A. I. Orchid-associated bacteria produce indole-3-acetic acid, promote seed germination, and increase their microbial yield in response to exogenous auxin. **Archives of Microbiology**, v.188, p.655-664, 2007.

UEDA, T.; SUGA, Y.; YAHIRO, N.; MATSUGUCHI T. Remarkable N<sub>2</sub> -fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 5, p. 1414-1417, 1995.

UNNO, Y.; OKUBO, K.; WASAKI, J.; SHINANO, T.; OSAKI, M. Plant growth promotion abilities and microscale bacterial dynamics in the rhizosphere of Lupin analysed by phytate utilization ability. **Environmental Microbiology**, v.7, n°3, p.396-404, 2005.

UYTTEBROEK, M.; VERMEIR, S.; WATTIAU, P.; RYNGAERT, A.; SPRINGAEL, D. Characterization of cultures enriched from acidic polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil for growth on pyrene at low pH. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p.3159 - 3164, 2007.

VALLAEYS, T.; TOPP, E.; MUYZER, G.; MACHERET, V.; LAGUERRE, G.; RIGAUD, A.; SOULAS, G. Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. **FEMS Microbiology Ecology**, v.24, p. 279-285, 1997.

Van BRUGGEN, A. H. C.; BROWN, P. R.; GREATHEAD, A. Distinction between infectious and noninfectious corky root of lettuce in relation to nitrogen fertilizer **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.115, p.762 - 770, 1990.

Van ELSAS, J. D.; ROSADO, A. S.; WOLTERS, A. C.; MOORE, E.; KARLSON, U. Quantitative detection of *Sphingomonas chlorophenolica* in soil via competitive polymerase chain reaction. **Journal of Applied Microbiology**, v.85, n°3, p. 463-471, 1998.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLS, M.; DEVOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiology Reviews**, Washington, v. 60, n. 2, p. 407-437, 1996.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophic from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 127-141, 2001.

VIDEIRA, S. S.; CRUZ, G. B. da; BALDANI, V. L. D. **Gota d'água**: Método rápido para visualização de flagelos em bactérias. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2003. Comunicado Técnico 62. 4 p.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; Van de LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, London, v.23, n°21, p.4407-4414, 1995.

WAKELIN, S. A.; COLLOFF, M. J.; HARVEY, P. R.; MARSCHNER, P.; GREGG, A. L.; ROGERS, S. L. The effects of stubble retention and nitrogen application on soil microbial community structure and functional gene abundance under irrigated maize. **FEMS Microbiology Ecology**, v.59, n°3, p. 661-670, 2007.

WANG, H.; QI, M.; CUTLER, A. J. A simple method of preparing plant samples for PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 21, n.17, p. 4153-4154, 1993.

WARTIAINEN, I.; ERIKSSON, T.; ZHENG, W.; RASMUSSEN, U. Variation in the active diazotrophic community in rice paddy-*nifH* PCR-DGGE analysis of rhizosphere and bulk soil. **Applied Soil Ecology**, 2008, doi:10.1016/j.apsoil.2007.11.008

WAYNE, L. G.; BRENNER, D. J.; COWELL, R. R.; GRIMONT, P. A. D.; KANDLER, P.; KRICHEVSKY, M. I.; MOORE, L. H.; MOORE, W. E. C.; MURRAY, R.G.E.; STACKENBRANDT, E.; STARR, M. P.; TRÜPER, H. G. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 37, p. 463-464, 1987.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 51, p. 221-271, 1987.

WOODWARD, A. W. & BARTEL, B. Auxin: Regulation, Action, and Interaction **Annals of Botany**, v.95, p. 707 – 735, 2005.

XIE, C. H. & YOKOTA, A. Phylogenetic analysis of the nitrogenfixing genus *Derxia*. **Journal of General and Applied Microbiology**, v.50, p.129–135, 2004.

XIE, C. H. & YOKOTA, A. *Pleomorphomonas oryzae* gen. nov., sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from paddy soil of *Oryza sativa* **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.55, p. 1233 – 1237, 2005a.

XIE, C. H. & YOKOTA, A. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, p. 1435-1438, 2005b.

XIE, C. H. & YOKOTA, A. *Sphingomonas azotifigens* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of *Oryza sativa*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 56, p. 889-893, 2006.

YABUUCHI, E. & KOSAKO, Y. *Sphingomonas*. In: BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R.; STALEY, J.T. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology: the proteobacteria**. 2.ed. v.2, New York: Springer, 2005. p. 234-258.

YABUUCHI, E.; YANO, I.; OYAZU, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; YAMAMOTO, H. Proposals of *Sphingomonas paucimobilis* gen. nov. and comb. nov., *Sphingomonas parapaucimobilis* sp. nov., *Sphingomonas yanoikuyae* sp. nov., *Sphingomonas adhesiva* sp. nov., *Sphingomonas capsulata* comb. nov., and two genospecies of the genus *Sphingomonas*. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 34, p. 99-119, 1990.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; NAKA, T.; SUZUKI, S.; YANO, I. Proposal of *Sphingomonas suberifaciens* (van Bruggen, Jochimsen and Brown 1990) comb. nov., *Sphingomonas natatoria* (Sly 1985) comb. nov., *Sphingomonas ursincola* (Yurkov *et al.* 1997) comb. nov., and emendation of the genus *Sphingomonas*. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 43, p. 339-349, 1999.

YAMAMOTO, A.; YANO, I.; MASUI, M.; YABUUCHI, E. Isolation of a Novel Sphingoglycolipid Containing Glucuronic Acid and 2-Hydroxy Fatty Acid from *Flavobacterium devorans* ATCC 10829. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v.83, p.1213 – 1216, 1978.

YANO, D. M. Y.; ATTILI, D. S.; GATTI, M. S. V.; EGUCHI, S. Y.; OLIVEIRA, U. M. **Técnicas de microbiologia em controle de qualidade**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", 1991.

YOUNG, J. P. W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: STACEY, G., BURRIS, R.M., EVANS, H. J. **Biological Nitrogen Fixation**. New York, London, Chapman e Hall, 1992, p. 43-86.

YOUNG, J. P. W. Taxonomy and evolution of diazotrophs. In: PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M.; YATES, G.; NEWTON, W. E. (Ed.). **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Dordrecht: Kluwer, 2000, p.153-154.

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

YUN N. R.; SHIN Y. K.; HWANG S. Y.; KURAISHI H.; SUGIYAMA J. Chemotaxonomic and phylogenetic analyses of *Sphingomonas* strains isolated from ears of plants in the family Gramineae and a proposal of *Sphingomonas roseoflava* sp. nov. **Journal of General Microbiology**, v.46, n<sup>o</sup>1, p. 9-18, 2000.

YURKOV, V.; STACKEBRANDT, E.; BUSS, O.; VERMEGLIO, A.; GORLENKO, V.; BEATTY, J. T. Reorganization of the genus *Erythromicrobium*: description of "*Erythromicrobium sibiricum*" as *Sandaracinobacter sibiricus* gen. nov., sp. nov., and of

"*Erythromicrobium ursincola*" as *Erythromonas ursincola* gen. nov., sp. nov **International Journal of Systematics Evolution Microbiology**, v.47, p. 1172-1178, 1997.

ZAKHAROVA, E. A. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*. Insights from quantum chemistry. **European Journal of Biochemistry**, v. 259, n° 3, p. 572-6, 1999.

ZANOLARI, B.; FRIANT, S.; FUNATO, K.; SUTTERLIN, C.; STEVENSON, B. J.; RIEZMAN, H. Sphingoid base synthesis requirement for endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. **The EMBO Journal**, v.19, n°12, p. 2824-2833, 2000.

ZEHR, J. P.; JENKINS, B. D.; SHORT, S.; STEWARD, G. F. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. **Environmental Microbiology**, v.5, n°7, p.539-554, 2003.

ZHANG, Z.; SCHWARTZ, S.; WAGNER, L.; MILLER, W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. **Journal of Computational Biology**, v. 7, p.203-214, 2000.

ZHANG, G. X.; PENG, G. X.; WANG, E. T.; YAN, H.; YUAN, Q. H.; ZHANG, W.; LOU X.; WU, H.; TAN, Z. Y. Diverse endophytic nitrogen-fixing bacteria isolated from wild rice *Oryza rufupogon* and description of *Phytobacter diazotrophicus* gen. nov. sp. nov. **Archives of Microbiology**, v.188, n°5, 2007.

ZUCKERMANN, H.; STAAL, M.; STAL, L. J.; REUSS, J.; HEKKERT S TE, L., HARREN F.; PARKER, D. On-line monitoring of nitrogenase activity in *Cyanobacteria* by sensitive laser photoacoustic detection of ethylene **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.4243 - 4251, 1997.

## **CAPÍTULO II**

### **EFEITO DA INOCULAÇÃO DE *Sphingomonas* spp. EM PLANTAS DE ARROZ**

## RESUMO

A cultura do arroz de terras altas (sequeiro) tem grande importância econômica e social no Brasil, pois contribui com 32% do total do arroz produzido no País. Entre os principais nutrientes essenciais para as plantas, o N, juntamente com o P, são os que mais limitam a produtividade das culturas anuais, incluindo o arroz de terras altas. Embora o N seja o maior representante entre os componentes do ar atmosférico, ele necessita ser reduzido para que se torne disponível para as plantas. Esta redução pode ocorrer através da fixação industrial, responsável por 20% de todo o N fixado por ano. Este processo é oneroso e envolve a utilização de recursos não renováveis da natureza. Outro processo é a fixação biológica de nitrogênio (FBN), responsável por 80% do N fixado por ano, realizado por alguns microrganismos, denominados diazotróficos. Dentre as plantas que se associam a estes microrganismos o arroz tem sido caracterizado como habitat de inúmeros grupos de diazotróficos, que podem contribuir para a promoção de crescimento destas plantas. Apesar dos extensos estudos de FBN em plantas de arroz, não existem informações sobre as contribuições de N via FBN de bactérias do gênero *Sphingomonas*. Um experimento de casa de vegetação foi conduzido com o objetivo de avaliar o efeito da inoculação de bactérias do gênero *Sphingomonas* em plantas de arroz de terras altas cultivar BRS Talento. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado em fatorial 10 x 4 com 6 repetições. Os tratamentos constituíram de uma testemunha absoluta, 3 doses de nitrogênio (20, 50 e 100 kg ha<sup>-1</sup>) e inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* (ZAE94) e 5 estirpes de *Sphingomonas*, sendo efetuadas 4 coletas para cada tratamento (30, 70, 105 e 128 dias após plantio). Os resultados obtidos pela técnica de NMP mostram que a maior população de bactérias diazotróficas foi encontrada nas raízes. Resultados significativos foram obtidos pela inoculação das bactérias na cultivar BRS Talento. Os resultados mostraram que as estirpes inoculadas responderam de modo diferenciado no acúmulo de biomassa seca da parte aérea, nitrogênio, fósforo e potássio, durante os estádios de desenvolvimento desta cultivar de arroz. Quanto a produção de grãos, os tratamentos inoculados com ZAE94, *S. azotifigens*, *S. trueperi* e *Sphingomonas* spp. (estirpe 179) apresentaram efeitos positivos, podendo ser observado aumento de até 48 % na produção de grãos em relação ao controle não inoculado.

**Palavras – chave:** Promoção de crescimento vegetal. Nitrogênio. *Oryza sativa*.

## ABSTRACT

The cultivation of upland rice has high economic and social importance in Brazil, because contributes with 32% of the total rice produced in the country. Among the main essential nutrients for plants growth, the N, together with P, are the most limit for productivity of annual crops, including upland rice. Although the N is the largest representing among components of the atmosphere, for becoming available to the plants is necessary to be reduced. For this, two processes are known: the industrial setting, responsible for 20% of the N fixed per year, it's very expensive process and involves the use of non-renewable resources of nature. The other process is the biological nitrogen fixation (BNF), responsible for 80% of N fixed per year, held by some microorganisms named diazotrophics. Among the plants that are associated with these microorganisms, the rice has been characterized as a habitat of many groups of diazotrophics, which can contribute to the growth promotion these plants. Despite extensive studies of BNF in rice plants, there is no information about the contributions of BNF by *Sphingomonas* genus. A greenhouse experiment was conducted with the objective to evaluate the inoculation effects of type strains of *Sphingomonas* genus and some isolates previously obtained from rice plants. The treatments were control without nitrogen and bacteria, three nitrogen doses (20, 50 and 100 kg ha<sup>-1</sup>) and inoculation with *Sphingomonas* strains and *Herbaspirillum seropedicae* (ZAE94). The rice root presented the higher values of the diazotrophic bacteria population measured by MPN. Significant results were obtained by inoculation of bacteria in the rice cultivar BRS Talento. The results showed that the strains inoculated responded differently to the accumulation of dry biomass, nitrogen, phosphorus and potassium, during the stages of culture development. In addition, the production of grains the treatments inoculated with ZAE94, *S. azotifigens*, *S. trueperi* and *Sphingomonas* spp. (strain 179) had positive effects and increased the grain production in up to 48% in relation to the control.

**Key words:** Plant growth-promoting. Nitrogen. *Oryza sativa*.

## 1. INTRODUÇÃO

Arroz, trigo e milho são os três principais cereais utilizados na alimentação da população mundial. A cultura do arroz extrai cerca de 16-17 kg N para produzir 1 Mg de peso seco de grãos, incluindo palha. A maioria dos solos do mundo, principalmente aqueles localizados em clima tropical, são deficientes em N, sendo necessárias aplicações de N fertilizantes para a obtenção de um bom rendimento de grãos deste cereal. Infelizmente, menos de 50% dos adubos nitrogenados aplicado é utilizado pelas plantas. Esta baixa eficiência de utilização é essencialmente causada pelos processos de volatilização, desnitrificação, e perdas por lixiviação. Estes processos causam inúmeros problemas ambientais, dentre eles a contaminação de cursos d'água e aumento da concentração de gases do efeito estufa. Fontes alternativas de N tais como o uso de tecnologia da FBN pode completar ou substituir o uso destes fertilizantes químicos.

A maioria dos estudos de bactérias associadas a plantas de arroz está relacionada com a fixação biológica de nitrogênio. Bactérias diazotróficas pertencentes aos gêneros *Azospirillum*, *Azoarcus*, *Herbaspirillum*, e *Burkholderia* parecem ser colonizadores mais freqüentes dos cereais e, por isso têm sido extensivamente estudadas. Entre as bactérias fixadoras de nitrogênio associadas ao arroz, *Sphingomonas azotifigens* foi recentemente isolada das raízes deste cereal, entretanto, estudos sobre o seu efeito sobre as plantas hospedeiras não foram realizados.

Levando em conta que muitos microrganismos são utilizados como inoculantes agrícolas por estimular o crescimento vegetal, através da fixação biológica do nitrogênio atmosférico, produção de hormônios vegetais, entre muitos outros efeitos positivos gerados pela interação planta-bactéria, este capítulo refere-se à avaliação do efeito da inoculação de *Sphingomonas* spp. identificadas no capítulo I desta dissertação.

Os principais objetivos foram: (i) observar o comportamento populacional das bactérias diazotróficas do gênero *Sphingomonas* nas plantas de arroz e, (ii) avaliar o crescimento de plantas de arroz de terras altas (sequeiro) frente aos tratamentos de inoculação e diferentes doses de nitrogênio aplicadas, avaliando-se o efeito benéfico ou não, na produção de biomassa seca da parte aérea, acúmulo de nutrientes, produção de grãos e teor de proteína dos grãos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Nitrogênio na Cultura do Arroz

Diversos historiadores e cientistas apontam o sudeste da Ásia como o local de origem do arroz. Na Índia, uma das regiões de maior diversidade e onde ocorrem numerosas variedades endêmicas, as províncias de Bengala e Assam têm sido referidas como centros de origem dessa espécie. Duas formas silvestres são apontadas na literatura como precursoras do arroz cultivado: a espécie *Oryza rufipogon*, procedente da Ásia, originando a *O. sativa*; e a *Oryza barthii* (= *Oryza breviligulata*), derivada da África Ocidental, dando origem à *O. glaberrima*. O gênero *Oryza* é o mais rico e importante da tribo Oryzeae e engloba cerca de 20 espécies, dispersas espontaneamente nas regiões tropicais da Ásia, África e Américas. A espécie *O. sativa* é considerada polifilética, resultante do cruzamento de formas espontâneas variadas (EMBRAPA, 2007). De acordo com a classificação de Cronquist (1988), estas plantas são monocotiledôneas da família *Poaceae* (antiga *Gramineae*), que se caracterizam por possuir caules ocos, flores reduzidas de cor verde e aquênios especializados, ou cariopses, como frutos (PINHEIRO, 2006). É uma planta cultivada nos cinco continentes, tanto em regiões tropicais quanto temperadas.

O arroz é o alimento básico para mais de 2 bilhões de pessoas no mundo e, segundo estimativas, até 2050 a produção mundial deverá dobrar para atender à demanda da população (NAVES & BASSINELLO, 2006). No Brasil, o arroz ocupa a terceira posição em termos de produção de grãos, sendo antecedido pela soja e milho. De acordo com dados do IBGE, o arroz, o milho 1ª e 2ª safras e a soja, detêm cerca de 91% da produção brasileira de grãos. Para o arroz, a produção esperada para 2008 totaliza 12,0 milhões de toneladas sendo 7,8% maior que a colhida em 2007 (IBGE, 2008). O grande aumento na produção deste cereal tem estimulado experimentos na busca de contribuições que produzam menor impacto ambiental e aumento no rendimento desta cultura, de forma a reduzir seu custo de produção e aumentar a produtividade (CHOULHURY & KENNEDY, 2004).

Dentre as várias formas de incrementar a produção vegetal, destaca-se a importância do suprimento de nutrientes. A planta de arroz é bastante exigente em nutrientes, sendo necessário que eles estejam prontamente disponíveis nos momentos de demanda, para não limitar a produtividade. Depois do K, o N é o nutriente que a planta de arroz mais acumula. As aplicações de nitrogênio em plantas de arroz podem favorecer o crescimento vegetativo, promover o perfilhamento e a expansão foliar, aumentar o número de panículas por área, o número de espiguetas férteis e a massa dos grãos, contribuindo diretamente para o aumento de produção de grãos (WADA et al., 1986; AKITA, 1989; CASTILLO et al., 1992; FAGERIA et al., 2003). É na fase reprodutiva, porém, que a planta apresenta maior eficiência na absorção do nitrogênio para a produção de grãos. É nesta fase que o sistema radicular se encontra mais desenvolvido e, conseqüentemente, com maior potencial de absorção de nutrientes (SCIVITTARO & MACHADO, 2004).

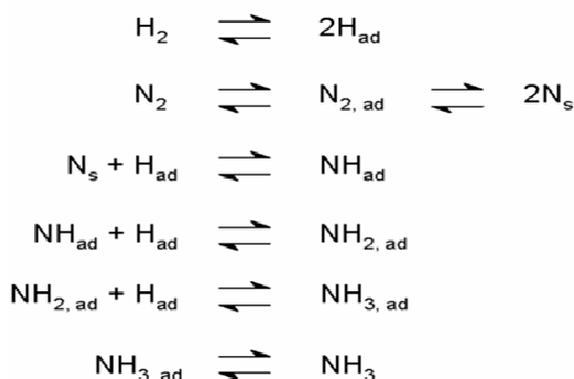
O aporte de N aos solos pode ser por meio de decomposição de material orgânico, descarga elétrica, utilização de fertilizantes nitrogenados e fixação biológica de nitrogênio. Dentre estas possibilidades, a utilização de fertilizantes sintéticos é, sem dúvida, a prática mais empregada para reposição do N aos solos cultiváveis. Estes fertilizantes são demasiadamente dispendiosos, custeando para a agricultura cerca de U\$\$ 45 bilhões anualmente (LADHA & REDDY, 2003). Atrélado a este fator, inúmeros danos são gerados quando estes fertilizantes são aplicados. Cerca de 50% do nitrogênio aplicado é utilizado pelas plantas, o restante deste nutriente é perdido do sistema solo-planta gerando um grande dano ambiental e econômico. O uso excessivo deste nutriente vem causando contaminação de

recursos hídricos devido à mobilidade no solo através do fluxo de massa, além de grandes perdas por volatilização e desnitrificação (STOLZFUS et al., 1997; SAIKIA & JAIN, 2007).

Nesse contexto, processos biológicos de incorporação de N ao sistema solo-planta, como a fixação biológica de nitrogênio (FBN) vêm sendo amplamente estudados para avaliar o potencial de sua utilização nos sistemas de produção agrícola (BODDEY et al., 1995; MIRZA et al., 2000; MALIK et al., 2002; GUIMARÃES, et al., 2003; DOBBELAERE et al., 2003; FERREIRA, 2004; MUTHUKUMARASAMY et al., 2007; GOVINDARAJAN et al., 2008).

## 2.2 Fixação de Nitrogênio

O nitrogênio molecular ( $N_2$ ), embora seja o principal componente da atmosfera terrestre (aproximadamente 78,084 %), é quimicamente inerte a temperatura ambiente (SPRENT & SPRENT, 1990), e diferentemente de outros elementos, suas reservas minerais são relativamente escassas. Apesar de termodinamicamente favorável, a reação de redução de nitrogênio molecular à amônia – fixação do nitrogênio – requer uma energia de ativação extremamente alta, não ocorrendo espontaneamente sem a presença de catalisadores adequados. Na indústria, a fixação do nitrogênio é feita pelo processo de Haber (também conhecido como Processo Haber-Bosch) desenvolvido por Fritz Haber e Carl Bosch em 1909 e patenteado em 1910. Neste processo o hidrogênio e o nitrogênio (do ar) são combinados para produzir amônia (Figura 1). Esta reação é catalisada com o ferro, sob condições de 200 atmosferas de pressão, a temperatura de 450°C, sendo necessário mais de 1 Mg de combustível fóssil para produzir 1 Mg de amônia (KIM & REES, 1994).

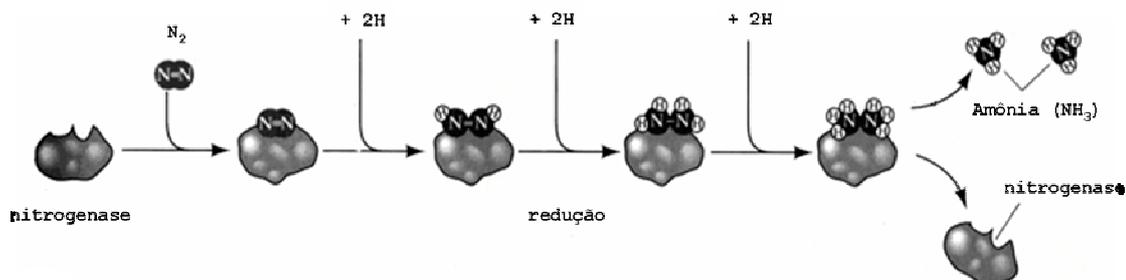


**Figura 1.** Ilustração simplificada do processo químico de produção de amônia ( $NH_3$ ) (processo Haber-Bosch). Fonte: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/thumb/7/74/HaberBoschProcess.png>

Na natureza, nem as plantas nem os animais conseguem realizar a fixação de nitrogênio, sendo este um processo restrito a alguns organismos procarióticos, como certas espécies de bactérias e cianobactérias. Estes organismos denominados fixadores de nitrogênio ou diazotróficos, são capazes de reduzir nitrogênio molecular ( $N_2$ ) à amônia ( $NH_3$ ) em condições normais de temperatura e pressão. Esse processo, denominado fixação biológica do nitrogênio (FBN), é realizado por procariotos que apresentam o complexo protéico da nitrogenase, que hidrolisa 16 adenosinas trifosfato (ATP) e transfere 8 elétrons por molécula de  $N_2$  fixado (EADY & POSTGATE, 1974) (Figura 2).

Os sistemas biológicos fixam aproximadamente 100 a 170 milhões de Mg de N anualmente, sendo este um valor que se manteve relativamente constante no último século. Quanto à fixação industrial de N através do processo de Haber, no ano de 2002 a produção

anual foi cerca de 80 milhões de Mg. A fixação não biológica de nitrogênio, em virtude da energia fornecida pelos relâmpagos, corresponde a um valor comparativamente insignificante, de cerca de 10 milhões de Mg por ano de N, valor este que se admite não ter variado significativamente ao longo dos tempos (<http://www.e-escola.pt/site/topico.asp?topico=387&canal=5>). Desta forma, pode-se concluir que o processo de FBN é um dos dois maiores processos que regulam a vida no planeta, juntamente com a decomposição da matéria orgânica e a fixação biológica de carbono (fotossíntese).



**Figura 2.** Ilustração simplificada do processo biológico de produção de amônia ( $NH_3$ ) (fixação biológica de nitrogênio). Fonte: adaptado de [www.cegep-ste-foy.qc.ca/profs/gbourbonnais/pascal/nya/botanique](http://www.cegep-ste-foy.qc.ca/profs/gbourbonnais/pascal/nya/botanique)

### 2.3 Fixação Biológica de Nitrogênio em Arroz

A pesquisa de FBN em *Poaceae* no Brasil foi iniciada por Johanna Döbereiner com a descoberta de *Beijerinckia fluminensis* na rizosfera de plantas de cana-de-açúcar em 1958, e *Azotobacter paspali* associada à *Paspalum notatum* cv *batatais* em 1966 (BALDANI & BALDANI, 2005). Embora estas descobertas tenham sido feitas na década de 60, somente a partir da década de 70 é que os estudos envolvendo a associação de bactérias diazotróficas com diversas plantas da família *Poaceae* de importância econômica se intensificaram. Esta época coincidiu também com a crise do petróleo, fazendo com que o interesse por alternativas biológicas ao uso de fertilizantes nitrogenados na agricultura fosse despertado (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002).

Devido à importância do potencial econômico e ambiental, a fixação biológica de nitrogênio tem atraído muitos estudos. Um dos pontos importantes nas pesquisas de FBN atualmente é a procura por bactérias diazotróficas associadas a plantas não-leguminosas como cana-de-açúcar, arroz, milho, trigo e algumas gramíneas forrageiras (BALDANI et al., 1997; 2002; BODDEY et al., 2003; JAMES et al., 2000; LOIRET et al., 2004; BRASIL, 2005; ZHANG et al., 2007; MEHNAZ et al., 2007).

A cultura do arroz remove cerca de 16-17 kg de N para produzir uma megagrama de peso de arroz bruto, incluindo a palha (DE DATTA, 1981; PONNAMPERUMA & DETURCK, 1993; SAHRAWAT, 2000). Como a maioria dos solos são deficientes em N e a aplicação de N fertilizante é onerosa e causa sérios problemas ambientais, a FBN pode ser utilizada para complementar ou suprir as necessidades de N pelas plantas de arroz (KENNEDY et al., 2004).

Bactérias de diversos gêneros têm sido isoladas de plantas de arroz, como *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Bradyrhizobium*, *Alcaligenes*, *Azospirillum* spp., *Paenibacillus azotofixans*, *Acetobacter*, *Ideonella*, *Herbaspirillum* spp., *Burkholderia* spp., *Klebsiella*, *Sphingomonas azotifigens*, *Pleomorphomonas oryzae*, *Azorhizobium caulinodans*, *Azospira oryzae*, *Phytobacter diazotrophicus*, dentre outras (LADHA et al., 1983; BALDANI & DOBEREINER, 1980; MALIK et al., 1981; FUJIE et al., 1987; TOU & ZHOU, 1989;

ROSADO et al., 1998; REINHOLD-HUREK & HUREK, 2000; ENGELHARD et al., 2000; KIRCHHOF et al., 2001; XIE & YAKOTA, 2006; 2005a,b; ZHANG et al., 2007). Entretanto, bactérias pertencentes aos gêneros *Azospirillum*, *Azoarcus*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia* parecem ser as colonizadoras mais frequentes deste cereal e têm sido extensivamente estudadas.

Segundo Evans & Burris (1992), as bactérias diazotróficas podem ser: (i) de vida livre, que fixam o nitrogênio para seu próprio uso; (ii) associativas, que de acordo com Baldani et al. (1997), são subdivididas em endofíticas facultativas (podem colonizar tanto a rizosfera como o interior dos tecidos) e endofíticas obrigatórias (colonizam o interior dos tecidos sem a formação de uma simbiose); e (iii) simbióticas, que estabelecem uma interação muito estreita entre o macro e microsimbionte, formando estruturas diferenciadas denominadas nódulos (FRANCO et al., 1995).

Atualmente, as maiores contribuições da FBN são encontradas pela simbiose *Rhizobium*-leguminosa, entretanto, experimentos de inoculação de bactérias diazotróficas em plantas de arroz vêm mostrando efeitos positivos. A inoculação de *H. seropedicae* em plantas de arroz mostrou um aumento no rendimento dos grãos equivalente à aplicação de 40 kg N ha<sup>-1</sup> (PEREIRA & BALDANI, 1995), enquanto inoculação de *Azospirillum* sp. contribuiu com 30% do N total nas plantas (MALIK et al., 2002). Baldani et al. (2000) mostraram que, em condições de casa de vegetação, estirpes M130 (*Burkholderia* sp.), ZAE94 (*H. seropedicae*) e M209 (*Burkholderia* sp.) contribuíram com 20, 17 e 11 % respectivamente do nitrogênio acumulado na massa seca das plantas de arroz. Guimarães (2003) mostrou que a inoculação de estirpes de *H. seropedicae* e *Burkholderia brasilensis* contribuiu no aumento de matéria seca, acúmulo de nitrogênio e produção de grãos de arroz nas cultivares Guarani, IR42 e IAC4440. Mais recentemente, Sabino (2007) utilizando as mesmas estirpes de *H. seropedicae* e *B. brasilensis*, não observou influência da inoculação na produção de grãos, no entanto, o teor de nitrogênio nos grãos aumentou significativamente nos tratamentos com bactérias e sem a adição de nitrogênio. Resultados semelhantes foram encontrados por Rodrigues et al. (2000), avaliando o efeito de estirpes de *Azospirillum* spp. em plantas de arroz. Já os resultados obtidos por Mirza et al. (2000) mostraram que a inoculação de *A. lipoferum* aumentou significativamente o rendimento de plantas de arroz.

Embora muitos resultados individualizados de ganhos de produção e acúmulo de nitrogênio nos grãos de plantas de arroz forneçam informações significativas, de forma geral, dados contraditórios são frequentemente observados. De acordo com Bashan & Levanony (1990), o principal problema dos experimentos de casa de vegetação e campo são as respostas inconsistentes da planta à inoculação, apresentando baixa repetibilidade. Muitas variáveis contribuem para a complexidade da resposta à inoculação, como o genótipo da planta utilizada, estirpe inoculada, condições de cultivo e ambiente, disponibilidade de nitrogênio no substrato, dentre outros (BODDEY, 1995; GUIMARÃES et al., 2001; BALDANI et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2002; SALA et al., 2005; SABINO, 2007). Embora os resultados relacionados com a FBN em plantas de arroz sejam ainda inconclusivos, alguns trabalhos têm mostrado que parte do nitrogênio acumulado em plantas de arroz é oriundo da FBN (OLIVEIRA, 1994; BALDANI et al., 2000; KENNEDY, 2001; GUIMARÃES et al., 2000).

A maioria das pesquisas em plantas de arroz tem como objetivo principal o estudo de bactérias promissoras à FBN, entretanto estas plantas podem receber das bactérias outros benefícios (PATRIQUIN et al., 1983; STURZ et al., 1997; DOBBELAERE et al., 2003). Vários trabalhos mostraram que as bactérias diazotróficas presentes na rizosfera e no interior dos tecidos vegetais são capazes de estimular o crescimento, através da produção de substâncias promotoras como os fitorhormônios, ácido 3-indolacético (EL-KAWAS & ADACHI, 1999; BACA & ELMERICH, 2007), citocininas (TAKEI et al., 2001) e giberilinas (CASSÁN et al., 2001), inibição da síntese de etileno (GLICK et al., 1999), solubilização e

hidrólise de fosfatos (GYANESHWAR et al., 2002), biocontrole (BALLY & ELMERICH, 2007), melhora na assimilação de N, P e K (WU et al., 2005), dentre outros. Bactérias que apresentem mais de uma característica para a promoção de crescimento vegetal, como por exemplo, fixar nitrogênio e produzir fitohormônios ou solubilizar fosfato e produzir sideróforos, entre outras, são almejadas e rastreadas para uma possível aplicação no campo, objetivando a produção agrícola (VERMA et al., 2001).

Considerando o progresso dos resultados de FBN em plantas de arroz, Baldani & Baldani (2005) sugerem que as pesquisas devem continuar e novas estratégias de estudo da interação planta-bactéria, como por exemplo, a utilização de biofertilizantes contendo uma mistura de bactérias deve ser explorada a fim de otimizar este processo biológico de grande interesse para os sistemas agrícolas.

Oyaizu-Masuchi & Komagata (1988) reportaram o isolamento de um grande número de bactérias fixadoras de nitrogênio da rizosfera e raízes de plantas de arroz. Posteriormente, estas bactérias foram identificadas e 3 isolados foram classificados como a primeira espécie fixadora de nitrogênio do gênero *Sphingomonas*, *S. azotifigens* (XIE & YAKOTA, 2006). Conforme revisado no capítulo 1 desta dissertação, outros estudos mostram o isolamento de bactérias deste gênero de inúmeras plantas, inclusive o arroz, entretanto não existem informações sobre o efeito da inoculação destas bactérias em plantas de arroz. Desta forma, este capítulo propõe estudar o efeito da inoculação de diferentes estirpes de bactérias do gênero *Sphingomonas* no crescimento, acúmulo de nutrientes e produção de grãos de plantas de arroz sob condições de casa de vegetação.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Área de Estudo

O experimento de inoculação em plantas de arroz com bactérias do gênero *Sphingomonas* foi conduzido sob condições de casa de vegetação, no Campo Experimental da Embrapa Agrobiologia (CNPAB), Seropédica, RJ, entre os meses de novembro e janeiro de 2007.

#### 3.2 Cultivar Utilizada

Em função de trabalhos realizados com a inoculação de bactérias diazotróficas em plantas de arroz no Maranhão, a cultivar BRS Talento apresentou o maior potencial para a fixação biológica de nitrogênio (FBN), sendo então escolhida para este estudo. É uma cultivar que tem, em sua base genética, uma forte contribuição de ancestrais altamente adaptadas às condições de terras altas como IAC 47, cultivar tradicional de arroz de terras altas, já amplamente utilizada no Brasil (CASTRO et al., 2002).

#### 3.3 Delineamento Experimental

As parcelas experimentais constituíram-se de vasos, arranjos em um delineamento experimental inteiramente casualizado com 10 tratamentos, 4 épocas de coletas e 6 repetições. Em decorrência da análise de atividade de redução de acetileno e detecção do gene *nifH* realizadas no capítulo I desta dissertação, foram selecionadas 4 estirpes com capacidade de fixar nitrogênio, representadas por *Sphingomonas* spp. (estirpes 98 e 233), *S. azotifigens* e *Herbaspirillum seropedicae* (ZAE94); 2 estirpes não fixadoras de nitrogênio: *S. trueperi* e *Sphingomonas* spp. (estirpe 179); 3 tratamentos adubados com nitrogênio mineral, sob a forma de nitrato de amônio, com doses de 20, 50 e 100 kg ha<sup>-1</sup>; e 1 tratamento testemunha sem inoculação e sem adubo nitrogenado.

#### 3.4 Preparo do Inoculante

As estirpes foram cultivadas em 50 ml de meio DYGS sob agitação de 150 rpm a uma temperatura de 30°C durante 24 horas. Em seguida, todas as suspensões bacterianas foram ajustadas para uma densidade ótica de 0,8 a  $\lambda = 600$  nm, em um espectrofotômetro ( $\sim 10^9$  células ml<sup>-1</sup>).

O inoculante foi preparado à base de turfa previamente moída, seca e analisada, com a acidez corrigida, com carbonato de cálcio. A turfa passou por um processo de esterilização a temperatura de 121°C em autoclave por 2 dias com intervalos de 24 horas (FERREIRA et al., 2003; GUIMARÃES, 2006). Os inoculantes foram preparados com a adição de 15 ml de suspensão bacteriana em sacos de polietileno contendo 35 g de turfa. O inoculante foi mantido por 24 horas sob temperatura de 30°C antes de ser utilizado. Após o preparo, as sementes foram imersas em goma arábica a 3 % e em seguida, foram envoltas na turfa e colocadas para secar à sombra antes do plantio (FERREIRA et al., 2003; GUIMARÃES, 2006).

#### 3.5 Implantação do Experimento

Como substrato do experimento foi utilizado os primeiros 20 cm do horizonte A de um Argissolo Vermelho Amarelo, Série Itaguaí, coletados no campo experimental da Embrapa Agrobiologia. A deficiência de alguns nutrientes foi corrigida mediante análise química da terra (Tabela 1). A adubação de plantio consistiu da incorporação de 120 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, na forma de superfosfato simples e 60 kg ha<sup>-1</sup> de FTE-BR12 a terra no momento do acondicionamento nos vasos.

**Tabela 1.** Resultado da análise química de terra utilizada no experimento.

pH em H <sub>2</sub> O	Al	Ca+Mg	Ca	Mg	P	K
	-----cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> -----				-----mg dm <sup>-3</sup> -----	
5,6	0,1	2,2	1,5	0,7	2,3	90,0

O plantio foi feito em vasos com capacidade para 5 litros, onde foram acondicionados o equivalente a 4 kg de terra homogeneamente adubada com fósforo e micronutrientes. Após a semeadura de 5 sementes por vaso, a terra contida nos vasos foi umedecida até 30% da capacidade de campo e durante o cultivo os vasos foram irrigados diariamente para que a umidade ficasse sempre em torno deste valor. Quinze dias após a emergência das plantas foi feito um desbaste, deixando-se 3 plantas por vaso.

A adubação nitrogenada, quando realizada, foi dividida em três aplicações, sendo a primeira com o equivalente a 10 kg de N ha<sup>-1</sup>, realizada 10 dias após a germinação em todos os tratamentos nitrogenados. As outras duas adubações foram feitas em cobertura aos 30 dias após o plantio (DAP) por ocasião do início da diferenciação floral e aos 60 DAP por conta da floração, ambas na forma de nitrato de amônio.

Foram realizadas 4 coletas de acordo com quatro estádios de desenvolvimento da planta de arroz, sendo a primeira no período de desenvolvimento vegetativo (30 DAP); a segunda no estágio de diferenciação da panícula (70 DAP); a terceira no estágio de florescimento (105 DAP) e a quarta, no estágio de maturação completa dos grãos (128 DAP). Em cada coleta o vaso representante de cada tratamento foi retirado por inteiro e as plantas contidas no mesmo foram separadas para as determinações.

### 3.6 Determinações

#### 3.6.1 Contagem do número mais provável (NMP)

A técnica do NMP foi utilizada de acordo com a metodologia descrita por Döbereiner et al. (1995) para a contagem do número de bactérias presente no substrato, nas sementes utilizadas no plantio e no material vegetal produzido durante os diferentes estádios de desenvolvimento das plantas cultivadas.

##### a) substrato e semente

Foi utilizado para a contagem 10 g de substrato devidamente homogeneizado e 10 g de sementes esterilizadas superficialmente com hipoclorito de sódio 10% conforme descrito por Döbereiner et al. (1995). Ambas as amostras foram trituradas em 90 ml de solução salina e 1 ml da solução precedente foi retirado, para a realização das diluições seriadas até 10<sup>-8</sup>. Em seguida, 0,1 ml de cada diluição foi inoculada em frascos contendo 5 ml de meio semi-sólido LGI, LGI-P, NFb, JNFb e JMV com 3 repetições. Após 7 dias de incubação sob uma temperatura de 30°C procedeu-se a contagem das bactérias, sendo considerados com crescimento positivo aqueles que apresentavam a película característica de crescimento de bactérias diazotróficas (na condição microaerofílica). A contagem da população de bactérias diazotróficas foi realizada pela técnica de NMP, utilizando a tabela de McCrady para três repetições por diluição (DÖBEREINER et al., 1995).

##### b) material vegetal

O material vegetal obtido nas diferentes coletas foi devidamente lavado com água destilada e separado em raízes, colmos e folhas, e 1 g (para a primeira e segunda coletas) e 10 g (para a terceira e quarta coletas) de cada parte foi triturada em 9 e 90 ml de solução salina,

respectivamente e 1 ml da solução precedente foi retirada, para a realização das diluições seriadas conforme descrito anteriormente.

A contagem do número mais provável de bactérias diazotróficas foi feita nos meios LGI, para os tratamentos inoculados com *Sphingomonas* spp. e JNFb para o tratamento inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* (ZAE94). Para os tratamentos nitrogenados e a testemunha absoluta foram utilizados ambos os meios.

### **3.6.2 Acúmulo de biomassa e nutrientes**

Para determinação da biomassa seca da parte aérea, foi feita a secagem das plantas em uma estufa de circulação forçada, a uma temperatura constante de 65°C por um período de 48 horas.

A produção de grãos foi determinada após a coleta das panículas de todas as plantas. Os grãos foram retirados de cada panícula, e em seguida o peso foi determinado.

Após a colheita, a parte aérea e os grãos foram secados separadamente, pesados, moídos e analisados quimicamente, determinando-se os teores de N, P e K. Para a digestão das amostras, 200 mg de material vegetal, seco e moído, foram colocados em tubos de digestão, adicionando 1 ml de solução contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30 %, 1,5 ml de ácido sulfúrico concentrado e, por último 0,7 g de uma mistura catalisadora contendo 100 g de sulfato de sódio, 10 g de sulfato de cobre e 1,0 g de selênio. As amostras foram mantidas no bloco digestor até digestão total do material vegetal.

Para a quantificação do teor de nitrogênio, foi adotada metodologia proposta por Tedesco et al. (1985), a qual possibilita a recuperação do nutriente de forma semelhante à obtida com o método de Kjeldahl. Nos mesmos extratos mineralizados, foram determinados os teores de P e K, pelo método colorimétrico vanadato-molibdato (TEDESCO et al., 1995), e por espectrometria de chama (EMBRAPA, 1979), respectivamente. O acúmulo de N, P e K foram obtidos pelo produto entre a massa seca e os teores dos nutrientes em cada parte do vegetal.

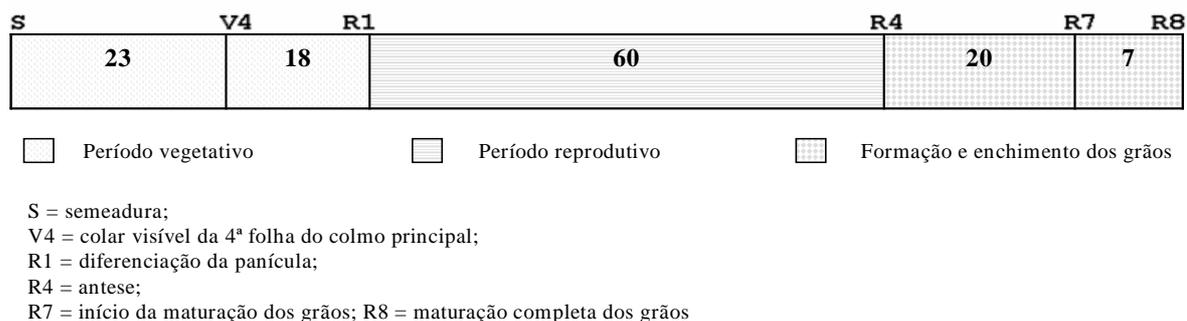
Para se obter o teor de proteína bruta dos grãos, os valores de N total foram multiplicados por 5,95, fator baseado em 16,8% de glutelina, a principal proteína de reserva do arroz (JULIANO, 1985).

### **3.6.3 Análises estatísticas**

Os dados foram analisados no programa SAEG 8.0 (EUCLYDES, 1983) quanto a sua normalidade (teste de Lilliefors) e homogeneidade de variância (teste de Cockran e Bartlett). Em seguida, foram feitas análises de variância com auxílio do programa SISVAR 5.0 (FERREIRA, 2003) e comparação de médias pelo teste Scott-Knott (SCOTT & KNOTT, 1974) a 5 % de probabilidade. A análise dos dados foi feita para cada coleta separadamente.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Durante as fases de experimentação, a cultivar BRS Talento satisfaz a expectativa em todas as regiões para as quais é recomendada como Amazonas, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Mato Grosso, Piauí, Rondônia e Tocantins. Como nenhum estudo com esta cultivar foi realizado nas condições testadas neste trabalho foi construída sua fenologia de acordo com algumas fases do desenvolvimento baseadas em critérios morfológicos (Figura 3).



**Figura 3.** Descrição dos eventos e marcadores morfológicos (em dias após plantio) relativos às fases e estádios de desenvolvimento da cultivar BRS Talento durante o período de experimentação.

### 4.1 Número Mais Provável (NMP)

#### a) Solo e semente

Entre a população de bactérias diazotróficas presentes na terra utilizada como substrato para a implantação do experimento (Tabela 2) verificou-se que a maior população bacteriana foi recuperada em meio LGI, semi-específico para *Azospirillum amazonense* e *Sphingomonas* spp.. Os demais meios de cultivo utilizados, JNFb (para *Herbaspirillum* spp.) NFB (*A. brasilense* e *A. lipoferum*), JMV (*Burkholderia* spp.) e LGI-P (*Gluconacetobacter* spp.) apresentaram valores populacionais menores que LGI e semelhantes entre si. Já nas sementes, a maior população foi recuperada no meio LGI-P, apresentando os demais meios valores inferiores e semelhantes entre si.

O solo constitui um dos principais reservatórios de carbono orgânico da Terra e um dos mais importantes habitats para microrganismos, principalmente os procaríotos (WHITMAN et al., 1998). Dentre microbiota do solo, particularmente da rizosfera, está uma grande parte das bactérias diazotróficas (POLY et al., 2001; WAKELIN et al., 2007).

**Tabela 2.** Número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas presente na terra utilizada como substrato e nas sementes utilizadas.

Amostra	Número de células / g de massa (log)				
	JNFb	LGI-P	JMV	LGI	NFb
Solo	1,84	1,84	2,17	3,65	2,60
Semente	2,30	3,17	2,95	2,30	2,30

Estas bactérias utilizam os exsudatos radiculares para seu desenvolvimento e além de contribuírem na incorporação do nitrogênio atmosférico ao sistema, podem atuar na promoção do crescimento vegetal através da liberação de substâncias promotoras de crescimento,

mineralização de compostos orgânicos, disponibilização de nutrientes, etc. (DOBBELAERE et al., 2003). Dentre as bactérias diazotróficas mais estudadas, algumas espécies foram caracterizadas como endofíticas, como *G. diazotrophicus*, *Herbaspirillum* spp. e *Burkholderia* spp., apresentando baixa sobrevivência em solos desnudos (REIS et al., 2000, 2006; OLIVARES et al., 1996). Entretanto, bactérias de vida livre, capazes de sobreviver no solo e também colonizar as plantas, representam o maior grupo de diazotróficas, compreendendo principalmente espécies de *Azospirillum* spp., *Azotobacter* spp., *Beijerinckia* sp, *Derxia* sp, entre outras.

A existência de um elevado número de bactérias diazotróficas associadas ao interior de tecidos de plantas de arroz é bastante conhecida, entretanto, pouco se sabe sobre bactérias endofíticas nas sementes de arroz (MANO et al., 2006). Baldani et al. (1992), localizaram bactérias do gênero *Herbaspirillum* na faixa interna do tegumento de sementes de arroz. Reis et al. (1994), por sua vez, sugeriram a disseminação de *Gluconacetobacter* por duas formas, sendo uma delas a disseminação pelas sementes das poáceas, inclusive arroz.

#### **b) Material vegetal**

A contagem do NMP de bactérias diazotróficas mostrou que as raízes tiveram maior número de bactérias quando comparadas com o colmo e as folhas. Comparando-se somente a parte aérea das plantas, o colmo apresentou maior número de células bacterianas que as folhas, que em alguns casos apresentou valores inferiores aos níveis mínimos de detecção pela técnica de NMP (Tabela 3). Estes resultados foram observados durante todas as fases de desenvolvimento das plantas em todos os tratamentos, inclusive na testemunha absoluta. A quantificação da população diazotrófica feita por diversos autores em diferentes cultivares de arroz revelam números mais elevados nas raízes, quando comparada com a parte aérea (BARRAQUIO et al. 1997; GUIMARÃES, 2001; RODRIGUES et al., 2006; SABINO, 2007). Brasil et al. (2005) também encontram em braquiária, capim carona e capim mimoso maior número de bactérias diazotróficas nas raízes do que na parte aérea ou no solo.

Os tecidos da superfície da planta sofrem mudanças drásticas nas suas condições físicas constantemente (temperatura, umidade, radiação UV). Essa situação de estresse impõe uma restrição no crescimento de populações bacterianas nas folhas (HIRANO & UPPER, 2000). Além disso, os exsudatos das folhas consistem de açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos e outros compostos que exige dos microrganismos uma grande versatilidade metabólica (MERCIER & LINDOW, 2000).

Os tratamentos inoculados, assim como o tratamento com 20 kg de N ha<sup>-1</sup> e a testemunha absoluta apresentaram valores superiores aos tratamentos com 50 e 100 kg de N ha<sup>-1</sup> (Tabela 3). Entre os tratamentos nitrogenados houve um decréscimo do número de células bacterianas por grama de massa fresca com o aumento da dose de nitrogênio aplicada. Estes resultados sugerem que plantas crescidas no solo, a população de bactérias diazotróficas naturais pode atingir populações semelhantes às observadas nos tratamentos inoculados (BALDANI, 1996; SABINO, 2007). As adubações com fertilizantes nitrogenados nas poáceas, também têm influenciado na população de bactérias diazotróficas, principalmente nas raízes (SALA et al., 2005). Na presença de elevado nível de N-mineral ocorre uma redução na população de bactérias diazotróficas, porque a FBN ocorre em resposta às necessidades da planta e desta forma não há estímulo à FBN. O grau de inibição pode variar de acordo com a fonte de N utilizada e com as espécies vegetais (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Entretanto, alguns resultados têm mostrado que pequenas doses de N podem beneficiar a FBN, funcionando como dose de arranque em determinadas culturas, principalmente em culturas anuais e leguminosas que apresentam nodulação tardia, como o feijão (ALVES et al., 2003; GUIMARÃES, 2006; SABINO, 2007).

**Tabela 3.** População de bactérias diazotróficas recuperada pela técnica de NMP durante o ciclo de desenvolvimento da cultivar de arroz BRS Talento.

Tratamentos		Número de células por grama de massa fresca (log <sub>10</sub> )											
		Vegetativo			Diferenciação da panícula			Antese			Maturação do Grão		
		Raiz	Colmo	Folha	Raiz	Colmo	Folha	Raiz	Colmo	Folha	Raiz	Colmo	Folha
ZAE 94 ( <i>nifH</i> <sup>+</sup> )		5,17	4,04	4,14	6,17	3,97	3,65	7,17	2,84	3,65	7,17	5,39	4,97
<i>S. azotifigens</i> ( <i>nifH</i> <sup>+</sup> )		5,65	5,17	5,17	6,65	6,17	3,97	6,30	3,65	3,97	6,97	4,17	3,97
<i>S. trueperi</i> ( <i>nifH</i> )		4,54	2,84	3,47	6,17	4,17	3,65	5,30	3,97	4,17	6,97	3,97	3,65
98 ( <i>nifH</i> <sup>+</sup> )		5,17	4,87	4,30	7,17	3,97	3,65	6,65	3,97	3,65	6,65	4,87	2,84
233 ( <i>nifH</i> <sup>+</sup> )		6,17	5,17	3,65	6,17	3,65	3,84	6,65	3,97	3,65	7,17	4,65	6,17
179 ( <i>nifH</i> )		5,65	4,17	3,95	7,17	4,97	3,95	7,65	4,17	2,95	6,97	3,97	3,97
20 kg N ha <sup>-1</sup>	LGI	5,04	3,95	2,84	8,65	4,65	3,60	6,65	2,95	3,65	6,87	4,65	3,17
	JNFb	4,54	2,84	3,95	6,17	3,95	3,65	4,20	3,95	3,14	5,17	4,20	3,95
50 kg N ha <sup>-1</sup>	LGI	3,65	2,84	ND	3,65	2,84	3,39	3,95	3,65	2,95	5,65	3,97	3,65
	JNFb	3,39	3,65	1,77	3,04	2,60	2,60	3,65	2,84	2,84	4,20	3,65	3,17
100 kg N ha <sup>-1</sup>	LGI	3,95	2,60	ND	2,84	2,60	3,65	3,97	2,84	3,65	4,97	3,65	3,97
	JNFb	2,95	2,84	1,47	3,39	2,95	1,47	2,95	2,84	2,47	3,95	2,84	2,47
Testemunha	LGI	4,17	2,95	ND	6,17	4,65	3,95	5,65	4,17	3,97	4,47	3,17	2,95
	JNFb	5,30	4,17	2,95	6,65	3,97	3,65	6,17	3,65	2,84	6,17	3,65	2,84

Observando-se a dinâmica da população de bactérias diazotróficas nas condições testadas, no decorrer do ciclo da cultivar de arroz BRS Talento, não se verificou diferenças acentuadas no valor numérico da população entre as épocas de coleta para colmo e folha. Nas raízes foi possível verificar que houve um pequeno aumento nos valores posteriormente ao período vegetativo. Estes dados mostram que não houve uma tendência definida a respeito de qual seria o comportamento das bactérias testadas durante o ciclo da cultivar de arroz BRS Talento. Em geral, para a cultura do arroz, a contagem da população de bactérias diazotróficas em tratamentos de inoculação e sem adubação nitrogenada, indica que o número de bactérias diminui com a idade da planta, havendo um equilíbrio no estágio de maturação, o que corresponde à fase final do ciclo da cultura (BALDANI, 1996; BARRAQUIO et al., 1997; GUIMARÃES, 2001; FERREIRA, 2004).

#### **4.2 Biomassa da Parte Aérea (BMS) e Acúmulo de N, P e K**

Os resultados obtidos na análise de variância (Anexo D) mostraram que não ocorreram diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos testados ao nível de 5 % de probabilidade, na biomassa seca da parte aérea e acúmulo de N, P e K no período vegetativo da cultivar BRS Talento. A Tabela 4 mostra as médias obtidas para cada parâmetro analisado. Já a análise de variância dos resultados obtidos para os demais estádios de desenvolvimento mostrou diferenças estatísticas significativas ao nível de 5% de probabilidade para todos os parâmetros analisados, inclusive para a produção de grãos (Anexo D; Tabelas 4 e 5).

Com relação à inoculação com as bactérias diazotróficas, o tratamento inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* (ZAE94) apresentou acúmulo de biomassa da parte aérea estatisticamente igual e/ou superior às plantas adubadas com 50 e 100 kg N ha<sup>-1</sup> nos períodos de diferenciação das panículas, no florescimento e na maturação dos grãos. Resultados semelhantes foram observados para a estirpe de *S. azotifigens*, nos períodos de florescimento e maturação dos grãos. Os demais tratamentos de inoculação apresentaram valores de acúmulo de BMS iguais aos tratamentos nitrogenados somente no período de diferenciação da panícula, com exceção do tratamento inoculado com a estirpe 179 (não-fixadora), que foi semelhante à testemunha em todas as fases de desenvolvimento. GUIMARÃES (2006) também verificou que o acúmulo de massa seca nas cultivares de arroz IR42 e IAC4440 inoculadas com a estirpe ZAE94, apresentou valores acima aos do controle, e estatisticamente iguais aos tratamentos com doses de 50 e 100 kg N ha<sup>-1</sup>.

O acúmulo de biomassa da parte aérea da cultivar de arroz estudada mostrou crescimento inicial lento e semelhante, até próximo aos 40 dias após a emergência (DAE) (Tabelas 3 e 4). A partir daí, o acúmulo de BMS foi mais intenso até a fase de diferenciação da panícula. De acordo com Fageria et al. (2004), esta acumulação até aproximadamente 100 dias de idade está relacionada com o aumento de perfilhos e de área foliar. Posteriormente à fase de florescimento, foi possível observar que houve uma diminuição do aumento de BMS para a maioria dos tratamentos inoculados e para a testemunha. O tratamento com *S. azotifigens*, por sua vez, apresentou uma taxa intermediária de acúmulo de biomassa seca na fase de diferenciação da panícula, porém, mostrou crescimento linear que se estendeu até a fase de maturação dos grãos. Resultados semelhantes foram obtidos para os tratamentos que receberam adubações nitrogenadas. Segundo Fageria et al. (1997), a diminuição do acúmulo de BMS da parte aérea de cultivares de arroz de terras altas após o período de floração está associada com a translocação do produto fotossintético para os grãos.

**Tabela 4.** Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas na produção de biomassa da parte aérea (BMS) e acúmulo de N, P e K durante os períodos vegetativo e diferenciação da panícula (média de 4 repetições). Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-knott ao nível de significância 0,05.

Tratamentos	Vegetativo				Diferenciação da panícula			
	BMS	N	P	K	BMS	N	P	K
	(g / planta)	----- (mg / planta) -----			(g / planta)	----- (mg / planta) -----		
ZAE94 ( <i>nifH</i> <sup>+</sup> )	1,10	63,67	0,46	6,4	4,99 a	88,87 b	2,49 b	14,2 b
<i>S. azotifigens</i> ( <i>nifH</i> <sup>+</sup> )	0,71	45,12	0,28	4,4	4,06 b	87,87 b	1,79 c	13,8 b
<i>S. trueperi</i> ( <i>nifH</i> )	0,84	51,14	0,32	5,4	5,04 a	103,35 a	2,43 b	19,7 a
98 ( <i>nifH</i> <sup>+</sup> )	1,02	58,03	0,39	6,2	5,21 a	109,88 a	1,86 c	16,3 a
233 ( <i>nifH</i> <sup>+</sup> )	0,90	54,52	0,36	5,4	5,59 a	111,61 a	3,54 a	18,7 a
179 ( <i>nifH</i> )	0,98	60,12	0,39	5,9	3,63 b	68,89 b	1,68 c	12,3 b
20 kg N ha <sup>-1</sup>	1,08	63,99	0,41	6,5	4,87 a	73,92 b	2,53 b	19,0 a
50 kg N ha <sup>-1</sup>	1,05	63,65	0,42	6,4	5,02 a	115,19 a	2,62 b	17,1 a
100 kg N ha <sup>-1</sup>	1,03	61,97	0,43	6,3	4,70 a	106,45 a	2,44 b	15,7 a
Testemunha	0,86	50,90	0,37	4,9	3,50 b	59,47 b	1,66 c	8,92 c

**Tabela 5.** Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas na produção de BMS da parte aérea e acúmulo de N, P e K durante o período de florescimento e maturação do grão (média de 4 repetições). Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-knott ao nível de significância 0,05.

Tratamentos	Antese				Maturação dos grãos			
	BMS	N	P	K	BMS*	N	P	K
	(g/planta)	----- (mg / planta) -----			(g / planta)	----- (mg / planta) -----		
ZAE94 ( <i>nifH</i> <sup>+</sup> )	6,69 a	95,40 a	2,82 a	43,5 a	6,47 a	63,74 b	0,97 b	40,1 a
<i>S. azotifigens</i> ( <i>nifH</i> <sup>+</sup> )	6,46 a	86,06 a	2,91 a	28,3 b	7,50 a	79,60 a	1,18 a	46,3 a
<i>S. trueperi</i> ( <i>nifH</i> )	5,41 b	65,85 b	1,71 b	16,9 c	4,59 b	45,51 b	0,73 c	29,1 c
98 ( <i>nifH</i> <sup>+</sup> )	5,31 b	76,07 a	2,05 b	18,5 c	5,27 b	57,80 b	0,72 c	32,9 b
233 ( <i>nifH</i> <sup>+</sup> )	4,62 b	66,08 b	2,77 a	17,1 c	5,37 b	60,53 b	1,10 a	36,9 b
179 ( <i>nifH</i> )	5,01 b	61,00 b	1,85 b	30,0 b	4,91 b	54,23 b	0,93 b	36,2 b
20 kg N ha <sup>-1</sup>	4,60 b	66,25 b	1,59 b	16,9 c	6,61 a	64,83 b	1,42 a	45,3 a
50 kg N ha <sup>-1</sup>	5,42 b	86,27 a	2,09 b	20,5 c	6,92 a	72,18 a	0,97 b	45,9 a
100 kg N ha <sup>-1</sup>	4,97 b	83,06 a	2,79 a	23,6 c	6,98 a	77,80 a	0,95 b	46,6 a
Testemunha	3,60 b	49,77 b	1,27 b	13,3 c	4,07 b	48,36 b	0,61 c	23,9 c

\*A biomassa seca da parte aérea na maturação dos grãos é composta de colmo e folhas.

Em relação ao acúmulo de N na parte aérea, os resultados dos tratamentos inoculados foram variáveis durante os diferentes estádios de desenvolvimento da cultura, com exceção do tratamento com *Sphingomonas* spp. - estirpe 179 - que apresentou valores semelhantes à testemunha em todos os estádios de desenvolvimento (Tabelas 4 e 5). O tratamento inoculado com *S. azotifigens* apresentou acúmulo de N estatisticamente igual aos tratamentos adubados com as doses de 50 e 100 kg N ha<sup>-1</sup> nos estádios de florescimento e maturação dos grãos. Resultados semelhantes foram observados na inoculação com ZAE94 e a estirpe 98 no estádio de florescimento. A maioria dos resultados de inoculação de ZAE94 em plantas de arroz mostra efeito positivo no acúmulo de N, principalmente no estádio de florescimento (GUMARÃES, 2001, 2006; SABINO, 2007). Os tratamentos adubados com 50 e 100 kg N ha<sup>-1</sup> foram estatisticamente superiores no acúmulo de N na parte aérea das plantas em todas as fases da cultura.

O acúmulo de fósforo na parte aérea das plantas de arroz também apresentou diferenças estatísticas variáveis no decorrer do desenvolvimento da cultura com relação aos tratamentos inoculados e adubados com diferentes doses de nitrogênio (Tabelas 4 e 5). Os tratamentos inoculados com *S. trueperi*, e *Sphingomonas* spp. - estirpes 98 e 179, assim como o tratamento adubado com 50 kg N ha<sup>-1</sup> e a testemunha absoluta, apresentaram os menores valores de acúmulo deste nutriente em todos os estádios de desenvolvimento das plantas. Os tratamentos inoculados com *S. azotifigens* e ZAE94 apresentaram acúmulo de P estatisticamente igual ao tratamento adubado com 100 kg N ha<sup>-1</sup> no estádio de florescimento. Além disso, *S. azotifigens* mostrou valores estatisticamente superiores aos tratamentos adubados com 50 e 100 kg N ha<sup>-1</sup> no estádio de maturação de grãos, semelhante ao tratamento adubado com 20 kg N ha<sup>-1</sup>. O tratamento de inoculação com a estirpe 233, que só apresentou valores de BMS da parte aérea e acúmulo de N semelhantes aos tratamentos nitrogenados na fase de diferenciação da panícula, apresentou maior acúmulo de P em todas as fases da cultura, inclusive na diferenciação da panícula, onde apresentou valor estatisticamente superior aos demais tratamentos.

Da mesma forma que os resultados encontrados para BMS da parte aérea, N e P, houve diferença significativa no acúmulo de K entre os tratamentos com variações durante os diferentes estádios de desenvolvimento (Tabelas 4 e 5). No estádio de diferenciação da panícula somente os tratamentos inoculados com *S. azotifigens* e ZAE94 apresentaram valores significativamente inferiores aos tratamentos adubados com N, mas, significativamente superiores à testemunha. Já no estádio de florescimento, o tratamento inoculado com ZAE94 apresentou valor estatisticamente superior aos demais tratamentos. Embora o tratamento com *S. azotifigens* tenha sido estatisticamente inferior ao de ZAE94, foi superior aos demais, inclusive àqueles que receberam adubações nitrogenadas. No último estádio de desenvolvimento, ambas estirpes mostraram valores estatisticamente iguais aos tratamentos nitrogenados, *S. trueperi* e a testemunha apresentaram os menores valores de acúmulo de K.

A interação entre íons é um assunto bastante estudado, por ser um fator importante no aproveitamento dos nutrientes pelas plantas (MALAVOLTA et al., 1980). O acúmulo de N pela cultivar de arroz utilizada seguiu o modelo de acúmulo de biomassa da parte aérea, embora tenha apresentado valores elevados do acúmulo de N nos estádios iniciais de crescimento da planta. O acúmulo de N atingiu sua concentração máxima no estádio de diferenciação da panícula, decrescendo linearmente até a fase de maturação de grão. O acúmulo de P na parte aérea de plantas de arroz apresentou-se lento no início do ciclo da cultura e aumentou até a idade de 100 dias (período da floração). Posteriormente, da mesma forma que o N, a acumulação de P diminuiu, provavelmente devido à translocação destes nutrientes para os grãos, seguindo o padrão de acumulação de BMS discutido anteriormente.

O acúmulo de K nos tecidos da parte aérea das plantas apresentou valores mais baixos nos estádios iniciais de crescimento aumentando linearmente até o estádio de maturação de

grãos. Quanto aos valores de acumulação máxima de N, P e K houve divergência quando comparados com os resultados obtidos por Fageria et al. (2004), onde K seria o macronutriente de maior acumulação, seguido de N, Ca, Mg e P. É possível que as diferenças observadas na literatura, quanto à absorção de K, estejam relacionadas com as diferenças existentes entre os cultivares utilizados (FAGERIA & SOUZA, 1995; CRUSCIOL et al., 1999). O K, apesar de juntamente com o N serem os mais absorvidos pela planta, não se tem verificado resposta à aplicação deste nutriente com tanta frequência como para o fósforo, em termos de aumento de produtividade de grãos de arroz (CRUSCIOL et al., 1999; FAGERIA, 2004).

Takenaga (1995) relata que em arroz a taxa de absorção de todos os nutrientes essenciais é maior durante a fase vegetativa e chega ao valor máximo até o estágio de floração. Aproximadamente 80% dos nutrientes que a planta absorve durante seu ciclo são absorvidos até a fase de floração. A maior parte destes nutrientes é acumulada nas folhas e colmos e translocadas para os grãos durante o estágio de enchimento de grão. Entre os macronutrientes, a translocação de N, P e S para os grãos é máxima e a de K, Ca e Mg é mínima (TAKENAGA, 1995).

De modo geral, todos os tratamentos encontram-se dentro da faixa de suficiência para o teor de N nos estádios vegetativo e de diferenciação da panícula, entretanto, nas últimas duas fases de desenvolvimento da cultura mantiveram-se abaixo do limite adequado de 2,6 a 4,2% (dados não apresentados). Para o teor de P e K, todos os tratamentos apresentaram valores abaixo do limite adequado preconizado em 0,25 - 0,48% e 1,5 - 4%, respectivamente (FAGERIA, 2006). Embora a deficiência nutricional dos macronutrientes N, P e K tenha sido detectada pela análise química da planta, nenhum sintoma visual de deficiência foi observado durante a condução do experimento. O teor de nutriente é usado como indicador de deficiência ou suficiência na planta, por isso, para a interpretação dos resultados das análises realizadas neste estudo buscou-se na literatura algumas informações para estabelecer um padrão de comparação para cada nutriente. Entretanto, admite-se que a absorção e a eficiência e utilização de nutrientes pelas plantas de arroz estejam condicionadas também a processos fisiológicos inerentes a cultivar utilizada, condições ambientais, propriedades físico-químicas do solo, dentre outros fatores bióticos e abióticos (FAGERIA et al., 1995).

Com relação à avaliação dos grãos, foram observados efeitos significativos na produção e acúmulo de N, P e K. Na produção de grãos e teor de N, com exceção das estirpes de *Sphingomonas* spp. 98 e 233 todos os demais tratamentos foram estatisticamente iguais aos tratamentos adubados, os quais não apresentaram diferenças entre si (Tabela 6). Os tratamentos inoculados com ZAE94, *S. azotifigens*, *S. trueperi* e *Sphingomonas* spp. (estirpe 179) apresentaram efeitos positivos, podendo ser observado aumento de até 48% na produção de grãos em relação à testemunha. Embora *Sphingomonas* spp. (estirpe 179), identificada previamente como não fixadora de nitrogênio, tenha mostrado resultados significativamente menores quanto aos demais parâmetros analisados, sua produção de grãos foi boa, provavelmente devido a presença de uma, ou mais, características relacionada à promoção de crescimento vegetal. Toescher et al. (2005), avaliando a produtividade de diversas cultivares de arroz de terras altas mostraram que, em condições ideais de cultivo, a cultivar BRS Talento teve uma produção média de 2,21 gramas por planta, produção esta semelhante a encontrada neste trabalho.

Aumentos na produção de grãos e no conteúdo de nitrogênio dos grãos de outras cultivares de arroz também foram observados em experimentos realizados por outros autores. Ferreira (2004) verificou contribuições que variaram de 13 % a 19 % em plantas que foram inoculadas com a estirpe ZAE94. Resultados similares foram obtidos em experimentos de inoculação com *Azospirillum* spp. na cultura do milho, com aumentos de 17 % na produção de grãos (CAVALLET et al., 2000). Estes autores observaram que a inoculação contribuiu

para o aumento na produção dos grãos, independente do manejo da adubação nitrogenada. A adubação com N, isoladamente, não aumentou a produtividade dos grãos de milho, sugerindo que os efeitos da bactéria podem ser outros, além da fixação biológica de nitrogênio, como por exemplo, efeitos hormonais que promovem o aumento do volume radicular.

Em relação ao teor de P dos grãos, somente o tratamento inoculado com a estirpe 98 de *Sphingomonas* spp. apresentou valor estatisticamente inferior aos demais tratamentos, inclusive a testemunha (dados não mostrados). O teor de K encontrado nos grãos também mostrou diferença significativa, sendo os tratamentos inoculados com *S. azotifigens*, *S. trueperi*, ZAE94 e 179 estatisticamente iguais ao tratamento adubado com 50 kg N ha<sup>-1</sup> e superiores aos demais.

O teor de proteína dos grãos não mostrou diferença significativa entre os tratamentos e a testemunha. Os valores encontrados neste estudo para proteína dos grãos da cultivar BRS Talento foram superiores ao encontrados por Martin-Didonet et al. (2006) (6,7% de proteína). Entretanto, a quantidade de proteína no grão pode variar de 7 a 14%, sendo esta influenciada também pelas condições de cultivo e fatores do ambiente (LIU et al., 2005). Vale a pena ressaltar que a avaliação deste parâmetro é de grande importância, já que a qualidade dos alimentos envolve múltiplos fatores e para o arroz, uma das mais importantes é a quantidade de proteína no grão (KRISHNAN & WHITE, 1995).

**Tabela 6.** Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas na produção, acúmulo de N, P e K e teor de proteína dos grãos (média de 4 repetições). Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-knott ao nível de significância 5%.

Tratamentos	Massa	N	P	K	Proteína
	(g / planta)	------(mg / planta)-----			(%)
ZAE94 ( <i>nifH</i> <sup>+</sup> )	3,40 a	79,42 a	2,28 a	3,1 a	13,92
<i>S. azotifigens</i>	3,43 a	80,99 a	2,07 a	3,8 a	14,01
<i>S. trueperi</i> ( <i>nifH</i> <sup>+</sup> )	3,20 a	75,22 a	1,97 a	3,3 a	13,94
98 ( <i>nifH</i> <sup>+</sup> )	2,16 b	51,75 b	1,30 b	2,0 b	14,17
233 ( <i>nifH</i> <sup>+</sup> )	2,56 b	50,29 b	1,74 a	1,7 b	11,55
179 ( <i>nifH</i> <sup>+</sup> )	3,43 a	74,66 a	2,02 a	3,5 a	13,07
20 kg N ha <sup>-1</sup>	3,07 a	67,97 a	2,03 a	1,9 b	13,21
50 kg N ha <sup>-1</sup>	3,35 a	77,57 a	2,00 a	3,1 a	13,79
100 kg N ha <sup>-1</sup>	3,43 a	87,19 a	2,30 a	2,0 b	15,06
Testemunha	2,35 b	56,35 b	1,28 b	1,5 b	14,30

## 5. CONCLUSÕES

- ✓ A maior população de bactérias diazotróficas isoladas das plantas de arroz foi encontrada nas raízes.
- ✓ As estirpes inoculadas repercutiram efeito diferenciado para a produção de biomassa seca da parte aérea, acúmulo de nitrogênio, fósforo, potássio e produção de grãos de arroz na cultivar testada.
- ✓ Os tratamentos inoculados com *Herbaspirillum seropedicae* (ZAE94), *S. azotifigens*, *S. trueperi* e *Sphingomonas* spp. (estirpe 179) promoveram aumento de até 48 % na produção de grãos em relação ao controle não inoculado e não adubado.
- ✓ Não houve relação entre a população de bactérias dizotróficas presente nos tecidos vegetais e os parâmetros analisados nos diferentes estádios de desenvolvimento em que as plantas foram coletadas.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na microbiologia do solo, a FBN é uma das áreas que tem recebido maior atenção da pesquisa no mundo todo, devido ao fato de a aplicação prática do processo ser viável em importantes leguminosas cultivadas e culturas anuais, trazendo benefícios econômicos e ambientais. Desde o início dos estudos a simbiose *Rhizobium*-leguminosa tem sido grandemente explorada, proporcionando uma economia em fertilizantes nitrogenados de pelo menos R\$ 8 bilhões anualmente (ZILLI, 2005). Dentre os cereais, o arroz tem sido caracterizado como habitat de inúmeros grupos de diazotróficos, que podem contribuir significativamente para a nutrição nitrogenada destas plantas (KENNEDY et al., 2004). Apesar dos extensos estudos de FBN em plantas arroz, os conhecimentos atuais sobre as contribuições de N são predominantemente relacionados a bactérias dos gêneros *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum* e *Azorcus* (BALDANI, 1996, 2000; CHOUDHURY & KENNEDY, 2004; KENNEDY et al., 2004).

Embora muitos trabalhos mostrem a associação de bactérias do gênero *Sphingomonas* com plantas de arroz desde 1960, somente em 2006 foi descrita a primeira espécie diazotrófica deste gênero, *S. azotifigens*. Com o objetivo de avaliar se bactérias deste gênero obtidas de plantas de arroz, poderiam promover o crescimento vegetal desta cultura, implantou-se um experimento de inoculação das mesmas em uma cultivar de arroz sob condições de casa de vegetação. De forma geral, pode-se concluir que as informações preliminares obtidas neste experimento indicam que a inoculação de *S. azotifigens* e ZAE94 na cultivar de arroz BRS Talento apresentam resultados promissores quanto a suplementação de N, P e K, além de ganhos de biomassa da parte aérea e produção de grãos. No entanto, novos experimentos deverão ser feitos buscando otimizar as condições para que se obtenha uma melhor interação planta-bactéria.

Da mesma forma que se iniciaram as pesquisas com inoculação de bactérias de outros gêneros em plantas de arroz, é provável que estudos preliminares de seleção de estirpes de bactérias diazotróficas do gênero *Sphingomonas* que apresentem outras características relacionadas à promoção de crescimento vegetal, mostrem resultados mais satisfatórios quanto ao aumento dos rendimentos de grãos, reduzindo a dependência em relação aos fertilizantes sintéticos. Além de características intrínsecas das bactérias, alguns autores têm mostrado que interações entre bactéria-genótipo, genótipo-ambiente, dentre outras, também interferem diretamente na eficiência da promoção de crescimento das plantas hospedeiras (OLIVEIRA, 1994; KENNEDY, 2004). Sendo assim, a inoculação das bactérias diazotróficas caracterizadas e testadas neste estudo nas mesmas cultivares que foram isoladas podem apresentar resultados mais promissores devido à melhor interação planta-bactéria.

Cocking (2002) e muitos outros pesquisadores vêm mostrando a importância da utilização destes biofertilizantes no mundo agrícola. A utilização destes produtos contribuiria muito na superação de problemas como a baixa produtividade dos cereais obtida por pequenos produtores, devido à falta de recursos para custear os fertilizantes sintéticos, além de atuar como uma medida mitigadora dos impactos ambientais negativos causados principalmente pela utilização de fertilizantes químicos em excesso. No entanto, muitos trabalhos científicos ainda precisam ser feitos para que o uso destas bactérias possa ser utilizado na produção agrícola sem colocar em risco a produção.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKITA, S. Improving yield potential in tropical rice. In: IRRI. **Progress in irrigated rice research**, Los Baños, p.41-73, 1989.

ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. S. The success of BNF in soybean in Brazil. **Plant and Soil**, v. 252: p.1–9, 2003.

BACA, B. E. & ELMERICH, C. Microbial Production of Plant Hormones. In: ELMERICH, C. & NEWTON, W. E. (Eds.) **Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations**, Springer: v. 5, 2007. p.111-137.

BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 29, n<sup>os</sup> 5/6, p. 911-922, 1997.

BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. S.; BALDANI, V. L. D. Potencial biotecnológico de bactérias diazotróficas associativas e endofíticas. In: SERAFINI, L. A., BARROS, N. M., AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**, Caxias do Sul: EDUCS, p. 195-232, 2002.

BALDANI, J. I. & BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in gramineaceae plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia de Ciências**, Rio de Janeiro, v.77, p. 549-579, 2005.

BALDANI, V. L. D. & DÖBEREINER, J. Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp.. **Soil Biology & Biochemistry**. Oxford, v. 12, n. 4, p. 433-439, 1980.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; OLIVARES, F. L.; DÖBEREINER, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis**, Rehovot, v. 13, p. 65-73, 1992.

BALDANI, Vera Lúcia Divan **Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e, ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica**. 290p. 1996. Tese (Doutorado em Agronomia – Ciência do solo) - Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biology and Fertility of Soils**, 30, 485–491, 2000.

BALLY, R. & ELMERICH, C. Biocontrol of Plant Diseases by Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bactéria. In: ELMERICH, C. & NEWTON, W. E. (Eds.) **Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations**. Springer: v. 5, 2007. p.171-184.

BARRAQUIO, W. L.; REVILLA, L.; LADHA, J. K. Isolation of endophytic bacteria from wetland rice. **Plant and Soil**, v.194, p.15–24, 1997.

BASHAN, Y. & LEVANONY, H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. **Canadian Journal of Microbiology**, v.36, p. 591-605, 1990.

BODDEY, R. M.; OLIVEIRA, O. C. D.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; OLIVARES, F. L. D., BALDANI, V. L. D., DOBEREINER, J.. Biological nitrogen fixation associated with sugarcane and rice: contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, v.174, p.195–209, 1995.

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

BRASIL, M. S.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Occurrence and diversity of diazotrophic bacteria associated to forage grasses of the Pantanal in the state of Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa , v. 29, n. 2, 2005.

CASSÁN, F. D.; LUCANGELI, C. D.; BOTTINI, R.; PICCOLI, P. N. *Azospirillum* spp. metabolize [17,17-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]gibberellin A<sub>20</sub> to [17,17-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]gibberellin A<sub>1</sub> in vivo in *dy* rice mutant seedlings. **Plant and Cell Physiology**, v. 42, n° 7, p.763-767, 2001.

CASTILLO, R. J.; BURESH, R. J.; INGRAN, K. T. Lowland rice yield as affected by timing of water deficit and nitrogen fertilizer. **Agronomy Journal**, v.84, p. 152-159, 1992.

CASTRO, E. M.; MORAIS, O. P.; BRESEGHELLO, F.; GUIMARÃES, É. P.; LOPES, A. DE M.; PEREIRA, J. A.; UTUMI, M.; NETO, F. P. M. **BRS Talento**: Cultivar Semi-precoce de Arroz de Terras Altas. Santo Antônio de Goiás, GO. Embrapa, 2002. 2 p. (Comunicado Técnico 53)

CAVALLET, L. E.; PESSOA, A. C. dos S.; HELMICH, J. J.; HELMICH, P. ROST.; C. F. Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum* spp. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.4, n.1, p.129-132, 2000

CHOUDHURY, A. T. M. A. & KENNEDY, I. R. Prospects and potentials for systems of biological nitrogen fixation in sustainable rice production. **Biology and Fertility of Soils** v.39, n 4, p.219 – 227, 2004.

COCKING, E. C. Concerted action for cereal and other non-legume crop nitrogen fixation, enhanced growth and yield. In: KENNEDY, I. R. & CHOUDHURY, A. T. M. A. (Eds.), **Biofertilisers in Action**, Rural Industries Research and Development corporation, Canberra, 2002, p. 1–3.

CRONQUIST, A. **The Evolution and Classification of Flowering Plants**. 2. ed. The New York Botanical Garden, New York, 1988. 555 p.

CRUSCIOL, C. A. C; MACHADO, J. R.; ARF, O.; RODRIGUES, R. A. F. Matéria seca e absorção de nutrientes em função do espaçamento e da densidade de semeadura em arroz de terra alta. **Scientia Agricola**, v.56, p. 63-70, 1999.

DE DATTA, S. K.; BURESH, R. J. Integrated nitrogen management in irrigated rice. **Advances in Soil Science**, v.10, p.143-169, 1989.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v.22, n.2, p.107-149, 2003.

DÖBEREINER, J. History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. **Symbiosis**, Rehovot, v.13, p.1-13, 1992.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Embrapa-SPI, Brasília, 1995. 60 p.

EADY, R. R. & POSTGATE, J. R. Nitrogenase. **Nature**, v.249, p.805-810, 1974.

ECKERT, B.; WEBER, O B.; KIRCHHOF, G.; HALBRITTER, A.; STOFFELS, M.; HARTMANN, A. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C<sub>4</sub>-grass Miscanthus, **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, p. 17-26, 2001.

EL-KHAWAS, H. & ADACHI, K., Identification and quantification of auxins in culture medio of *Azospirillum* and *Klebsiella* and their effect on rice roots. **Biology and Fertility of Soils**, v.28, p. 377-381, 1999.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Serviço Nacional de Levantamento de Conservação de Solos (Rio de Janeiro, RJ). **Manual de métodos e análise de solo**. Rio de Janeiro, 1979. 212 p.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **História do arroz**. Disponível em [www.cnpaf.embrapa.br/arroz/historia.htm](http://www.cnpaf.embrapa.br/arroz/historia.htm). Acessado em: 12 de dezembro de 2007.

ENGELHARD, M.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azoarcus* spp., in wild rice species and land races of *Oryza sativa* in comparasion with modern races. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 2, p. 131-141, 2000.

EUCLYDES, R. F. **Manual de utilização do programa SAEG (Sistema de Análise Estatística e Genética)**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1983. 59p.

EVANS, H. J. & BURRIS, R. H Highlights in biological nitrogen fixation during the last 50 years. In: STACEY G, BURRIS R. H., EVANS H. J. (eds) **Biological nitrogen fixation**. Chapman Hall, New York, 1992, p. 1-42.

FAGERIA, N. K. Tolerância diferencial de cultivares de arroz ao alumínio em solução nutritiva. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.17, n.1, p.1-9, 1982.

FAGERIA, N. K. & SOUZA, N. P. Resposta das culturas do arroz e do feijão em sucessão à adubação em solo de cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.30, n.3, p.359-368, 1995.

FAGERIA, N. K. & BALIGAR, V. C. Response of common bean, upland rice, corn, wheat and soybean to soil fertility of an oxisol. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.20, p.1279-1289, 1997.

FAGERIA, N. K.; SANTOS, A. B.; STONE, L. F. **Manejo de Nitrogênio em Arroz Irrigado**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2003. Circular técnica nº 58. 4 p.

FAGERIA, N. K.; BARBOSA FILHO, M. P.; STONE, L. F.; GUIMARÃES, C. M. Nutrição de fósforo na produção de arroz de terras altas. In: **Fósforo na agricultura brasileira**. YAMADA, T., & ABDALLA, S. R. S. Piracicaba: POTAFOS, 2004. p.401-416.

FAGERIA, N. K. Nutrição mineral. In: SANTOS, A. B.; STONE, L. F.; VIEIRA, N. R. A. **A cultura do arroz**. 2.ed. rev. ampl. – Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006, p.387-423.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 5.0. In: **45ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria**. UFSCar, São Carlos, SP, 2003. p.255-258.

FERREIRA, Joilson Silva. **Seleção e avaliação de veículos para inoculação de bactérias diazotróficas na cultura do arroz inundado**. 2004. 44f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

FERREIRA, J. S.; SABINO, D. C. C.; GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Seleção de veículos para o preparo de inoculante com bactérias diazotróficas para arroz inundado. **Revista Agronomia**, v.37, p.6-12, 2003.

FRANCO, A. A. Nutrição nitrogenada na cultura do feijoeiro. **Informativo Agrônomico (POTAFOS)**, Piracicaba, n. 70, p. 4-5, 1995.

FUJIE, T.; HUANG, Y. D.; HIGASHITANI, A.; NISHIMURA, Y.; IYAMA, S.; HIROTA, Y. Y.; DIXON, R. A. Effect of inoculation with *Klebsiella oxytoca* and *Enterobacter cloacae* on dinitrogen fixation by rice-bacteria associations. **Plant and Soil**, v.103, p.221-226, 1987.

GOVINDARAJAN, M.; BALANDREAU, J.; KWON, S. W.; WEON, H. Y.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Effects of the Inoculation of *Burkholderia vietnamsensis* and Related Endophytic Diazotrophic Bacteria on Grain Yield of Rice. **Microbial Ecology**, v.55, nº1, p. 21-37, 2008.

GLICK, B. R., PATTEN, C. L., HOLGUIN, G., PENROSE, D. M. Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. London, UK: **Imperial College Press**, p 86-179, 1999.

GUIMARÃES, S. L.; SABINO, D. C. C.; FERREIRA, J. S., BALDANI, J. I., BALDANI, V. L. D. Efeito da inoculação de estirpes de *Burkholderia* spp. em 3 cultivares de arroz inundado crescidas em condições gnotobióticas. In: Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas. **Anais...** Santa Maria: UFSM, p. 146., 2000.

GUIMARÃES, Salomão Lima **Seleção de estirpes de bactérias diazotróficas endofíticas para inoculação em três cultivares de arroz inundado**. 2001. 52p Dissertação (Mestrado em Agronomia – Ciência do solo) - Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

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

GUIMARÃES, Salomão Lima **Aplicação de inoculante turfoso com bactérias diazotróficas e molibdênio em cultivares de arroz adubadas com nitrogênio mineral**. 2006. 52p Tese (Doutorado em Agronomia - Fitotecnia) - Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

GYANESHWAR, P.; JAMES, E. K.; REDDY, P. M.; LADA, J. K. *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. **New Phytologist**, v. 154, p. 131-145, 2002.

HIRANO, S. S. & UPPER, C. D. Bacteria in the leaf are ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* – a pathogen, ice nucleous and epiphyte. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, p. 624-653, 2000.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Disponível em [http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_visualiza.php?id\\_noticia=1068&id\\_pagina=1](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1068&id_pagina=1). Acesso em: 15 de fevereiro de 2008.

JAMES, E. K. Nitrogen fixation n endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research**. v.3854, p.1-13, 2000.

JULIANO, B. O. Polysaccharides, proteins and lipids of rice. In: JULIANO, B. O. (Ed.). **Rice: chemistry and technology**. 2nd ed. St. Paul: American Association of Cereal Chemists, 1985. p. 59-175.

KAMPFER, P.; DENNER, E. B. M.; MEYER, S.; MOORE, E. R. B.; BUSSE, H.-J. Classification of “*Pseudomonas azotocolligans*” Anderson 1955, 132, in the genus *Sphingomonas* as *Sphingomonas trueperi* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, p. 577–583, 1997.

KENNEDY, I. R. & ISLAM, N. The current and potential contribution of asymbiotic nitrogen fixation to nitrogen requirements on farms: a review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.41, p.447–457, 2001.

KENNEDY, I. R.; CHOUDHURY, A. T. M. A.; KECSKÉS, M. L. Non-Symbiotic Bacterial Diazotrophs in Crop-Farming Systems: Can Their Potential for Plant Growth Promotion be Better Exploited? **Soil Biology & Biochemistry**, v.36, p. 1229–1244, 2004.

KIM, J. & REES, D.C. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. **Biochemistry**, v.33, p.389-397, 1994.

KIRCHHOF, G.; ECKERT, B.; STOFFELS, M.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C<sub>4</sub>-fibre plants. **International Journal of Systematics Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, p. 157-168, 2001.

KRISHNAN, H. B. & WHITE, J. A. Morphometric Analysis of Rice Seed Protein Bodies. Implication for a Significant Contribution of Prolamine to the Total Protein Content of Rice Endosperm. **Plant Physiology**, v.109, p. 1491-1495, 1995.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAUJO, W.L.; MENDES, R.; GERALDI, I.O.; PIZZIRANIKLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, v.6, n°12, p.1244-1251, 2004.

LADHA, J. K.; BARRAQUIO, W. L.; WATANABE, I. Isolation and identification of nitrogen fixing *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella planticola* associated with rice plants. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 29, p.301-1308, 1983.

LADHA, J. K. & REDDY, P. M. Nitrogen fixation in rice systems: state of knowledge and future prospects. **Plant and Soil**, v. 252, p. 151–167, 2003.

LIU, Z.; CHENG, F.; ZHANG, G. Grain phytic acid content in japonica rice as a deduced by cultivar and environment and its relation to protein content. **Food Chemistry**, v.89, p.49-52, 2005.

LOIRET, F. G. A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 3, p.504-511, 2004.

MALAVOLTA, E; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas, princípios e aplicações**. 2.ed. Piracicaba: Associação Brasileira para a Pesquisa do Potássio e do Fósforo, 1997. 281p.

MALIK, K. A. & SCHIEGEL, H. G. Chemolithoautotrophic growth of bacteria able to grow under N<sub>2</sub>-fixing conditions. **FEMS Microbiology Letters**, v.11, p.63-67, 1981.

MALIK, K. A.; MIRZA, M. S.; HASSAN, U.; MEHNAZ, S.; RASUL, G.; HAURAT, J.; BALLY, R.; NORMAND, P. The role of plant-associated beneficial bacteria in rice–wheat cropping system. In: KENNEDY, I. R. & CHOUDHURY, A. T. M. A. (Eds.). **Biofertilisers in Action**. Rural Industries Research and Development Corporation, Canberra, 2002, p. 73–83.

MANO, H.; TANAKA, F.; WATANABE, A.; KAGA, H.; OKUNISHI, S.; MORISAKI, H. Culturable surface and endophytic bacterial flora of the maturing seeds of rice plants (*Oryza sativa*) cultivated in a paddy field. **Microbes Environmental**, v. 21, n°2, p.86-100, 2006.

MARTIN-DIDONET, C. C. G.; DIDONET, A. D. L. F.; RANGEL P. H. Caracterização do teor de proteína total de 20 Genótipos de arroz (*Oryza sativa*) da coleção nuclear Brasileira de arroz cultivados em goiânia e Uruguaiana. In: **II Congresso Brasileiro da Cadeia Produtiva do Arroz**, 2006, Brasília. **Anais...** Santo Antonio de Goias: Embrapa Arroz e Feijao, 2006. Disponível em [http://www.cnpaf.embrapa.br/publicacao/seriedocumentos/doc\\_196/trabalhos/](http://www.cnpaf.embrapa.br/publicacao/seriedocumentos/doc_196/trabalhos/)

CBCTRAB\_23-1.pdf. Acesso em 08 de janeiro de 2008.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 57, p. 620-624, 2007.

MERCIER, J. & LINDOW, S. E. Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p.369-374, 2000.

MIRZA, M. S.; RASUL, G.; MEHNAZ, S.; LADHA, J. K.; SO, R. B.; ALI, S.; MALIK, K. A. Beneficial effects of inoculated nitrogen-fixing bacteria on rice. In: LADHA, J. K. & REDDY, P.M. (Eds.) **The Quest for Nitrogen Fixation in Rice**. International Rice Research Institute, Los Banos, 2000. p. 191–204.

MOREIRA, F. M. S. & SIQUEIRA, O. J. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: Editora UFLA, 2002. p. 449-451.

MUTHUKUMARASAMY, R.; KANG, U. G.; PARK, K. D.; JEON, W.-T.; PARK, C. Y.; CHO, Y. S.; KWON, S.-W.; SONG, J.; ROH, D.-H.; REVATHI, G. Enumeration, isolation and identification of diazotrophs from Korean wetland rice varieties grown with long-term application of N and compost and their short-term inoculation effect on rice plants **Journal of Applied Microbiology**, v.102, n°4, p.981–991, 2007.

NAVES, M. M. V. & BASSINELLO, P. Z. Importância na nutrição humana. In: SANTOS A. B.; STONE L. F.; VIEIRA N. R. A. **A cultura do arroz**. 2.ed. rev. ampl. – Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006, p.17-30.

OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils**, v.21, p.197-200, 1996.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; DOBEREINER, J.; BALDANI, J. I. The effect of inoculating endophytic N<sub>2</sub>-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, v.242, p. 205-215, 2002.

OLIVEIRA, Octavio Costa. **Quantificação biológica de nitrogênio em arroz (*Oryza sativa* L.) inundado**. 1994. 235p. Dissertação (Mestrado Agronomia – Ciência do solo) - Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

OYAIZU-MASUCHI, Y. & KOMAGATA, K. Isolation of free-living nitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of rice. **Journal of general and applied microbiology**, v. 34, p. 127–164, 1988.

PATRIQUIN, D. G.; DÖBEREINER, J.; JAIN, D. K. Sites and process of association between diazotrophs and grasses. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 29, p. 900–915, 1983.

PEREIRA, J. A. R. & BALDANI, J. I. Selection of *Azospirillum* spp.. and *Herbaspirillum seropedicae* strains to inoculate rice and maize plants. In: **International symposium on**

**sustainable agriculture for the tropics: the role biological nitrogen fixation.** Angra dos REIS, RJ, Brazil, 1995. p. 220-221.

PINHEIRO, B. da S. Características morfofisiológicas da planta relacionadas a produtividade. In: SANTOSm A. B.; STONE, L. F.; VIEIRA, N. R. A. **A cultura do arroz** 2.ed. rev. ampl. – Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006, p.209-256.

POLY, F.; MONROZIER, L. J.; BALLY, R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. **Research in Microbiology**, v.152, p.95-103, 2001.

PONNAMPERUMA, F. N. & DETURCK, P. A review of fertilization in rice production. **International Rice Commission Newsletter**, v. 42, p.1-12, 1993.

REINHOLD-HUREK, B. & HUREK, T.: Reassessment of the taxonomic structure of the diazotrophic genus *Azoarcus* sensu lato and description of three new genera and new species, *Azovibrio restrictus* gen. nov., sp. nov., *Azospira oryzae* gen. nov., sp. nov. and *Azonexus fungiphilus* gen. nov., sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.50, p.649–659, 2000.

REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; DOBEREINER, J. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.10, p.401-405, 1994.

REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm tree. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 19, p. 227-247, 2000.

REIS, V. M.; OLIVEIRA, A. L. M.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I. Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: FERNANDES, M. S. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas.** Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p. 153-174.

RODRIGUES, Luciana da Silva. **Estudo da diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a cultivares de arroz inundado.** 2003, 94 f. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo)- Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

RODRIGUES, L. da S.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Diversity of endophytic diazotrophic bacteria of the genus *Herbaspirillum* and *Burkholderia* in wetland rice. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 41, n. 2, p. 275-284, 2006.

RODRIGUES, O.; DIDONET, A. D.; GOUVEIA, J. A. Nitrogen translocation in wheat inoculated with *Azospirillum* and fertilized with nitrogen. Brasília. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 1473-1481, 2000.

■

ROSADO, A. S.; DUARTE, G. F.; SELDIN, L.; VAN ELSAS, J. D. Genetic diversity of *nifH* gene sequences in *Paenibacillus azotofixans* strains and soil samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.2770 – 2779, 1998.

SABINO, Daniele Cristina Costa. **Metabolismo de nitrogênio em plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) em associação com bactérias diazotróficas endofíticas**. 2003. 75p. Dissertação (Mestrado Agronomia – Ciência do solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

SABINO, Daniele Cristina Costa. **Interação planta-bactéria diazotrófica na cultura do arroz**. 2007. 71p. Tese (Doutorado em Agronomia – Ciência do solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

SAHRAWAT, K. L. Elemental composition of the rice plant as affected by iron toxicity under field conditions. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, Monticello, N.Y.: Marcel Dekker Inc. v. 31, p. 2819-2827, 2000.

SAIKIA, S. P. & VANITA, J. Biological nitrogen fixation with non-legumes: an achievable target or a dogma, **Current Science**, v.92, nº3, p-317-322, 2007.

SALA, V. M. R.; FREITAS, S. S.; DONZELI, V. P.; FREITAS, J. G.; GALLO, P. B.; SILVEIRA, A. P. D. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.29, p. 345-352, 2005.

SCIVITTARO, V. B. & MACHADO, V. O. Adubação e calagem para a cultura do arroz irrigado. In: GOMES, A. S. & MAGALHÃES Jr, A. M. (eds). **Arroz irrigado no sul do Brasil**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 259-303, 2004.

SCOTT, A. J. & KNOTT, M. A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, v. 30, nº2, p. 507-512, 1974.

SIERRA, S. A. Simple method for detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. **Antonie van Laeuwenhoek**, v.23, p.15-22, 1957.

SPRENT, J. I. & SPRENT, P. **Nitrogen fixing organisms pure and applied aspects**. London Chapman and Hall ed., 1990, 256 p.

STOLTZFUS, J. R.; SO, R.; MALARVITHI, P. P.; LADHA, J. K., BRUIJN, F. J. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. In: LADHA, J. K.; BRUIJN, F. J.; MALIK, K. A. **Opportunities for biological nitrogen fixation in rice and other non-legumes**. Reprinted from plant and soil, v. 194, nº1-2, p. 25-36, 1997.

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.

TAKEI, K.; SAKAKIBARA, H.; TANIGUCHI, M.; SUGIYAMA, T. Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: implication of cytokinin species that induces gene expression of maize response regulator. **Plant and Cell Physiology**, v.42, p.85-93, 2001.

TAKENAGA, H. Nutrient absorption in relation to environmental factors. In: MATSUO, T.; KUMAZAWA, K.; ISHII, R.; ISHIHARA, K.; HIRATA, H. **Science of the rice plant: physiology**. Tokyo: Nosan Gyoson Bunka Kyokai, 1995. p.278-294.

TEDESCO, M. J.; VOLKWEISS, S. J.; BOHNEN, H. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre: UFRGS. 1985. 188p. (Boletim Técnico, 5).

TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. **Análise de solos, plantas e outros materiais**. Porto Alegre: UFRG, Departamento de Solos/Faculdade de Agronomia, 1995. 174p. (Boletim Técnico; 5).

TOESCHER C. F., KÖPP L. M., ANCINELO A. G. Produtividade das cultivares de arroz desenvolvidas para terras altas e das desenvolvidas para inundação, quando irrigadas por aspersão, em uruguaiana, RS. Disponível em <http://www.pucrs.campus2.br/pesquisa/bpa/resumobpa2005/produtividadecultivares.pdf> Consultado em 02 de Janeiro de 2008.

TOU, C. & ZHOU, F. Non-nodular endorhizospheric nitrogen fixation in wetland rice. **Canadian Journal of Microbiology**, v.35, p.403–408, 1989.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophic from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 127-141, 2001.

WADA, G. S.; SHOJI, S.; MAE, T. Relation between nitrogen absorption and growth and yield of rice plants. **Japan Agricultural Research Quarterly**, v 20, p. 135-144, 1986.

WAKELIN, S. A.; GREGG, A. L.; SIMPSON, R. J.; LI, G. D.; RILEY, I. T.; MCKAY A.C. Pasture management directly affects soil microbial community structure and N-cycling bacteria. Submitted to **Australian Journal of Agricultural Research**, 2007.

WHITMAN, W. B; COLEMAN, D. C., WIEBE, W. J. Prokaryotes: the unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.95, p.6578-6583, 1998.

WU, S. C.; CAO, Z.H.; LIB, Z.G.; CHEUNGA, K.C.; WONGA, M. H. Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. **Geoderma**, v. 125, p. 155–166, 2005.

XIE, C. H. & YOKOTA, A. *Pleomorphomonas oryzae* gen. nov., sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from paddy soil of *Oryza sativa*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.55, p. 1233 - 1237, 2005a.

XIE, C. H. & YOKOTA, A. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, p. 1435-1438, 2005b.

XIE, C. H. & YOKOTA, A. *Sphingomonas azotifigens* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of *Oryza sativa*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 56, p. 889-893, 2006.

ZHANG, G. X.; PENG, G. X.; WANG, E. T.; YAN, H.; YUAN, Q. H.; ZHANG, W.; LOU, X.; WU, H.; TAN, Z. Y. Diverse endophytic nitrogen-fixing bacteria isolated from wild rice *Oryza rufipogon* and description of *Phytobacter diazotrophicus* gen. nov. sp. nov. **Archives of Microbiology**, v.188, n°5, 2007.

ZILLI, J. E. Fixação biológica de nitrogênio pode aumentar a competitividade do agronegócio em RR. Documento disponível em: [www.agrosoft.org.br/?q=node/15176](http://www.agrosoft.org.br/?q=node/15176). Acessado em 14/01/2008.

## CONCLUSÕES GERAIS

O resultado obtido pelo seqüenciamento do gene 16S DNAr, juntamente com as informações geradas pelos demais testes moleculares, fisiológicos e quimiotaxonômicos foram eficientes na determinação do gênero das bactérias isoladas de plantas de arroz.

Em nível de espécie, os isolados testados revelaram maior similaridade genética com a espécie fixadora de nitrogênio *Sphingomonas azotifigens*. Entretanto, somente após a realização da técnica de hibridização DNA:DNA será possível obter maior precisão na determinação taxonômica dos isolados.

Os métodos fenotípicos mostraram informações relevantes quanto ao metabolismo das bactérias testadas como, por exemplo, a tolerância a elevadas concentrações de NaCl e sacarose, fixação biológica de nitrogênio e produção de AIA *in vitro*, utilização de diferentes fontes de carbono, dentre outras. Além dessas, a busca de novas características como a produção de sideróforos e outros fitohormônios, supressão de bactérias e/ou fungos fitopatogênicos, produção de exopolissacarídeo e interação com outras bactérias, podem revelar bactérias mais promissoras para utilização na promoção de crescimento vegetal.

O comportamento populacional das bactérias na cultivar BRS Talento mostrou que a maior população foi encontrada nas raízes quando comparada com caules e folhas. O número de bactérias nos tecidos vegetais foi menor na coleta do período vegetativo, aumentando no período de florescimento e mantendo-se constante até a maturação de grãos.

A inoculação da cultivar de arroz BRS Talento com *Herbaspirillum seropedicae* (ZAE94) e diferentes estirpes de *Sphingomonas* revelaram efeitos positivos na produção de biomassa seca da parte aérea, acúmulo de nutrientes e produção de grãos. De forma geral, os tratamentos inoculados foram semelhantes aos tratamentos adubados com N-fertilizante e significativamente superiores ao controle não adubado e não inoculado.

## CONSIDERAÇÕES GERAIS

A cultura do arroz de terras altas tem grande importância econômica e social no Brasil, pois contribui com 32% do total de arroz produzido no País. Algumas condições favoráveis como o tipo de grãos produzido, a elevada produtividade e um menor custo de produção têm tornado o cultivo destas plantas uma opção viável no sistema de produção (FAGERIA, 2006). Entre os principais nutrientes essenciais para as plantas, o N, juntamente com o P, são os que mais limitam a produtividade das culturas anuais, incluindo o arroz de terras altas.

O nitrogênio constitui quase 78% de nossa atmosfera, na forma de  $N_2$ , sendo a principal fonte deste nutriente. Para que haja o aproveitamento do  $N_2$  atmosférico existem dois processos: a fixação industrial, conhecido como Processo Harber-Bosch, é um processo que envolve um alto investimento, sendo responsável por 20% de todo o N fixado por ano; e a fixação biológica de nitrogênio (FBN), responsável por 80% do N fixado por ano, realizado por microrganismos diazotróficos, que são capazes de reduzir nitrogênio molecular ( $N_2$ ) à amônia ( $NH_3$ ) em condições normais de temperatura e pressão.

A pesquisa de FBN em poáceas no Brasil foi iniciada por Johanna Döbereiner com a descoberta de bactérias diazotróficas associadas à rizosfera de plantas de cana-de-açúcar em 1958 e, grama batatais em 1966. A partir daí muitos estudos vem sendo realizados no intuito de obter estirpes que possam suprir, ao menos em parte, o N necessário para o desenvolvimento da plantas da família *Poaceae*. Embora estudos no mundo inteiro mostrem resultados promissores quanto à inoculação de bactérias diazotróficas de diferentes gêneros em diferentes cultivares de arroz, os experimentos não apresentam repetibilidade.

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que as bactérias isoladas de plantas de arroz pertencem ao gênero *Sphingomonas*, com maior similaridade genética com *S. azotifigens*, apresentam potencial para a promoção de crescimento vegetal, podendo contribuir diretamente com o N via FBN e com a produção de fitohormônios como AIA. Entretanto, outros estudos precisam ser realizados para ratificar as informações preliminares geradas. Para a determinação do posicionamento taxonômico das bactérias em nível de espécie ou estirpes, será necessário: (i) finalizar a hibridização DNA:DNA, (ii) fazer novas análises de restrição com a região intergênica 16S-23S DNAr, e (iii) analisar outros genes conservados. Para avaliar os efeitos na promoção de crescimento, além da avaliação do rendimento da cultura inoculada, os estudos futuros devem incluir análises, como: (i) a utilização de cultivares adaptadas a diferentes sistemas de cultivo (sob inundação e terras altas), com o objetivo de verificar se estas bactérias apresentam algum sistema de proteção para a nitrogenase, visto que esta enzima é altamente sensível ao  $O_2$ , (ii) a localização das bactérias no interior das plantas, assim como a expressão e quantificação da nitrogenase *in situ*, e (iii) localização dos genes relacionados à FBN no DNA cromossomal ou plasmidial.

## ANEXOS

### A. Meios de Cultivo

- **Meio JMV** (BALDANI V. L. D., 1996. **Tese** (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro)

Manitol		5g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	sol. 10 %	6 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	sol. 10 %	18 ml
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	sol. 10 %	2 ml
NaCl	sol. 10 %	1 ml
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	sol. 1 %	2 ml
Azul de bromotimol	sol. 0,5 % em 0,2 N de KOH	2 ml
FeEDTA	sol. 1,64 %	4 ml
Sol. de micronutrientes para meio de cultura		2 ml
Vitamina para meio de cultura		1 ml
Extrato de levedura		100 mg

Ajustar o pH para 5,0 – 5,4.

Completar para 1000 ml com água destilada.

Adicionar 1,6 g l<sup>-1</sup> de agar para semi-sólido e 25 g l<sup>-1</sup> para sólido.

Para meio líquido adicionar 10 mM de glutamato de sódio (1,87g/l) (indicador opcional).

- **Meio LGI** (MAGALHÃES et al., **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 55, p. 417-430, 1983)

Açúcar cristal (sacarose)		5g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	sol. 10 %	2 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	sol. 10 %	6 ml
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	sol. 10 %	2 ml
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	sol. 1 %	2 ml
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	sol. 0.1 %	2 ml
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	sol. 1 %	1 ml
Azul de bromotimol	sol. 0,5 % em 0,2 N de KOH	5 ml
FeEDTA	sol. 1,64 %	4 ml
Vitamina para meio de cultura		1 ml

Ajustar o pH para 6,0 – 6,2 com solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 5 %

Completar para 1000 ml com H<sub>2</sub>O destilada.

Adicionar 1,4 g l<sup>-1</sup> de agar para semi-sólido e 15 g l<sup>-1</sup> para sólido.

- **Meio DYGS** (RODRIGUEZ NETO, **Summa Phytopathologica**, Campinas, v. 12, n. 1-2, p. 16, 1986. )

Glicose	2 g
Ácido málico	2 g
Peptona bacteriológica	1,5 g
Extrato de levedura	2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g
Acido glutâmico	1,5 g

Ajustar o pH com solução de KOH a 10%:  
 pH 6,0 para *Herbaspirillum*.  
 pH 6,0 para *Gluconacetobacter* (menos ácido málico).  
 pH 6,8 para *Azospirillum*.  
 Completar para 1000 ml com H<sub>2</sub>O destilada.  
 Adicionar 15g l<sup>-1</sup> de agar para meio sólido.

- **Meio 79** (FRED & WAKSMAN, **Laboratory manual of general microbiology**. New York: McGraw Hill, 1928. 145 p.)

Manitol		10 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sol. 10 %	1 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sol. 10 %	4 ml
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Sol. 10 %	2 ml
NaCl	Sol. 10 %	1 ml
Extrato de levedura		0,4 g
Azul de bromotimol	Sol. 0,5 % em 0,2 N de KOH	5 ml
FeEDTA	Sol. 1,64 %	4 ml
Vitamina para meio de cultura		1 ml

Ajustar pH para 6,8 – 7,0 com solução de KOH a 10 %  
 Completar para 1000 ml com H<sub>2</sub>O destilada.  
 Adicionar 1,0 g l<sup>-1</sup> de agar para semi-sólido e 15 g l<sup>-1</sup> para sólido.

- **Meio LGI-P** (DÖBEREINER et al., Embrapa-SPI, Brasília, 1995)

Açúcar Cristal (sacarose)		100 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	sol. 10 %	2 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	sol. 10 %	6 ml
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	sol. 10 %	2 ml
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	sol. 1 %	2 ml
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	sol. 0.1 %	2 ml
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	sol. 1 %	1 ml
Azul de bromotimol	sol. 0,5 % em 0,2 N de KOH	5 ml
Vitamina para meio de cultura		1 ml

Ajustar o pH para 5,5 com solução de ácido acético a 1%.  
 Completar para 1000ml com água destilada.  
 Adicionar 1,3 g l<sup>-1</sup> de agar para semi-sólido e 25 g l<sup>-1</sup> para sólido.

- **Meio JNFb** (DÖBEREINER et al., Embrapa-SPI, Brasília, 1995)

Ácido málico	5 g	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	sol. 10 %	6 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	sol. 10 %	18 ml
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	sol. 10 %	2 ml
NaCl	sol. 10 %	1 ml
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	sol. 1 %	2 ml
Azul de bromotimol	sol. 0,5 % em 0,2 N de KOH	2 ml
FeEDTA	sol. 1,64 %	4 ml
Sol. de micronutrientes para meio de cultura	2 ml	
Vitamina para meio de cultura	1 ml	

KOH	4,5 g
Extrato de levedura (somente para meio sólido)	20 mg

Ajustar o pH para 5,8 com solução de KOH a 1%.

Completar para 1000 ml com água destilada.

Adicionar 1,7 g l<sup>-1</sup> de agar para semi-sólido e 17 g l<sup>-1</sup> para sólido.

- **Meio NFb** (BALDANI & DÖBEREINER, *Soil Biology & Biochemistry*. Oxford, v. 12, n. 4, p. 433-439, 1980)

Ácido málico		5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	sol. 10 %	5 ml
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	sol. 10 %	2 ml
NaCl	sol. 10 %	1 ml
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	sol. 1 %	2 ml
Azul de bromotimol	sol. 0,5 % em 0,2 N de KOH	2 ml
FeEDTA	sol. 1,64 %	4 ml
Sol. de micronutrientes para meio de cultura		2 ml
Vitamina para meio de cultura		1 ml
KOH		4,5 g
Extrato de levedura (somente para meio sólido)		50 mg

Ajustar o pH para 6,5 com solução de KOH a 1%.

Completar para 1000 ml com água destilada.

Adicionar 1,3 g l<sup>-1</sup> de agar para semi-sólido e 15g l<sup>-1</sup> para sólido .

- **Meio LG** (DÖBEREINER et al., Embrapa-SPI, Brasília, 1995)

Açúcar Cristal (sacarose)	20 g	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	sol. 10 %	0,5 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	sol. 10 %	1,5 ml
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	sol. 10 %	2 ml
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	sol. 1 %	2 ml
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	sol. 0.1 %	2 ml
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	sol. 1 %	1 ml
Azul de bromotimol	sol. 0,5 % em 0,2 N de KOH	5 ml

Ajustar o pH para 6,6 – 7,0.

Completar para 1000 ml com água destilada.

Adicionar 15 g l<sup>-1</sup> de agar para sólido.

- **Meio Batata** (BALDANI & DÖBEREINER, *Soil Biology & Biochemistry*. Oxford, v. 12, n. 4, p. 433-439, 1980)

Batata cozida	200 g
Ácido málico	2,5 g
Açúcar cristal	2,5 g
Solução de micronutrientes	2 ml
Solução de vitaminas	1 ml

Pesar os 200 g de batata e cozinhar em água destilada durante 30 minutos. Paralelamente, adicionar o ácido málico em 50 ml de água destilada com 2 gotas de azul de bromotimol sol.

0,5% em 0,2 N de KOH. Adicionar o açúcar cristal, o micronutriente e a vitamina e ajustar o pH com KOH ate atingir pH 6,8 – 7,0.

Filtrar a batata em algodão e juntar a solução preparada anteriormente ao filtrado. Completar o volume para 1000 ml.

Adicionar 1,84 g l<sup>-1</sup> de agar para semi-sólido e 15 g l<sup>-1</sup> de agar para sólido.

▪ **Meio Batata-P** (DÖBEREINER et al., Embrapa-SPI, Brasília, 1995)

Batata cozida	200 g
Açúcar cristal	100 g
Solução de micronutrientes	2 ml
Solução de vitaminas	1 ml

Pesar os 200 g de batata e cozinhar em água destilada durante 30 minutos. Paralelamente o açúcar cristal, o micronutriente e a vitamina em 50 ml de água destilada com 2 gotas de azul de bromotimol sol. 0,5% em 0,2 N de KOH. Filtrar a batata em algodão e juntar a solução preparada anteriormente ao filtrado. Completar o volume para 1000 ml. Adicionar e ajustar o pH com ácido acético ate atingir pH 5,5.

Adicionar 25g l<sup>-1</sup> de ágar para sólido.

**B. Soluções**

▪ **Solução salina para diluição seriada**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	sol. 10 %	1 ml
MgSO <sub>4</sub>	sol. 10 %	0,5 ml
NaCl	sol. 10 %	0,2 ml
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	sol. 10 %	0,5 ml
FeEDTA	sol. 1,64 %	1 ml
Sol. De micronutrientes para meio de cultura		0,5 ml

Ajustar o pH para 6,5 com solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 5 %, Completar com água destilada para 1000 ml.

▪ **Solução de micronutrientes para meio de cultura**

Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,200g
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,235g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .	0,280g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,008g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,024g

Completar o volume para 200 ml com água destilada.

▪ **Solução de vitaminas**

Biotina	10 mg
Piridoxol – HCl	20 mg

Dissolver em banho-maria e completar o volume para 100 ml com água destilada, Manter a solução em geladeira.

▪ Reagente de Lowry (LOWRY et al., **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951)

**Solução A:** 50 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> em 1 l de água destilada, 0,47 M

**Solução B:** 1 g de tartarato duplo de sódio e potássio e 1 l de água,  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,08 M,

**Solução C:** 1 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  em 1 l de água destilada, 0,04 M

Juntar 50 ml da solução A, mais 1 ml da solução C e 1 ml da solução B, nesta ordem.

▪ **Tampão fosfato – 0,5M**

$\text{K}_2\text{HPO}_4$	170 g	2 l $\text{H}_2\text{O}$
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	68 g	1 l $\text{H}_2\text{O}$

Promover a mistura das duas soluções e ajustar o pH para 7,0.

Guardar em geladeira e diluir em água destilada na hora do uso.

▪ **Tampão PBS**

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,4 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,2 g

Completar para 1000 ml de água destilada.

▪ **SSC 20 X**

NaCl Tris base	175,3 g
Citrato de sódio	88,2 g

Completar para 1000 ml de água destilada.

▪ **Revelador kodak D79**

Metol	3,5 g
Sulfito de sódio	60 g
Hidroquinona	9 g
Carbonato de sódio	40 g
Brometo de potássio	3 g

Aquecer 700 ml de água a 50° C, colocar os reagentes na seqüência e completar para 1000 ml com água destilada.

▪ **Solução para gel - acrilamida/bisacrilamida**

**Solução A**

Acrilamida	190 g
Bisacrilamida	10 g

Completar para 500 ml com água destilada

Aquecer até no máximo 60°C e filtrar em papel de filtro

**Solução B**

Uréia	450 g
Solução acrilamida – bisacrilamida	112,5 ml

Colocar no máximo 850 ml de água destilada e aquecer, sob agitação, no máximo a 60°C.

TBE 10 X	100 ml
----------	--------

EDTA (0,5 M, pH 8)                      4 ml

Completar para 1000 ml com água destilada e filtrar com papel de filtro.

### C. Resultados do Capítulo I

- Isolados viáveis obtidos durante as etapas de recuperação do estoque.

Isolados	Cultivar de Arroz	Solo	Planta
<b>62*</b> , 63, 65, <b>96</b>	IAC4440	GO	RL
<b>67</b> , 68, <b>169</b> , <b>192</b> , 252	IAC4440	GO	RE
71, <b>172</b> , LS 173	IAC4440	RJ	RL
<b>73</b> , 74, 98, 194	IAC4440	RJ	RE
75, <b>77</b> , 79, <b>99</b> , LS 100, <b>101</b> , <b>102</b> , 177, <b>248</b>	IAC4440	RJ	PA
<b>81</b> , <b>82</b> , 103, <b>104</b> , <b>179</b> , <b>180</b> , <b>195</b>	IR42	GO	RL
233	IR42	GO	RE
87, 88, <b>106</b> , <b>184</b>	IR42	GO	PA
93, <b>108</b> , 109, <b>110</b> , 111, 196	IR42	RJ	RL
94, <b>95</b> , 190	IR42	RJ	PA

\*Os isolados em negrito não apresentaram habilidade de fixar nitrogênio *in vitro*.

- Resultado da contagem do número de células viáveis e determinação da densidade ótica do isolado 194 cultivado em meio DYGS, pH 6,0.

Tempo (horas)	Nº de células viáveis	DO
0	$3 \times 10^1$	0,012
4	$1,3 \times 10^2$	0,094
8	$4,3 \times 10^5$	0,541
12	$5,3 \times 10^7$	0,880
16	$1,8 \times 10^9$	1,010
20	$1,2 \times 10^{11}$	1,183
24	$2,3 \times 10^{12}$	1,202
30	$2,5 \times 10^{12}$	1,241
42	$4,9 \times 10^{11}$	1,300
48	$6 \times 10^8$	1,234
55	$3,8 \times 10^5$	1,191
67	$1,2 \times 10^3$	1,021

- Resultado da produção de AIA em meio DYGS pelas estirpes tipo de *Sphingomonas* e isolados bacterianos.

Bactéria	Tempo (h)	Unidade de DO (600nm)	Prod. máx. AIA.( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Prod. ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ /Unid.DO <sub>600nm</sub> )
<i>S. azotifigens</i>	24	1,37	16,59	12,14
	42	1,30	9,45	7,27
<i>S. trueperi</i>	24	1,10	6,18	5,63
	42	1,13	6,31	5,60
<i>S.paucimobilis</i>	24	1,35	21,85	16,19

	42	1,39	53,58	38,57
63	24	1,24	10,18	8,20
	42	1,40	11,59	8,29
65	24	1,29	14,80	11,48
	42	1,35	12,04	8,95
68	24	1,31	22,20	16,92
	42	1,28	16,85	13,16
71	24	1,27	30,95	24,43
	42	1,15	16,95	14,74
74	24	1,27	6,14	4,82
	42	1,34	9,96	7,45
75	24	1,25	16,37	13,08
	42	1,24	13,64	11,01
79	24	1,12	18,39	16,43
	42	1,17	15,95	13,68
88	24	1,40	18,93	13,53
	42	1,35	14,89	11,01
89	24	1,24	15,15	12,22
	42	1,23	14,06	11,43
93	24	1,18	12,52	10,57
	42	1,19	24,19	20,34
94	24	1,35	15,95	11,86
	42	1,35	11,24	8,30
98	24	1,35	19,67	14,58
	42	1,28	11,72	9,18
100	24	1,30	19,03	14,64
	42	1,23	16,02	13,00
103	24	1,36	27,01	19,85
	42	1,28	49,86	38,95
109	24	1,23	24,13	19,57
	42	1,19	20,41	17,19
111	24	1,20	16,18	13,46
	42	1,15	15,44	13,38
173	24	1,37	11,82	8,65
	42	1,23	11,50	9,33
177	24	1,11	6,98	6,27
	42	1,28	33,90	26,44
190	24	1,22	5,98	4,89
	42	1,32	12,23	9,27
194	24	1,32	25,41	19,31
	42	1,32	20,25	15,34
196	24	1,14	22,43	19,68
	42	1,21	20,92	17,23
233	24	1,28	9,00	7,06
	42	1,31	9,86	7,54
252	24	1,13	24,96	22,19
	42	1,18	20,06	17,03

---

#### D. Análise de Variância do Capítulo II

- Tabela da análise de variância do acúmulo de biomassa seca da parte aérea, N, P e K do período vegetativo.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Biomassa seca da parte aérea (g / planta)					
TRAT	9	0.556379	0.061820	1.674	0,1395
erro	30	1.107886	0.036930		
Total corrigido	39	1.664265			
CV (%)	19,95				
N (mg / planta)					
TRAT	9	1563.113980	173.679331	1.237	0.3104
erro	30	4211.329477	140.377649		
Total corrigido	39	5774.443457			
CV (%)	20,67				
P (mg / planta)					
TRAT	9	0.099928	0.011103	1.672	0.1399
erro	30	0.199179	0.006639		
Total corrigido	39	0.299107			
CV (%)	21.13				
K (mg / planta)					
TRAT	9	19.605131	2.178348	1.414	0.2262
erro	30	46.212540	1.540418		
Total corrigido	39	65.817671			
CV (%)	21,19				

FV - Fonte de variação; GL - Grau de liberdade; SQ - Soma dos quadrados; QM - Quadrado médio dos desvios; F - Teste F; CV - coeficiente de variação

- Tabela da análise de variância do acúmulo de biomassa seca da parte aérea, N, P e K do período de diferenciação da panícula.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Biomassa seca da parte aérea (g / planta)					
TRAT	9	17,536437	1,948493	4,738	0,0006
erro	30	12,337432	0,411248		
Total corrigido	39	29,873869			
CV (%)	13,74				
N (mg / planta)					
TRAT	9	14097,248595	1566,360955	6,163	0,0001
erro	30	7624,982478	254,166083		
Total corrigido	39				
CV (%)	17,22				
P (mg / planta)					
TRAT	9	12,040705	1,337856	4,339	0,0011
erro	30	9,251033	0,308368		
Total corrigido	39	21,291737			
CV (%)	24,05				
K (mg / planta)					
TRAT	9	410,019862	45,557762	6,147	0,0001
erro	30	222,334350	7,411145		
Total corrigido	39	632,354212			
CV (%)	17,43				

- Tabela da análise de variância do acúmulo de biomassa seca da parte aérea, N, P e K do período de florescimento (antese).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Biomassa seca da parte aérea (g / planta)					
TRAT	9	29,189267	3,243252	5,276	0,0002
erro	30	18,441276	0,614709		
Total corrigido	39	47,630543			
CV (%)	15,21				
N (mg / planta)					
TRAT	9	7135,262733	792,806970	4,230	0,0013
erro	30	5623,313101	187,443770		
Total corrigido	39	12758,575833			
CV (%)	18,61				
P (mg / planta)					
TRAT	9	12,773632	1,419292	4,053	0,0018
erro	30	10,506594	0,350220		
Total corrigido	39	23,280226			
CV (%)	27,03				
K (mg / planta)					
TRAT	9	2913,756109	323,750679	13,568	0,0000
erro	30	715,842819	23,861427		
Total corrigido	39	3629,598928			
CV (%)	21,32				

- Tabela da análise de variância do acúmulo de biomassa seca da parte aérea, N, P e K do período de maturação do grãos.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Biomassa seca da parte aérea (g / planta)					
TRAT	9	49,168448	5,463161	10,443	0,0000
erro	30	15,694977	0,523166		
Total corrigido	39	64,863425			
CV (%)	12,31				
N (mg / planta)					
TRAT	9	4842,275862	538,030651	5,497	0,0002
erro	30	2936,056692	97,868556		
Total corrigido	39	7778,332554			
CV (%)	15,84				
P (mg / planta)					
TRAT	9	2,055810	0,228423	5,839	0,0001
erro	30	1,173654	0,039122		
Total corrigido	39	3,229463			
CV (%)	20,51				
K (mg / planta)					
TRAT	9	2289,395803	254,377311	5,769	0,0001
erro	30	1322,784384	44,092813		
Total corrigido	39	3612,180188			
CV (%)	17,31				

- Tabela da análise de variância da produção de grãos, acúmulo de N, P e K e teor de proteína nos grãos.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Massa dos grãos (g / planta)					
TRAT	9	8,733453	0,970384	5,366	0,0002
erro	30	5,424750	0,180825		
Total corrigido	39	14,158203			
CV (%)	13,98				
N (mg / planta)					
TRAT	9	6092,455427	676,939492	4,491	0,0009
erro	30	4521,763793	150,725460		
Total corrigido	39	10614,219220			
CV (%)	17,50				
P (mg / planta)					
TRAT	9	4,590068	0,510008	4,048	0,0018
erro	30	3,779287	0,125976		
Total corrigido	39	8,369355			
CV (%)	18,64				
K (mg / planta)					
TRAT	9	25,568180	2,840909	8,340	0,0000
erro	30	10,219372	0,340646		
Total corrigido	39	35,787552			
CV (%)	22,02				
Proteína (%)					
TRAT	9	31,510437	3,501160	1,237	0,3104
erro	30	84,892239	2,829741		
Total corrigido	39	116,402676			
CV (%)	12,27				