

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ANÁLISE DE POLISSACARÍDEOS ESSENCIAIS
PARA A NODULAÇÃO DO FEIJOEIRO POR *Rhizobium
tropicum* CULTIVADOS EM DIFERENTES FONTES DE
CARBONO.**

Tereza Cristina Luque Castellane

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Produção Vegetal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Junho de 2007

Castellane, Tereza Cristina Luque
C348a Análise de polissacarídeos essenciais para a nodulação do feijoeiro por *Rhizobium tropici* cultivados em diferentes fontes de carbono / Tereza Cristina Luque Castellane – Jaboticabal, 2007
xii, 74 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007

Orientador: Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Banca examinadora: João Martins Pizauro Júnior, Luiz Alberto

Colnago

Bibliografia

1. Exopolissacarídeo. 2. Lipopolissacarídeo. 3. nodulação. 4. *Phaseolus vulgaris*. 5. *Rhizobium tropici*. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 633.35:504.72

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Tereza Cristina Luque Castellane - nascida na cidade de Ribeirão Preto (SP), em 10 de dezembro de 1981. Graduiu-se em Engenharia Agrônoma pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP/FCAV), Campus de Jaboticabal (SP), no ano de 2005. Durante o período de graduação foi agraciada com Menção Honrosa conferindo um dos melhores trabalhos de iniciação científica apresentados durante evento de iniciação científica internacional realizada pela Universidade de São Paulo (USP). Em 2005, ingressou no curso de Mestrado em Agronomia, Área de concentração em Produção Vegetal, pela UNESP / FCAV, cujos resultados estão descritos nesta dissertação.

*"[...] Pequenos riachos acabam convertendo-se em grandes rios.
Então continue andando e fazendo sempre."
(Autor desconhecido)*

A minha amada mãe, Sônia Regina,
porque puseste a mão pela minha alma
e passaste por debaixo de minhas fraquezas.

DEDICO

Ao meu amor, Ivan Brandimarte,
pelo apoio, carinho e principalmente a compreensão.

À minha professora, Dr^a. Eliana G. de Macedo Lemos,
pela oportunidade que me foi dada.

À minha família,
pelas alegrias e felicidades,
transformando cada momento de minha vida inesquecível.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

- À Deus que sempre estavas presentes, na alegria ou na tristeza, fazendo da derrota uma vitória, da fraqueza uma força;
- Ao curso de Pós-Graduação pela oportunidade concedida;
- Aos professores do curso da pós e especialmente aos do Departamento de Tecnologia, pelos ensinamentos e sobretudo, pela amizade;
- Aos amigos do laboratório (LBMP), sempre prestativos e sem medir esforços na ajuda para com os outros, enfim, vocês são muito especiais;
- Ao Dr Luiz Alberto Colnago e Dr João Martins Pizauro Júnior, pelas considerações e sugestões para este trabalho;
- À Denise Osiro, pela valiosa ajuda na realização das análises espectroscópicas;
- Aos funcionários da seção de Pós-Graduação e Biblioteca, pela atenção e serviços prestados;
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo N° 05/53170-4) pelo apoio financeiro.
- Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para mais esta conquista.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	6
1. A importância da fixação biológica do nitrogênio.....	6
2. Polissacarídeos bacterianos necessários para uma simbiose efetiva.....	10
2.1. Relevância do exopolissacarídeo.....	10
2.2. Lipopolissacarídeo.....	15
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
1. Estirpes bacterianas utilizadas: Cultivo e manutenção.....	19
2. Meios de cultura utilizados.....	19
3. Curvas de crescimento da SEMIA 4077 e SEMIA 4080 em meio definido RDM e modificado, com alteração de fontes de carbono no cultivo.....	21
4. Método para Obtenção do Exopolissacarídeos Rizobiano.....	22
4.1. Inóculo e Condições de Cultivo.....	22
4.2. Isolamento, Purificação e Produção de Exopolissacarídeo.....	22
5. Análise do Exopolissacarídeo.....	23
6. Análises de Lipopolissacarídeos.....	25
7. Ensaio de nodulação.....	27
IV. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	29
1. Cultivo de bactérias.....	29
2. Curvas de Crescimento de <i>Rhizobium tropici</i> estirpes SEMIA 4077 e 4080.....	32
3. Produção de EPS.....	46
4. Análises da composição dos exopolissacarídeos.....	49
5. Análise do LPS.....	56
6. Avaliação do processo de nodulação.....	60
V. CONCLUSÕES.....	63
VI. REFERÊNCIAS.....	64

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estirpe de <i>Rhizobium tropici</i> SEMIA 4077, cultivadas em meio sólido definido (A) e modificado, contendo galactose (B), glicose (C) e sacarose (D), como fonte de carbono, a 28°C, 72 horas.....	30
Figura 2. Estirpe de <i>Rhizobium tropici</i> SEMIA 4080, cultivadas em meio sólido definido (A) e modificado, contendo galactose (B), glicose (C) e sacarose (D), como fonte de carbono, a 28°C, 72 horas.....	30
Figura 3. Curvas de crescimento obtidas de culturas de estirpes de <i>Rhizobium tropici</i> SEMIA 4077 (A) e SEMIA 4080 (B) mantidas em meio líquido RDM na presença de glicose (1) e em meio com galactose (2), a temperatura de 28 °C, sob agitação constante de 140 rpm.....	34
Figura 5. Curva de crescimento da estirpe <i>Rhizobium tropici</i> SEMIA 4077, mantidas em meio líquido RDM contendo galactose, com os respectivos parâmetros utilizados no modelo de equação, dada pela leitura da turbidez em relação ao tempo.....	35
Figura 6. Curva de crescimento da estirpe <i>Rhizobium tropici</i> SEMIA 4077, mantidas em meio líquido RDM contendo glicose, com os respectivos parâmetros utilizados no modelo de equação, dada pela leitura da turbidez em relação ao tempo.....	36
Figura 7. Curva de crescimento da estirpe <i>Rhizobium tropici</i> SEMIA 4080, mantidas em meio líquido RDM contendo galactose, com os respectivos parâmetros utilizados no modelo de equação, dada pela leitura da turbidez em relação ao tempo.....	37
Figura 8. Curva de crescimento da estirpe <i>Rhizobium tropici</i> SEMIA 4080, mantidas em meio líquido RDM contendo glicose, com os respectivos parâmetros utilizados no modelo de equação, dada pela leitura da turbidez em relação ao tempo.....	38
Figura 9. Curvas de crescimento obtidas de culturas de estirpes de <i>Rhizobium tropici</i> mantidas em meio líquido RDM com glicerol, a temperatura de 28 °C, sob agitação constante de 140 rpm.....	34
Figura 10. Curva de crescimento da estirpe <i>Rhizobium tropici</i> SEMIA 4077, mantidas em meio líquido RDM contendo glicerol, com os respectivos parâmetros utilizados no modelo de equação, dada pela	

leitura da turbidez em relação ao tempo.....	40
Figura 11. Curva de crescimento da estirpe <i>Rhizobium tropici</i> SEMIA 4080, mantidas em meio líquido RDM contendo glicerol, com os respectivos parâmetros utilizados no modelo de equação, dada pela leitura da turbidez em relação ao tempo.....	41
Figura 12. Curvas de crescimento obtidas de culturas de estirpes de <i>Rhizobium tropici</i> mantidas em meio líquido RDM com sacarose, a temperatura de 28 °C, sob agitação constante de 140 rpm.....	42
Figura 13. Curva de crescimento da estirpe <i>Rhizobium tropici</i> SEMIA 4080, mantidas em meio líquido RDM contendo sacarose, com os respectivos parâmetros utilizados no modelo de equação, dada pela leitura da turbidez em relação ao tempo.....	43
Figura 14. Curva de crescimento da estirpe <i>Rhizobium tropici</i> SEMIA 4077, mantidas em meio líquido RDM contendo sacarose, com os respectivos parâmetros utilizados no modelo de equação, dada pela leitura da turbidez em relação ao tempo.....	44
Figura 15. Curvas de crescimento de <i>Rhizobium tropici</i> das estirpes SEMIA 4077 (A) e 4080 (B) cultivadas em meio líquido RDM contendo glicerol (1), galactose (2), glicose (3) e sacarose (4), a temperatura de 28 °C, sob agitação constante de 140 rpm.....	46
Figura 16. Produtividade de EPS da estirpe de <i>Rhizobium tropici</i> SEMIA 4077 cultivadas em meio sólido definido (A) e modificado, contendo galactose (B), glicose (C) e sacarose (D), como fonte de carbono.....	47
Figura 17. Produtividade de EPS da estirpe de <i>Rhizobium tropici</i> SEMIA 4080 cultivadas em meio sólido definido (A) e modificado, contendo galactose (B), glicose (C) e sacarose (D), como fonte de carbono.....	47
Figura 18. Perfil cromatográfico padrão representativo de uma mistura de monossacarídeos padrões derivados com PMP. (*) resíduo PMP, solventes; (1) manose; (2) ramnose; (3) ácido glucurônico; (4) ácido galacturônico; (5) glicose; (6) galactose.....	50
Figura 19. Perfil cromatográfico representativo de açúcares derivados com PMP obtidos a partir da hidrólise do EPS da estirpe <i>Rhizobium tropici</i> SEMIA 4077 cultivada em meio RDM (A), RDM 2 (B), RDM 3 (C) e RDM 4 (D). Onde (*) solventes e resíduos; (**) resíduo do marcador PMP; (1) manose; (2) ramnose; (3) ácido glucurônico; (4) ácido galacturônico; (5) glicose; (6) galactose.....	51
Figura 20. Perfil cromatográfico representativo de açúcares derivados com PMP obtidos a partir da hidrólise do EPS da estirpe <i>Rhizobium tropici</i> SEMIA 4080 cultivada em meio RDM (A), RDM 2 (B), RDM 3 (C) e RDM 4 (D). Onde: (*) solventes e resíduos; (**) resíduo do marcador PMP; (1) manose; (2) ramnose; (3) ácido glucurônico; (4) ácido galacturônico; (5) glicose; (6) galactose.....	52
Figura 21. Espectros de FTIR de EPS produzido pela estirpe <i>Rhizobium</i>	

<i>tropici</i> SEMIA 4077 (A) e SEMIA 4080 (B) cultivada em meio contendo glicerol (1), galactose (2), glicose (3) e sacarose (4). As frequências dos picos foram determinadas através do espectro da segunda derivada (NAUMANN, 2000).....	54
Figura 22. Esquema da estrutura química do lipopolissacarídeo (a) e perfil eletroforético em SDS-PAGE (b).....	57
Figura 23. SDS-PAGE dos lipopolissacarídeos da parede celular das estirpes de <i>Rhizobium tropici</i> SEMIA 4077 (A) e 4080 (B), crescidas em glicerol, galactose, glicose e sacarose, respectivamente, canaletas 1, 2, 3 e 4.....	58

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Composição dos meios utilizados para cultivo das estirpes de <i>Rhizobium tropici</i>	20
Tabela 2. Tampão de eletrodo para eletroforese em gel de poliacrilamida.....	26
Tabela 3. Gel de separação (13%) para eletroforese em gel de poliacrilamida.....	26
Tabela 4. Gel concentrador (5%) para eletroforese em gel de poliacrilamida.....	26
Tabela 5. Reagente de Cor.....	26
Tabela 6. O efeito das diferentes fontes de carbono sobre o desenvolvimento de estirpes de <i>Rhizobium tropici</i>	46
Tabela 7. Composição dos exopolissacarídeos em monossacarídeos ⁽¹⁾ produzidos pelas duas estirpes de <i>Rhizobium tropici</i> : SEMIA 4077 e SEMIA 4080, cultivadas em diferentes fontes de carbono.....	50
Tabela 8. Avaliação do Número médio de Nódulos (NN) ^(1, 2) e Massa Seca dos Nódulos (MSN) ^(1, 3) em cultivar de feijão IAC - Carioca submetida à inoculação das estirpes de <i>Rhizobium tropici</i> SEMIA 4077 e SEMIA 4080.....	61

**ANÁLISE DE POLISSACARÍDEOS ESSENCIAIS PARA A NODULAÇÃO DO
FEIJOEIRO POR *Rhizobium tropici* CULTIVADOS EM DIFERENTES FONTES
DE CARBONO.**

RESUMO – O estabelecimento da simbiose é baseado em um complexo diálogo entre o rizóbio e a planta hospedeira. Polissacarídeos de superfície de origem rizobiana aparentam ser essenciais para o processo de infecção. A composição dos EPSs das estirpes de *Rhizobium tropici* SEMIA 4077 e SEMIA 4080 diferiram quantitativamente. Os quatro tipos de fontes de carbono têm efeitos diferentes na concentração da galactose e glicose, sendo maior para SEMIA 4080 cultivada em meio contendo sacarose. Mesmo a estirpe SEMIA 4080, apresentando grande quantidade de exopolissacarídeos liberado na cultura, não apresenta diferenças significativas no número de nódulos em relação às inoculações com a estirpe SEMIA 4077, sendo esta última, a que apresenta pior desempenho quanto à massa seca dos nódulos.

Palavras-chave: exopolissacarídeo, lipopolissacarídeo, nodulação, *Phaseolus vulgaris*, *Rhizobium tropici*.

**ANALYSIS OF ESSENTIAL POLYSACCHARIDES FOR NODULATION OF
COMMON BEAN BY *Rhizobium tropici* CULTIVATED UNDER DIFFERENT
CARBON SOURCES**

ABSTRACT – The establishment of symbiosis is based on a complex molecular dialogue between rhizobia and host plant. Rhizobial surface polysaccharides appear to be essential for the infection process. The EPSs composition produced by *Rhizobium tropici* SEMIA 4077 and SEMIA 4080, differed quantitatively from one another. Four types of culture media showed differential effects on the concentrations of the galactose and glucose, particularly the SEMIA 4080 strain, which was cultivated in sucrose medium. Even though the SEMIA 4080 strain produced a large quantity of EPS in culture, it was not significantly different from the number of nodules related to inoculations using strain SEMIA 4077.

Keyword: exopolysaccharide, lipopolysaccharide, nodulation, *Phaseolus vulgaris*, *Rhizobium tropici*.

I. INTRODUÇÃO

O nitrogênio é o elemento mais importante para uma produção apreciável na agricultura. Embora constitua quase 80% da atmosfera terrestre, o nitrogênio gasoso, N_2 , não pode ser utilizado diretamente pelas plantas. Contudo, as bactérias pertencentes à família *Rhizobiaceae* representam importante papel na agricultura, dado que algumas formam simbioses específicas com determinadas leguminosas, conduzindo à formação de órgãos altamente especializados, os nódulos, nos quais ocorre a fixação do nitrogênio (N_2) diretamente da atmosfera reduzindo-o a amônia (NH_3) ou aminoácidos, a qual pode ser incorporada para o crescimento e manutenção das células (ZHRAN, 2001).

Para que ocorra a formação do nódulo, é necessário que haja uma perfeita interação entre a planta e a bactéria durante uma série de etapas seqüenciais. Esta interação é medida por sinais moleculares, ou seja, compostos químicos exsudados por ambos os parceiros, os quais resultam na atividade dos genes da planta e da bactéria envolvidos na simbiose (LONG, 2001; SPAINK, 2000; STRALIOTTO *et al.*, 2002).

Inicialmente o rizóbio é atraído até as raízes da planta hospedeira, numa série de eventos pré-infecção. Neste estágio inicia-se a comunicação molecular entre a planta e bactéria, quando são decifrados pela bactéria os códigos enviados pela hospedeira. Este código é composto de diferentes substâncias exsudadas pelas raízes da hospedeira, como carboidratos, aminoácidos, além de compostos fenólicos (flavonóides) que compõem um gradiente químico na rizosfera, resultando na atração da bactéria até a superfície radicular (SPAINK, 2000; STRALIOTTO *et al.*, 2002; FRAYSSE *et al.*, 2003). A bactéria responde aos indutores da planta com a síntese de outros sinais moleculares, como o exopolissacarídeo (EPS), lipopolissacarídeo (LPS), o lipo-oligossacarídeo (LOS) ou oligossacarídeos lipoquitínicos (LCOs), denominados de Fatores Nod, polissacarídeo capsular (CPS), polissacarídeo nodular (NPS) e a β -glucana cíclica

entre outros, que têm sido considerados prováveis biomoléculas responsáveis pelo reconhecimento e interação célula/célula permitindo uma simbiose com células de plantas da família *Leguminosae* (FRAYSSE *et al.*, 2003).

Muitos estudos têm confirmado a importância desses polissacarídeos na interação entre a leguminosa hospedeira e o rizóbio (BECKER *et al.*, 2005; KARR *et al.*, 2000; KOSENKO *et al.*, 2001; KIRICHENKO *et al.*, 2004; LONG, 2001). Recentemente, FRAYSSE *et al.* (2003) constataram que uma infecção com sucesso requer uma complexa troca de moléculas de polissacarídeos, entre os endossimbiontes e às raízes da leguminosa hospedeira, talvez por serem substratos para um número grande de enzimas, que na maioria são altamente específicas (SUTHERLAND, 1999).

Diversos estudos têm mostrado, ainda, que vários tipos de EPS possuem ação análoga à dos flavonóides e fatores Nod, como pequenos sinais para o estabelecimento inicial da simbiose e, estudos mais recentes sobre outros polissacarídeos bacterianos, sugerem que em alguns casos os LPSs podem agir em etapas que antecedem a condução do fenótipo Fix⁺ (NOEL & DUELLI, 2000). Porém, os mecanismos de desenvolvimento simbiótico e de infecção ainda não estão claros e, por isso, existe um contínuo interesse em elucidar a genética, a biologia molecular e a bioquímica de polissacarídeos extracelulares e de superfície de origem bacteriana (VORHÖLTE *et al.*, 2001).

A composição química de um número considerável de EPS rizobianos já foi determinada (LEIGH & COPLIN, 1992; REINHOLD *et al.*, 1994; BECKER & PÜHLER, 1998; KARR *et al.*, 2000; CASTELLANE, 2004). A complexidade dos EPSs varia entre organismos e, por isso, existe a necessidade de análises comparativas com outras bactérias (LEIGH & COPLIN, 1992).

Segundo BECKER & PÜHLER (1998), os EPSs rizobianos são heteropolissacarídeos espécies- ou estirpe-específica, sendo compostos de diferentes tipos de monossacarídeos. A heterogeneidade da composição de EPSs produzidos por rizóbios ficou demonstrada em estudos com diferentes estirpes padrões de rizóbio (CASTELLANE, 2004). CASTELLANE (2004) sugeriu que

podem existir outros tipos de EPSs, diante dos resultados obtidos sobre a composição de EPSs produzidas por 26 estirpes padrões de rizóbios, através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), bem como dos dados disponíveis na literatura (DUDMAN, 1978; MORT & BAUER, 1982; HUBER, 1984; MINAMISAWA, 1989; REINHOLD *et al.*, 1994; KARR *et al.*, 2000). Uma vez que não foi possível caracterizar os EPSs de todas as estirpes como EPS tipo A ou B, EPS I, EPSII ou EPSIII, devido a presença de outros monossacarídeos que impediram tal classificação, adotou a seguinte classificação: EPS 1, aquele que contém os monossacarídeos glicose, galactose, manose, ramnose, ácido galacturônico em sua composição; EPS 2 quando ocorreu ausência de manose; EPS 3 quando ocorreu ausência de ácido galacturônico; e EPS 4, com composição dos monossacarídeos glicose, galactose e ramnose.

Existem evidências que a composição de EPS varia, não só entre os diversos gêneros, mas também com mudanças no meio ambiente bacteriano (BECKER *et al.*, 1998; KARR *et al.*, 2000; FRAYSSE *et al.*, 2003). Por exemplo, variações na composição do meio de cultura podem alterar a estrutura do EPS (BECKER *et al.*, 1998). Vários são os fatores que contribuem para regular a quantidade e características estruturais do EPS, tais como: (a) a osmolaridade do meio, que regula a abundância de EPS (BREEDVELD *et al.*, 1990); (b) o alto teor de nitrogênio, que regula a produção do EPS e favorece a produção de formas de EPS com baixo peso molecular (DUSHA *et al.*, 1999); (c) alteração de fonte de carbono, que pode interferir na produção de EPS (BECKER *et al.*, 1998; KARR *et al.*, 2000); entre outros.

BECKER *et al.* (1998) demonstraram a dependência da composição em monossacarídeos dos EPSs de dois tipos de *Bradyrhizobium japonicum* com a fonte de carbono usada durante o crescimento da bactéria. Quando cultivadas em arabinose, gluconato ou manitol, a estirpe produzia um tipo de EPS, mas quando cultivadas em malato, a estirpe produzia um EPS diferente. FRED *et al.* (1932) e GRAHAM (1964) observaram diferenças na utilização de carboidratos por diversas estirpes de rizóbio. MARTINEZ-DRETS & ARIAS (1972) encontraram diferenças

enzimáticas entre estirpes de crescimento rápido e crescimento lento associadas as mais importantes enzimas de quatro principais vias metabólicas dos carboidratos. Esse autor ainda sugeriu que, enquanto as bactérias pertencentes aos gêneros *Rhizobium* utilizam uma série de carboidratos e sais de ácidos orgânicos como fontes de carbono, muitas estirpes de *Bradyrhizobium* preferem a arabinose. Portanto, estirpes de rizóbio, inclusive as de crescimento rápido, diferem tanto em quantidade de polissacarídeo como em qualidade. Diferenças entre os genomas de rizóbios distintos têm corroborado a enorme diversidade metabólica apresentada por eles (BECKER *et al.*, 1998).

No trabalho realizado por TAVERNIER *et al.* (1998), envolvendo estudo *in vivo* por Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C com *Rhizobium meliloti*, observaram que quando as células eram cultivadas em meio contendo $[1-^{13}\text{C}]$ frutose, como fonte de carbono, produziam mais EPS e polihidroxibutirato (PHB) e menos β -(1,2) glucana e glucanato que quando cultivadas em meio contendo $[1-^{13}\text{C}]$ glicose. Observando a trajetória do carbono marcado, esses autores observaram diferenças significativas na biossíntese desses biopolímeros nas diferentes fases de desenvolvimento da cultura, fase exponencial e estacionária.

Além do EPS, outros metabólitos produzidos pelos rizóbios estão envolvidos no processo de nodulação (FRAYSSE *et al.*, 2003). Por exemplo, os lipopolissacarídeos (LPS) que são essenciais para a sobrevivência da bactéria em seu ambiente natural e na planta hospedeira (PUVANESARAJAH *et al.*, 1987; FRAYSSE *et al.*, 2003), e apresentam papel importante na formação das correntes de infecção pelas quais as bactérias invadem as plantas (VEDAM *et al.*, 2004).

Estudos têm mostrado que alterações na estrutura do LPS resultam em defeito na interação simbiótica entre a planta e o rizóbio. CARRION *et al.* (1990), estudaram os mutantes de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*, *trifolii* e *viciae* e o mutante de *B. japonicum*, defeituosos no antígeno-O no LPS, obtendo resultados que evidenciaram que todos eram ineficientes na nodulação. Então, um LPS intacto parece ser necessário para a formação de nódulos efetivos

(CARRION *et al.*, 1990). Isso demonstra, provavelmente, que o antígeno-O deve impedir o mecanismo de defesa da planta contra a invasão bacteriana, permitindo a infecção da planta. Isso também sugere que o antígeno-O é um determinante na especificidade do hospedeiro. Em outro trabalho, PUVANESARAJAH *et al.* (1987) analisando os polissacarídeos de membrana externa de *B. japonicum* selvagem (USDA110), que nodula soja, e de um mutante (HS123), que não nodula, observaram diferenças significativas na composição química do LPS das duas estirpes. Por outro lado, as composições químicas dos EPSs e CPSs das duas estirpes não apresentaram diferenças.

Para tanto, baseada nestas informações, este trabalho teve por objetivos: (a) cultivo das bactérias e estabelecimento de curvas de crescimento em meio líquido definido RDM (*Rhizobium Definied Medium*) e em meio líquido RDM modificado, com alteração de fontes de carbono no cultivo; (b) avaliar diferenças significativas na produção de EPS nas diferentes fases de desenvolvimento da cultura; (c) observar a influência da utilização de diferentes fontes de carbono na produção e composição química de EPS, e no perfil eletroforético do LPS das estirpes de *Rhizobium tropici* SEMIA 4077 e SEMIA 4080, que nodulam o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), em função das variações de cultivo em meio líquido RDM; (d) verificar a influência na nodulação do feijoeiro.

Contudo, a descoberta dos mecanismos associados com a comunicação molecular, como também a identificação e caracterização de polissacarídeos de origem bacteriana, pode conduzir, num futuro próximo, não só a processos de seleção e melhoramento que levam tanto o incremento da nodulação como à capacidade de extensão da habilidade de nodulação a outros hospedeiros. Enfim, todas essas descobertas recentes, que estabeleceram que ocorre uma troca de sinais entre plantas e bactérias, abre um novo campo para o conhecimento das interações planta-solo-microrganismos.

II. REVISÃO DE LITERATURA.

1. A importância da fixação biológica do nitrogênio.

O processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) na natureza somente pode ser efetuado por um grupo de microrganismos que possuem uma enzima, a nitrogenase, capaz de quebrar a ligação entre os átomos de nitrogênio, transformando desta maneira a forma molecular N_2 em NH_3 , a qual é facilmente absorvida pelas plantas (ZAHRAN, 2001). Em termos agrícolas, a relação simbiótica mais importante é com bactérias pertencentes à família *Rhizobiaceae*, compreendida pelos gêneros *Alorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium*, coletivamente denominadas de rizóbio (ZAHRAN, 2001; ZAKHIA & LAJUDIE, 2001). Por outro lado pesquisas recentes mostram as bactérias *Methylobacterium nodulans* (SY *et al.*, 2001), *Burkholderia tuberum* (STM678) (VANDAMME *et al.* 2002), *Burkholderia phymatum* (STM815) (VANDAMME *et al.*, 2002), *Ralstonia taiwanensis* (CHEN *et al.*, 2003), *Devosia neptuniae* (RIVAS *et al.*, 2003), *Blastobacter denitrificans* (VAN BERKUM & EARDLY, 2002) como simbioses fixadoras de nitrogênio que não estão classificadas dentro de nenhum dos 7 gêneros da família *Rhizobiaceae*.

Durante a simbiose com leguminosas, o rizóbio deve entrar nas células das raízes da planta hospedeira e se diferenciar para a forma fixadora de nitrogênio, denominada bacterióide, encontrada nos nódulos radiculares. Nesta simbiose, as formações de nódulos radiculares, diferenciação em bacterióide e fixação do nitrogênio abrangem diversas etapas de comunicação para coordenar a expressão do gene e o desenvolvimento entre macro e micro simbiote (STRALIOTTO *et al.*, 2002).

Graças ao processo de FBN, a recomendação atual para o cultivo de diversas espécies de leguminosa, é a da utilização de inoculante sem a suplementação com fertilizante nitrogenado. Em relação às duas leguminosas de

grãos de maior importância para o Brasil, a soja e o feijoeiro, as situações são contrastantes (MENDES & HUNGRIA, 2001).

Quando a soja foi introduzida no Brasil, os solos brasileiros não possuíam as bactérias pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*, capazes de realizar a simbiose com a cultura. Assim, inicialmente foram importados, sobretudo dos EUA, inoculantes contendo estirpes eficientes, e logo depois se iniciou, no Brasil, um processo de seleção das estirpes mais adaptadas às condições ambientais e às cultivares brasileira. Nessas condições de ausência de rizóbio da soja no solo, a resposta à inoculação é muito expressiva. Em áreas sob cultivo e já inoculadas anteriormente, a resposta à inoculação é 5% menor, em média, mas ainda assim muito importante para o produtor rural (HUNGRIA *et al.*, 1994). Estimativas de alguns experimentos indicam que a FBN contribui com cerca de 85% do N total acumulado nos tecidos, pois sempre há N no solo, que é absorvido pela planta. Portanto, fica claro que caso não houvesse essa tecnologia, o cultivo da soja no país seria inviabilizado pelo alto custo da adubação com nitrogênio (MENDES & HUNGRIA, 2001).

Ao contrário, a cultura do feijoeiro vem passando por sucessivas crises. Segundo informações da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), na safra 1995/1996, a área plantada de feijão somava 5,272 milhões de hectares. Essas áreas diminuíram para 4,223 milhões de hectares na safra 2005/2006, representando quedas de 19,89% para o feijão. Para a safra 2006/2007, também são esperadas quedas nas áreas plantadas de 18,89%, em relação à safra de 1995/1996 (CONAB, 2007).

A produtividade, porém, aumentou. A produção total da primeira, segunda e terceira safras do feijão atingiu 3,471 milhões de toneladas nos resultados de safra 2005/2006 e deve atingir 3,587 milhões de toneladas na safra 2006/2007. Isso representará aumentos respectivos de 14,25% e de 18%, na comparação com a produção do produto na safra 1995/1996 (3,038 milhões de toneladas), mesmo com a redução na área plantada. A estimativa de produtividade para a safra 2006/2007 será de 839 kg/ha (CONAB, 2007). Mesmo assim a produtividade

nacional média é uma das mais baixas do mundo, uma vez que os inoculantes para a cultura são pouco utilizados pelos agricultores brasileiros, pouco valorados pelos pesquisadores e pela extensão agropecuária, e representam menos de 1% do mercado nacional (MENDES & HUNGRIA, 2001).

Existem diferenças básicas entre a FBN com as duas culturas, que devem ser mencionadas. Os solos brasileiros possuem uma população de bactérias nativas capazes de nodular o feijoeiro, mas que não passaram por um processo de seleção e não são, de modo geral, eficientes (STRALIOTTO *et al.*, 2002). O problema é agravado porque, no Brasil, não foi conduzido, para o feijoeiro, um forte e persistente programa de pesquisa em FBN. Finalmente, deve ser somada a esses fatores desfavoráveis a maior suscetibilidade do feijoeiro a estresses ambientais, como temperaturas elevadas (SÁ *et al.*, 1993), condições de acidez do solo (COLETTA FILHO, 1993), teores de nutrientes (TSAI *et al.*, 1993), deficiências hídricas, e também às diversas doenças (MENDES & HUNGRIA, 2001; STRALIOTTO *et al.*, 2002).

Todavia, os dados de pesquisa obtidos em diversos ensaios conduzidos nas regiões produtoras, indicam que as bactérias melhoradas e que estão disponíveis para a cultura do feijoeiro podem, de imediato, no mínimo dobrar a produtividade nacional a um custo baixíssimo para o agricultor. Desse modo, o investimento na difusão dessa tecnologia pode trazer um grande benefício para o Brasil, aumentando a produção de grãos dessa leguminosa tão importante na alimentação dos brasileiros. Além dos benefícios econômicos, a redução nas aplicações dos fertilizantes nitrogenados diminui o risco de contaminação de rios e águas subterrâneas por nitratos, uma vez que cerca de 50% de adubos nitrogenados aplicados ao solo são perdidos por desnitrificação e lixiviação, podendo acarretar problemas relacionados à redução na camada de ozônio e eutrofização de rios e lagos (MENDES & HUNGRIA, 2001).

O feijoeiro é considerado um hospedeiro promíscuo, ou seja, uma grande diversidade de espécies é capaz de formar associações de eficiência variável com esta espécie (HUNGRIA *et al.*, 2000). A taxonômica do rizóbio de feijoeiro

apresentou uma grande evolução nos últimos anos, sendo que atualmente pelo menos cinco espécies distintas são reconhecidas como simbiontes desta planta, *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* (JORDAN, 1984); *R. tropici* (MARTÍNEZ-ROMERO *et al.*, 1991), *R. etli* (SEGOVIA *et al.*, 1993), *R. gallicum* e *R. giardinii* (AMARGER *et al.*, 1997). Além destas, um grande número de isolados classificados como *Sinorhizobium* sp foi recuperado de nódulos de feijoeiro em solos tropicais brasileiros (STRALIOTTO *et al.*, 2002).

A partir de 1985, um grupo formado por pesquisadores do Rio Grande do Sul fundou uma congregação que agrega também produtores de inoculantes e representantes do Ministério da Agricultura. Esta congregação tem se expandido e reúne-se, então, a cada dois anos, para analisar os resultados das pesquisas em seleção, recomendação de estirpes, controle de qualidade e outros temas de interesse da rizobiologia. Em 1992, este grupo foi reconhecido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e definido como RELARE (Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola). Desde então, a FEPAGRO (Fundação de Pesquisa Agropecuária/RS) é a instituição responsável pela manutenção e distribuição das estirpes recomendadas, enquanto o MAPA legaliza e rege a legislação para a produção de inoculantes comerciais, em âmbito federal.

Atualmente, o inoculante comercial produzido para o feijoeiro no Brasil contém duas estirpes de *Rhizobium tropici*, espécie considerada adaptada aos solos tropicais, pelas características de tolerância a altas temperaturas, acidez do solo e competitividade. As estirpes presentes no inoculante comercial são a SEMIA 4077 e a SEMIA 4080, sendo esta última isolada de um solo do Paraná e recomendada desde 1998, tendo comprovado alta capacidade de fixação de N₂ e competitividade contra rizóbio nativo em diversos ensaios realizados no Brasil (HUNGRIA *et al.*, 2000).

2. Polissacarídeos bacterianos necessários para uma simbiose efetiva.

O rizóbio, como bactéria Gram-negativa, produz grandes quantidades de polissacarídeos extracelulares e de superfície. Muitos estudos evidenciaram que esses polissacarídeos bacterianos parecem ter papel determinante no reconhecimento da planta (SPAINK, 2000), e essencial para uma interação simbiótica efetiva (BECKER & PÜHLER, 1998; KIRICHENKO *et al.*, 2004; KOSENKO *et al.*, 2001; LONG, 2001; PUVANESARAJAH *et al.*, 1987; SCHULTZE & KONDOROSI, 1998).

Os genes envolvidos na formação da superfície celular da bactéria são os genes determinantes da síntese de exopolissacarídeos (genes “exo”), lipopolissacarídeos (genes “lps”) e 1,2-b-glucanos (genes “ndv”), ligados ao desenvolvimento nodular. Mutações nestes genes podem afetar o processo de infecção de várias maneiras, como, por exemplo, incapacitando a formação dos cordões de infecção, que resultaria na formação de nódulos vazios, não fixadores de N₂ (ARNOLD *et al.*, 1994). Tem sido sugerido um possível envolvimento dos genes *exo* e *lps* na determinação da especificidade hospedeira, mas nenhuma evidência mais clara mostrou que os componentes da superfície celular do rizóbio são os determinantes principais da especificidade hospedeira (GRAY & ROLFE, 1990) e, por isso, o papel desses polissacarídeos rizobianos e dos componentes da superfície da raiz da leguminosa envolvidos no processo de nodulação são consenso na literatura pertinente.

2.1. Relevância do exopolissacarídeo.

Entre os polissacarídeos bacterianos, dois são os principais tipos encontrados para unir à superfície exterior da membrana bacteriana: os exopolissacarídeos (EPSs) liberados no meio e as β-glucanas cíclicas. As β-glucanas cíclicas geralmente são referidas como uma categoria separada.

Enquanto que, os extracelulares livres são os de maior interesse, devido sua facilidade de obtenção (FRAYSSE *et al.*, 2003).

Os EPSs são macromoléculas polissacarídeos, sendo constituintes normais de todas as células microbianas, incluindo as bactérias, leveduras e fungos. Este biopolímero é uma goma hidrossolúvel que possuem propriedades físicas, estruturais e químicas diferentes (SUTHERLAND, 2001). De maneira geral, os termos gomas hidrossolúveis, hidrocolóide ou colóide hidrofílico têm sido usados como sinônimos. Também é observado o termo muco, embora este seja mais empregado para materiais que formam com a água massas viscosas, como é o caso das pectinas (CUNHA, 2003). Segundo ZOHURIAAM & SHOKROLAHI (2004), o termo goma mais especificamente denota um grupo de polissacarídeos de uso industrial ou seus derivados que hidratados em água quente ou fria, em baixas concentrações, formam dispersões ou soluções viscosas.

Os polissacarídeos extracelulares são metabólitos produzidos quando uma fonte de carboidratos está presente em excesso (PACE & RIGHELATO, 1980). Um grande número de bactérias conhecidas produz quantidades abundantes de EPSs, particularmente às patogênicas de plantas como *Xanthomonas*, *Erwinia* e bactérias fixadoras de nitrogênio *Rhizobium*, *Beijerinckia* e *Azotobacter*. (VERMANI *et al.*, 1995). Destas, os exopolissacarídeos de *Xanthomonas campestris* (xantana), *Sphingomonas paucimobilis* e *Pseudomonas elodea* (gelana) e *Acetobacter xylinum* (celulose) estão sendo comercializados (SUTHERLAND, 2001). Dos polímeros de origem bacteriana, a goma xantana tem sido a mais estudada, uma vez que seu uso em alimentos foi permitido pela FDA ("Food and Drug Administration"), desde julho de 1969 (FDA, 1969).

Dentre a família Rhizobiaceae, o gênero *Rhizobium* sintetiza grandes quantidades de polissacarídeos extracelulares. Gastam mais de 70% de sua energia nesta produção. Mesmo tendo alto gasto energético nesta produção é muito raro uma espécie de bactéria utilizar seu EPS como uma fonte de carbono ou de energia (GONZÁLEZ *et al.*, 1996). A maioria das pesquisas com esses microrganismos restringe-se a estudos de genética e a interação simbiótica entre

bactéria e planta hospedeira (SCHULTZE & KONDOROSI, 1998, MITHÖFER, 2002; LOH & STACEY, 2003). Entretanto, não há um produto comercial desses polissacarídeos, apenas há relatos de produção dos EPSs com o nome de succinoglicanas e galactoglicanas (ZEVEHUINZE, 1997; YONES *et al.*, 2000).

A estrutura de muitos polissacarídeos de bactérias Gram-negativas, como o rizóbio, é relativamente simples. Podem ser homopolímeros ou heteropolímeros e possuir uma variedade de substituintes não carboidratados. Entre os homopolímeros, encontrados em bactérias que interagem com plantas, o principal é formado exclusivamente por unidades de β -D-glicose, com ligações glicosídicas $\beta(1-3)$ presentes em *Agrobacterium radiobacter*. Sendo os mais comuns as glucanas periplasmáticas $\beta(1-2)$ presentes em Rhizobiaceae; dextranas *Leuconostoc mesenteroides*, levanas nas espécies de *Erwinia* e *Pseudomonas*, e alguns alginatos em *Pseudomonas* sp fluorescentes. Os heteropolissacarídeos são polímeros ácidos, normalmente compostos de unidades repetidas e alinhadas desde dissacarídeos até octassacarídeos, compostos de dois a quatro tipos de monossacarídeos diferentes e muitos contêm grupos acetila e piruvato (SUTHERLAND, 2001).

No exterior da célula microbiana os exopolissacarídeos podem permanecer soltos (como muco viscoso) ou podem estar ligados covalentemente (a um fosfodiéster ou a um lipídio) na superfície da célula. Neste último caso, o material pode formar uma cápsula, que pode ser reconhecida microscopicamente e que pode estar aderida firmemente à superfície (SILVA *et al.*, 2001; WHITFIELD & ROBERTS, 1999). Cada etapa requer uma série de enzimas e substratos específicos. A ausência de uma enzima ou substrato, em particular, inibe a síntese do exopolissacarídeo.

Na literatura há poucas informações sobre o processo de biossíntese dos diferentes tipos de EPSs. Porém, a biossíntese do EPS de rizóbio foi extensivamente estudada com o EPS I de *Sinorhizobium meliloti* (BECKER *et al.*, 1997). Segundo MOREIRA (2002), este processo está diretamente relacionada à capacidade de sobrevivência do microrganismo em condições adversas de meio

ambiente, sendo que esses EPS desempenham diferentes papéis durante os eventos de pré-infecção na rizosfera, podendo: (a) funcionar como molécula receptora do micro simbiote, fazendo uma interação célula/célula e desencadeando o processo de nodulação (KIRICHENKO *et al.*, 2004); (b) induzir a formação de nódulos e micro colônias (BECKER & PÜHLER, 1998; BREWIN, 1991; NICOLÁS, 1996); (c) aumentar a adesão da bactéria, promovendo seu crescimento nos espaços intercelulares necessários tanto para a nodulação bem como organogénia da raiz (KOSENKO *et al.*, 2001; SCHULTZE & KONDOROSI 1998); (d) agir como sinais moleculares durante o desenvolvimento do nódulo (KOSENKO *et al.*, 2001; LONG, 2001).

Os EPSs ácidos produzidos pela maioria dos rizóbios são altamente aniônicos e assim, podem atuar como resinas de troca iônica, ajudando na fixação de minerais e nutrientes próximos à célula da bactéria (WHITFIELD, 1988). Em adição, outra função importante do polissacarídeo extracelular, no solo ou em ambientes aquáticos, é auxiliar na agregação e estabilidade do solo (ZEVENHUIZEN, 1997), na aderência em superfícies sólidas; e formação de biofilme (LOOIJESTEIJN *et al.*, 2001).

Estudos prévios têm sugerido que a síntese de EPS parece ser essencial para o estabelecimento do processo de fixação biológica de nitrogênio em leguminosas que desenvolvem nódulos do tipo indeterminado (nódulos cilíndricos e com meristema apical persistente), como *Sinorhizobium meliloti*/alfafa e *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*/*Vicia sativa*. Em *S. meliloti*, foram encontrados dois tipos de heteropolissacarídeos. Onde se verificou que o EPS I é um dos exopolissacarídeos necessários para a invasão de raízes da alfafa por *S. meliloti*; uma vez que mutantes deficientes em sintetizar EPS I não foram capazes de infectar as raízes, e formar nódulos. Reinhold *et al.* (1994) relataram que o EPS I consiste de subunidades repetitivas de D-glicose, D-galactose, piruvato, succinato e acetil na proporção de 7:1:1:1:1. Entretanto, verificaram que o EPS II tem uma estrutura diferente, apresentando D-glicose, D-galactose e pirutavo em sua composição, na proporção 1:1:1. Mutantes deficientes em sintetizar EPS II

são capazes de nodular a alfafa. O EPS II é produzido em ambientes com baixa concentração de fosfato e esta pode ser uma adaptação ao ambiente do solo qual é relativamente pobre em fosfato comparado com os nódulos (MENDRYGAL & GONZALEZ, 2000).

Por outro lado, o papel do EPS ainda é discutido nas associações com nódulos do tipo determinado (nódulos esféricos e com a atividade meristemática central das células do nódulo da planta sendo interrompida em um estágio de desenvolvimento pré-determinado), como *Sinorhizobium fredii*/*Glycine max*, *Bradyrhizobium japonicum*/*Glycine max*, *Rhizobium tropici*/*Phaseolus vulgaris* L. (FRAYSSE *et al.*, 2003). Para confirmar o envolvimento do EPS somente para o tipo de simbiose indeterminada, HOTTER & SCOTT (1991) estudaram um sistema isogênico, o *R. loti* PN184 que é capaz de nodular *Lotus pedunculatus* (tipo determinado) e o *Leucaena leucocephala* (legume de nodulação indeterminado). Os mutantes com defeito na síntese de EPS, porém com LPS conservado, foram completamente efetivos em hospedeiro de nódulo do tipo determinado, mas ineficientes em um indeterminado. Uma explicação para tais diferenças pode ser que os LPSs não identificados podem complementar a deficiência do EPS na formação de nódulos determinados (FRAYSSE *et al.*, 2003).

Diversos estudos (KARR *et al.*, 2000; PARNISKE *et al.*, 1993; PARNISKE *et al.*, 1994) têm mostrado que as estruturas específicas de EPS rizobiano são pré-requisitos essenciais para uma infecção com sucesso de leguminosas com nódulos tipo determinado. PARNISKE *et al.* (1993) mostraram que o EPS não somente tem um papel importante na infecção de nódulos tipo indeterminado, mas também na simbiose entre o *B. japonicum* e a *Glycine max* (tipo determinado). Os mutantes de *B. japonicum*, defeituosos no gene *exoB* e que produz um EPS alterado, mostraram uma diminuição na indução da nodulação em soja e uma perda drástica de competitividade. Ressalta-se que, nestes mutantes, o LPS permaneceu intacto. Estudos morfológicos detalhados em nódulos induzidos pelo mutante revelaram sintomas de reações de defesa da planta (PARNISKE *et al.*, 1994).

KARR *et al.* (2000) estudaram o processo de simbiose entre a *Glycine max* e dois tipos de *Bradyrhizobium japonicum*, o tipo selvagem da estirpe de *B. japonicum* 2143 e mutantes defeituosos em ligar a lectina de soja (soybean lectin – SBL). O papel da lectina na planta é o de reconhecer os componentes da superfície de carboidrato bacteriano. Neste trabalho, verificou a dependência da composição do EPS em monossacarídeo em relação às fontes de carbono utilizada para o seu crescimento. Por exemplo, quando crescidos em arabinose, gluconato ou manitol, a estirpe parental selvagem, produziu o EPS chamado EPS I, com composição de Man/Glu/Gal/GalA na proporção 1:2:1:1. Quando cultivada em malato, a estirpe selvagem produziu um EPS diferente, extremamente rico em galactose, designado de EPS II. O mutante 1252 produziu EPS II quando cultivado em arabinose ou malato, mas quando cultivado em gluconato ou manitol produziu um EPS diferente, compreendido de glicose, galactose, xilose e ácido glicurônico (1:5:1:1) e designado EPS III. Outro mutante 1251, cultivado em qualquer destas fontes de carbono, produziu EPS III. A variação na composição do EPS não afetou a nodulação ou fixação de nitrogênio no fenotipo 2143. Em contraste, o mutante 1252 na nodulação, independe da composição do EPS.

As áreas de interesse para os EPSs microbianos são bastante variadas. A importância desses polissacarídeos extracelulares no processo da FBN para a agricultura, bem como os mecanismos de desenvolvimento simbiótico e de infecção ainda não estão claros, por isso, há um contínuo interesse em elucidar a genética, a biologia molecular e a bioquímica de polissacarídeos extracelulares e os de superfície de origem bacteriana.

2.2. Lipopolissacarídeo.

As bactérias Gram-negativas apresentam a parede celular mais fina, conseqüência da menor quantidade de peptidoglicano, em comparação às Gram-positivas, e têm como maior componente um macropolímero, denominado lipopolissacarídeo (LPS). Os LPSs são polissacarídeos ligados à membrana

externa por uma parte lipídica inserida dentro da monocamada de fosfolipídio bacteriano (RAETZ & WHITFIELD, 2002). A presença do LPS fornece uma barreira hidrofílica à superfície celular (PORTILHO, 2002).

A estrutura química do LPS nas bactérias Gram-negativas possui: a) Oligossacarídeo-O, um tetrassacarídeo (Antígeno-O) que pode se repetir por até quarenta vezes por molécula, embora algumas delas, dentro de uma mesma preparação, possam não o apresentar; b) a região do lipídeo A, a qual é inserida dentro da bicamada da membrana externa normalmente contém di-glucosamina fosfato substituído por ácidos graxos e c) o núcleo de oligossacarídeos, consistindo de resíduos de carboidratos específicos onde se inclui o ácido 3-desoxi-D-mano-octalossônico (2-keto-3-deoxyoctonic acid, KDO) em ligações específicas (HANCOCK, 1991).

Até recentemente o lipídeo A de *Rhizobium* foi considerado muito semelhante ao das enterobactérias *Escherichia coli* e *Salmonella* (RUSSA *et al.*, 1985). Entretanto, CARRION *et al.* (1990) concluíram que as estruturas do lipídeo A e do núcleo de oligossacarídeos de *Rhizobium* são diferentes, principalmente em relação às moléculas encontradas nas enterobactérias.

De modo geral, a estrutura do LPS rizobiano é conhecida apenas parcialmente, sendo a porção antígeno-O mais estudada, por apresentar aparentemente um papel mais importante entre as três partes do LPS (FRAYSSE *et al.*, 2003), mas, a exata função e importância deste resíduo ainda são desconhecidas (VEDAM *et al.*, 2004). Como tem sido observado, o LPS rizobiano possui uma grande variação na composição química e estrutural entre as diferentes espécies e inclusive entre as estirpes de uma mesma espécie (RAETZ & WHITFIELD, 2002).

Estudos têm mostrado que alterações na estrutura do LPS resultam em defeito na interação simbiótica. CARRION *et al.* (1990), estudaram os mutantes de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*, *trifolii* e *viciae* e o mutante de *B. japonicum*, defeituosos no antígeno-O no LPS, obtendo resultados que evidenciaram que todos eram ineficientes na nodulação. Então, um LPS intacto

parece ser necessário para a formação de nódulos efetivos (CARRION *et al.*, 1990). Isso demonstra, provavelmente, que o antígeno-O deve impedir o mecanismo de defesa da planta contra a invasão bacteriana, permitindo a infecção da planta. Isso também sugere que o antígeno-O é um determinante na especificidade do hospedeiro.

Em relação aos aspectos analíticos, deve-se ressaltar que através do procedimento tradicional de extração com fenol desenvolvido por WESTPHAL & JANN (1965), os lipopolissacarídeos de rizóbios são isolados e parcialmente caracterizados após hidrólise ácida branda. Através dessa metodologia os lipopolissacarídeos podem ser separados por cromatografia em duas frações: LPSI e LPSII. A fração LPSII, de baixo peso molecular (600 dalton), é constituída essencialmente por oligossacarídeos, cujo principal açúcar é o ácido urônico. Enquanto que a fração LPSI, de maior peso molecular, costuma apresentar as maiores diferenças na composição de açúcares, confirmando variabilidade na estrutura dos LPSs intactos como descrito em CARLSON *et al.* (1978); ZEVENHUIZEN *et al.* (1980) e CARLSON & LEE (1983), dentre outros.

Utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), dos LPSs de quatro estirpes de *B. japonicum*, pertencentes a diferentes sorogrupos, e de outras duas estirpes sorologicamente semelhantes, CARRION *et al.* (1990) mostraram que a presença dos LPSs presentes na fase fenólica (extração com fenol-água) foi uma característica comum às linhagens de *B. japonicum* utilizadas. Entretanto, para as linhagens USDA 110 e seu mutante, nod HS123, o LPS pode ser encontrado em ambas as fases, fenólica e aquosa.

Devem ainda ser considerados os resultados obtidos por CARARETO-ALVES & LEMOS (1996) mostrando que os LPSs podem ser extraídos por simples fervura em salina. Trabalhando com diferentes estirpes de rizóbio, isolaram o LPS, modificaram a metodologia de ROBERTS (1966) e compararam os resultados com os obtidos pela extração com fenol-água (WESTPHAL & JANN, 1965). Observaram que as moléculas de LPSs, de diferentes estirpes de rizóbios, durante a extração com fenol-água, apresentavam um comportamento muito

variado. Assim, o LPS da estirpe de *B. japonicum* USDA 110 foi encontrado em ambas as fases, como também ocorreu com os da *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* SEMIA 4076 e 4047. Já o LPS de *B. elkani* SEMIA 5019 foi encontrado somente na fase aquosa, e o de *Bradyrhizobium* sp SEMIA 6158, na fase fenólica. Entretanto, para as estirpes estudadas os lipopolissacarídeos puderam ser extraídos por simples fervura em salina.

A heterogeneidade do perfil de lipopolissacarídeos da célula, determinada por eletroforese em SDS-PAGE, permite a discriminação entre estirpes, detectando possíveis diferenças entre as pertencentes à mesma espécie ou sorogrupo, pois o método tradicional de coloração com nitrato de prata é muito sensível, corando quantidades em nanogramas (TSAI & FRASH, 1982).

III. MATERIAL E MÉTODOS.

1. Estirpes bacterianas utilizadas: Cultivo e manutenção.

As duas estirpes de *Rhizobium tropici* SEMIA 4077 e SEMIA 4080 foram utilizadas como objetos de estudo. As bactérias foram recebidas do banco de estirpes de rizóbio da FEPAGRO, e colocadas em placas contendo YMA (Tabela 1) com o objetivo de obter colônias puras (VINCENT, 1970). O corante utilizado permitiu monitorar eventuais contaminações, baseado na coloração das colônias crescidas no meio. O rizóbio praticamente não absorve o corante e colônia apresenta-se incolor, enquanto contaminantes apresentam coloração vermelha intensa decorrente da absorção do corante pelos microrganismos.

As colônias puras obtidas foram repicadas em placas de Petri contendo meio sólido definido RDM e modificado com alterações na fonte de carbono (Tabela 1) e colocadas em estufa tipo B.O.D. a 28 °C. A manutenção foi semanal, através de passagens para placas contendo meio fresco.

Para preservar as culturas foram preparados tubos de Agar inclinado em meios que apresentaram a mesma constituição dos meios de cultura a serem testados, devidamente identificados e armazenados em refrigerador -20 °C. Todos os procedimentos foram realizados de forma asséptica.

2. Meios de cultura utilizados.

Para o cultivo do rizóbio foram obedecidos os requisitos básicos obrigatórios, a saber, o emprego de meios de cultura adequados e condições de cultivo apropriadas e convenientes com as finalidades experimentais exigidas. Foram utilizados os meios de cultura descritos na Tabela 01: YM (*Yeast Mannitol Agar*) (VINCENT, 1970; SOMASEGARAN & HOBEN, 1984); RDM (*Rhizobium Defined Medium*) (BISHOP *et al.*, 1976), e RDM modificado, com alterações de fontes de carbono.

Tabela 1. Composição dos meios utilizados para cultivo das estirpes de *Rhizobium tropici*.

Meio de Cultura	Composição do Meio	Concentração
YMA (Yeast Mannitol agar) pH 6,8	K ₂ HPO ₄	500 mg/L
	MgSO ₄ x 7H ₂ O	200 mg/L
	NaCl	100 mg/L
	Manitol	10 g/L
	Extrato de Levedura	500 mg/mL
	Ágar	9 g/L
YMA-Vermelho Congo / pH 6,9	Adicionam-se 0,025 mg/mL do corante vermelho congo ao meio YMA	
RDM (Rhizobium Definied Medium) = RDM 1 pH 6,8	K ₂ HPO ₄	230 mg/mL
	MgSO ₄ x 7H ₂ O	100 mg/mL
	Glutamato Na ⁺² x 1H ₂ O	1100 mg/mL
	Glicerol	400 µl/mL
RDM 2 pH 6,8	K ₂ HPO ₄	230 mg/mL
	MgSO ₄ x 7H ₂ O	100 mg/mL
	Glutamato Na ⁺² x 1H ₂ O	1100 mg/mL
	Galactose	10 mg/mL
RDM 3 pH 6,8	K ₂ HPO ₄	230 mg/mL
	MgSO ₄ x 7H ₂ O	100 mg/mL
	Glutamato Na ⁺² x 1H ₂ O	1100 mg/mL
	Glicose	10 mg/mL
RDM 4 pH 6,8	K ₂ HPO ₄	230 mg/mL
	MgSO ₄ x 7H ₂ O	100 mg/mL
	Glutamato Na ⁺² x 1H ₂ O	1100 mg/mL
	Sacarose	10 mg/mL
Preparar na forma de estoque [1000x]. Utilizar 1 mL/L.	Elementos Traços	
	CaCl ₂	5 mg/mL
	H ₃ BO ₃	145 µg/mL
	FeSO ₄ x 7H ₂ O	125 µg/mL
	CoSO ₄ x 7H ₂ O	70 µg/mL
	CuSO ₄ x 7H ₂ O	5 µg/mL
	MnCl ₂ x 4H ₂ O	4,3 µg/mL
	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	108 µg/mL
	NaMoO ₄	125 µg/mL
Preparar na forma de estoque [1000x] em 0,05M Na ₂ HPO ₄ , pH 7,0. Utilizar 1 mL/L.	Vitaminas	
	Riboflavina	0,02 µg/mL
	Ácido P-Aminobenzóico	0,02 µg/mL
	Ácido Nicotínico	0,02 µg/mL
	Biotina	0,02 µg/mL
	Tiamina-HCl	0,02 µg/mL
	Pantotenato de Ca ⁺²	0,02 µg/mL

Os meios de cultivo foram esterilizados por meio de vapor úmido (em autoclave) a temperatura de 121°C por um período de 20 minutos.

3. Curvas de crescimento da SEMIA 4077 e SEMIA 4080 em meio definido RDM e modificado, com alteração de fontes de carbono no cultivo.

A curva foi realizada em triplicata, a partir do preparo de um pré-inóculo inicial de cada estirpe de rizóbio. Para a diminuição dos efeitos de possíveis células mortas, as bactérias cultivadas em meio sólido, com a respectiva fonte de carbono, foram recuperadas durante a fase exponencial de crescimento, 03 dias após plaqueamento inicial, através da raspagem da massa bacteriana com o auxílio de alça de Drigalsky. A massa bacteriana de 03 placas foi recuperada e diluída em 50 mL de água milli-Ro estéril. A turbidez do pré-inóculo foi registrada através da leitura da absorbância, em um colorímetro fotoelétrico Klett-Summerson (KLETT MFG) com filtro vermelho correspondente a um comprimento de onda correspondente a faixa 640 - 700 nm. A água destilada foi utilizada como padrão "0".

Dez unidades Kletts do pré-inóculo, correspondentes a $1,5 \times 10^8$ células/mL, foram adicionados em cada frascos especiais *Side-arm* contendo 100 mL de meio de cultura. Após a inoculação, os frascos foram mantidos sob agitação constante, em um agitador orbital, a 140 rpm por 192 horas a 28°C. O crescimento celular foi avaliado através da leitura de absorbância do meio de cultura nos momentos logo após a inoculação e a cada 12 horas de cultivo da bactéria. A intensidade colorimétrica expressa o número de células mais os EPSs produzidos por essas células.

Para estudo do crescimento no tempo, foi utilizada equação de curva de crescimento descrita abaixo:

$$y = (a / (1 + e^{-k(x-x_c)})), \text{ onde:}$$

y: representa o crescimento dos isolados em unidades Kletts;

a, k, x_c : são os parâmetros utilizados em cada curva;

x: tempo em horas.

4. Método para Obtenção do Exopolissacarídeos Rizobiano.

4.1. Inóculo e Condições de Cultivo.

O inóculo foi preparado a partir de cultura crescida sobre Agar RDM (Tabela 1). Uma alça contendo cultura de 48 horas foi inoculada em “erlenmeyer”, com capacidade para 125mL, contendo 20mL de meio RDM, com as respectivas fontes de carbono, e incubado em agitador rotatório por 48 horas a 140rpm e 28°C. A cultura resultante foi transferida para “erlenmeyer” de 300mL contendo 100mL do respectivo meio RDM e incubada novamente à 140 rpm e 28°C.

4.2. Isolamento, Purificação e Produção de Exopolissacarídeo.

Amostras das culturas foram coletadas em intervalos de 48 horas de cultivo. Após o cultivo, as culturas foram submetidas à centrifugação (10000 x g, a 4°C, por 50 min), separando as células do sobrenadante. O sobrenadante coletado foi utilizado para a produção de EPS. As células bacterianas recuperadas, durante a fase exponencial de crescimento foram lavadas com solução salina NaCl a 0,85% (p.v.) para remoção de possíveis partes residuais do meio de cultura, e, então, estocadas a -20°C para utilizações posteriores nas análises do LPS (item 5).

Ao sobrenadante, resultante da centrifugação, foi adicionado álcool etílico 96° gelado (1:2; v/v) para a recuperação do EPS por precipitação, sendo

observada a formação do precipitado de imediato. Foi armazenado sob refrigeração ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) durante 24 horas. Transcorrido o tempo de refrigeração as amostras foram novamente centrifugadas ($10000 \times g$, a 4°C , por 30 min), para separação precipitado/solvente, sendo o precipitado lavado várias vezes com álcool etílico que é evaporado posteriormente. A precipitação com solventes resulta também em purificação parcial do polímero por eliminação dos componentes solúveis no solvente (PACE, 1991). A purificação total dos EPS foi feita por reprecipitação fracionada com solvente (CHI & ZHAO, 2003).

Posteriormente, o produto obtido foi seco em um liofilizador Hetovac vr-1 até peso constante, pesado em balança de precisão para a verificação da quantidade obtida de EPS (grama de EPS por litro de meio de cultura) e então, preparados para as análises subseqüentes de CLAE e FTIR.

5. Análise do Exopolissacarídeo.

A partir dos resultados das avaliações descritas no item 3.2., foi selecionado o tempo mais favorável para a produção de EPS pelas estirpes para a análise dos EPSs por CLAE e FTIR.

Para a composição em monossacarídeo do EPS das estirpes, o EPS bruto foi analisado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando a química de marcação dos monômeros com 1-fenil-3-metil-5-pirazolone (PMP), segundo a metodologia descrita por FU & O'NEILL (1995). Para isto, amostra de 1,0 mg de EPS foi hidrolisada com 200 μl de ácido trifluoracético 4 mol/L em tubos de hidrólise de 13 x 100 mm e selados com uma chama de maçarico sob vácuo. Os tubos então foram incubados a 120°C , durante 2 horas. Após resfriamento a temperatura ambiente, os tubos foram abertos e a solução foi evaporada em um liofilizador Hetovac vr-1. O resíduo foi dissolvido em 0,5 mL de isopropanol, novamente evaporado.

Após isso, o EPS hidrolisado e os monossacarídeos padrões foram pré-derivatizados (marcação química) com PMP. As reações foram conduzidas em

“ependorfs”, acrescentando-se em cada tubo 40µL de solução de PMP (0,5 mol/L em metanol) e 40 µL de solução de hidróxido de sódio (0,3 mol/L), os tubos foram agitados e incubados a 70°C por 2 h. Após o resfriamento a temperatura ambiente, a mistura foi neutralizada pela adição de 40 µL de solução de ácido hidrocloreídrico (0,3 mol/L). Para a extração dos derivados de monossacarídeos, foram adicionados 0,5 mL de éter butílico, sendo os tubos agitados por 5 segundos. As fases foram separadas por centrifugação a 5000 x g por 5 minutos e a fase superior (orgânica) foi removida e descartada. Este procedimento de extração foi repetido por 3 vezes e a fase aquosa resultante foi misturada com 400 µL de água milli-Q.

As análises dos monossacarídeos marcados com PMP foram desenvolvidas num sistema para CLAE equipado com um detector UV/VIS (Shimadzu, modelo SPD-M10A). O comprimento de onda para a detecção foi de 245 nm. A separação dos monossacarídeos derivados com PMP foi realizada através de uma coluna GHRC ODS-C-18 (4,6 mm i.d. x 15 cm) com velocidade de fluxo constante de 0,5 mL/min e usando os tampões A e B, constituídos por 100 mmol/L de acetato de amônio e pH 5,5 25% de acetonitrila com 10% e 25% de acetonitrila, respectivamente. O gradiente para a separação foi: 0% de B, 30 minutos e 0-100% de B, até 100 minutos.

Como monossacarídeos padrões foram utilizados glicose, manose, ramnose, galactose, ácido glucurônico e ácido galacturônico, e as seguintes concentrações dos mesmos: 0,0125, 0,0250, 0,0500, 0,1000 mg/ml para a construção da curva de calibração. A quantidade de amostra injetada no cromatógrafo foi de 20µl. As análises foram feitas em duplicatas. Os dados obtidos da quantificação da composição em monossacarídeos do EPS foram submetidos à análise de variância, e as médias, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para análise dos constituintes não carboidratados na composição do EPS bruto aplicou-se o método espectroscópico no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). As amostras foram preparadas como pastilha, usando 2,0 mg

dos EPSs liofilizados e 100 mg de brometo de potássio. O espectro FTIR foi obtido com um espectrômetro (Paragon 1000, Perkin–Elmer), resolução espectral de 4000–400 cm^{-1} , 2 cm^{-1} , e 32 transientes. O espectro foi normalizado, a linha de base e o deslocamento corrigidos de 3900 até 900 cm^{-1} (NAUMANN, 2000; OSIRO *et al.*, 2004).

6. Análises de Lipopolissacarídeos.

Foram utilizadas as células bacterianas recuperadas, durante a fase exponencial de crescimento (item 3.2.). O LPS das células bacterianas foi extraído segundo o método de fervura salina, desenvolvida por CARARETO-ALVES & LEMOS (1996). Posteriormente, 400 μL do sobrenadante do LPS extraído foram diluídos em um tubo de ensaio contendo 100 μL de Tampão da Amostra (20% glicerol, 4% SDS, 5% Mercaptoetanol, 0,02% azul de bromofenol, tampão tris HCl 62 m mol/L, pH 6,8). Após fervura por 5 minutos, 50 μL de cada preparação, foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida conduzida em “tampão de eletrodo” (Tabela 2). O gel de Separação (13%) (Tabela 3) e o gel Concentrador (5%) (Tabela 4) foi confeccionado entre placas de 180 mm x 165 mm x 1 mm e a eletroforese foi realizada em uma cuba vertical, mantendo-se a corrente constante (20 μA) até a entrada do corante no gel de separação, quando então foi aumentada para 25 μA e assim mantida até o final da corrida (aproximadamente 4 horas). Os demais critérios adotados estão descritos em LAEMMLI (1970).

Após a eletroforese, o gel foi imerso em solução aquosa com 50% de metanol e 10% de ácido acético (solução fixadora) e submetido à agitação constante durante a noite. Então, retirou-se essa solução fixadora e adicionou-se nova solução fixadora, agora adicionada de 0,7% de ácido periódico, submetendo o gel à oxidação sob agitação constante durante 5 minutos em ausência de luz.

O reagente foi descartado após esse tempo, sendo realizada 3 lavagens de 10 minutos cada, com 250 mL de água deionizada, sob agitação. Então o gel foi

Tabela 2. Tampão de eletrodo para eletroforese em gel de poliacrilamida.

COMPONENTES	QUANTIDADE (g/L)
Glicine	14,4
Tris	3,0
Dodecil sulfato de sódio	1,0

Tabela 3. Gel de separação (13%) para eletroforese em gel de poliacrilamida.

COMPONENTES	QUANTIDADE
Tris-HCl 2,25M (pH 8.8)	5,02 mL
Acrilamida-Bis (30:0,8%)	13,05 mL
H ₂ O	10,9 mL
Dodecil sulfato de sódio (4%)	0,75 mL
TEMED	30 µL
Persulfato de amônio (10%)	300 µL

Tabela 4. Gel concentrador (5%) para eletroforese em gel de poliacrilamida.

COMPONENTES	QUANTIDADE
Tris-HCl 0,5 M (pH 6.8)	2,0 mL
Acrilamida-Bis (30:0,8%)	1,33 mL
H ₂ O	4,42 mL
Dodecil sulfato de sódio (4%)	0,20 mL
TEMED	25 µL
Persulfato de amônio (10%)	80 µL

Tabela 5. Reagente de Cor

COMPONENTES	QUANTIDADE (mL)
NaOH 0,1N	28,0
Hidróxido de Amônio	2,0
Nitrato de Prata*	5,0
H ₂ O	115,0

* Pesa 1,0 g de nitrato de prata e dissolve em 40,0 mL de H₂O, posteriormente adiciona o restante de H₂O, lembrando que o volume final da solução "reagente de cor" deve ser 150,0 mL.

tratado com “reagente de cor” (Tabela 5) sob agitação por 10 minutos, lavado com 300mL de água deionizada (3 lavagens, sendo a primeira por 15 minutos, a segunda por 15 minutos, e a terceira por 3 minutos) e revelados com solução de formaldeído 0,25% (TSAI & FRASCH, 1982). Após o aparecimento das bandas (2 a 3 minutos), os géis foram lavados por 15 segundos com 25 mL de ácido cítrico 1 M para interromper a ação do revelador. O gel foi lavado em água corrente durante 1 minuto e foi estocado em água deionizada até fotografá-lo.

7. Ensaio de nodulação

A avaliação foi realizada em condições axênicas, isto é, na ausência de outros microrganismos, em casa de vegetação no Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, SP. As sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*), cv. IAC - Carioca foram desinfectadas superficialmente pela ação de etanol 95%, durante 1 minuto, e água sanitária 1,5% por 6 minutos. Após sucessivas lavagens em água destilada esterilizada, em torno de seis a sete vezes por 1 minuto cada, as sementes então serão semeadas.

O plantio foi realizado em vasos plásticos, com capacidade de 1,5 L, contendo vermiculita como substrato de plantio. O substrato foi previamente esterilizado em autoclave a uma temperatura de 128°C e pressão de 1,5 atmosferas, durante 1 hora. A semeadura ocorreu na densidade de cinco sementes por vaso. Sete dias após a semeadura, foi feito o desbaste, deixando-se uma plântula por vaso.

A inoculação foi realizada após o desbaste. Foram preparados inóculos de *R. tropici* SEMIA 4077 e SEMIA 4080 em meio RDM (BISHOP *et al.*, 1976), com alterações na fonte de carbono (Tabela 1), na concentração de 10^8 células.mL⁻¹. O substrato foi infectado adicionando-se 1 mL da suspensão bacteriana próximo ao colo das plantas.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com os tratamentos no esquema fatorial 2 x 4, duas estirpes (SEMIA 4077 e SEMIA 4080), quatro fontes de carbono (glicerol, galactose, glicose e sacarose), com quatro repetições. As plantas não inoculadas foram utilizadas como testemunhas.

As plantas foram colhidas 31 dias após o plantio e seus nódulos, depois de separados, foram contados, depois secados em estufa com ventilação forçada a 65°C, até atingir massa constante. Os dados de nodulação (número de nódulos por planta e massa seca nodular) foram submetidos à análise de variância pelo teste F, e as médias, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÕES.

Na primeira parte serão abordados aspectos relacionados à produção e caracterização dos polissacarídeos microbianos. A primeira etapa baseou-se na avaliação da manutenção das estirpes de *Rhizobium tropici* em estudo, através de análise da consistência da goma produzidas bem como de avaliar possíveis alterações no crescimento dos microrganismos ao longo do período de manutenção. A segunda etapa do estudo baseou-se nas curvas de crescimento das estirpes o que possibilita a obtenção de processos fermentativos reprodutivos. Com esta abordagem é possível realizar a avaliação das estirpes quanto à produtividade de EPS. A terceira etapa do estudo objetivou analisar a influência da utilização de diferentes fontes de carbono no perfil eletroforético do LPS das bactérias.

Na segunda parte serão abordados os resultados observados quanto à influência das estirpes cultivadas em diferentes fontes de carbono em nodular o feijoeiro.

1. Cultivo de bactérias.

A partir de moléculas orgânicas e inorgânicas simples do ambiente, os microrganismos bacterianos são capazes de sintetizarem novo material celular e se dividir, dando origem a novas células. As estirpes do gênero *Rhizobium* são de crescimento rápido e utilizam uma série de carboidratos como fontes de carbono, tais como: pentoses, hexoses, polióis, ácidos orgânicos, dissacarídeos e polissacarídeos (MONZA *et al.*, 1992 citado por VICARI, 1992), sem a formação de gás. Crescimento em meio contendo carboidrato é usualmente acompanhado pela produção de goma (JORDAN, 1984).

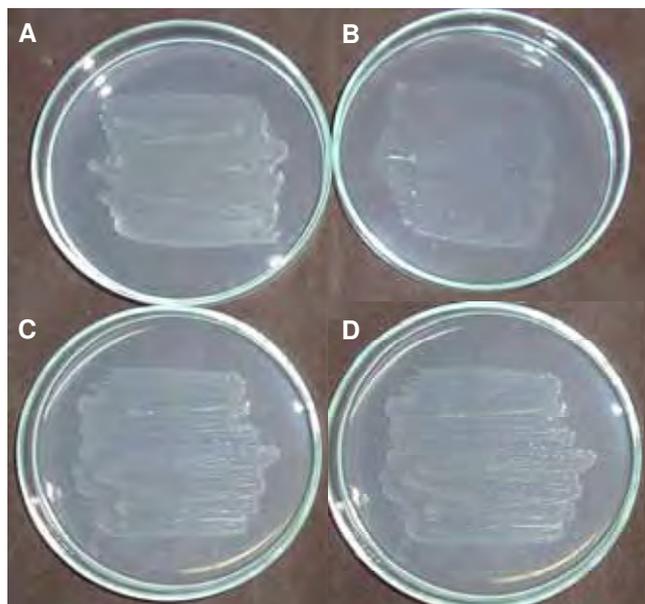


Figura 1. Estirpe de *Rhizobium tropici* SEMIA 4077, cultivadas em meio sólido definido (A) e modificado, contendo galactose (B), glicose (C) e sacarose (D), como fonte de carbono, a 28°C, 72 horas.

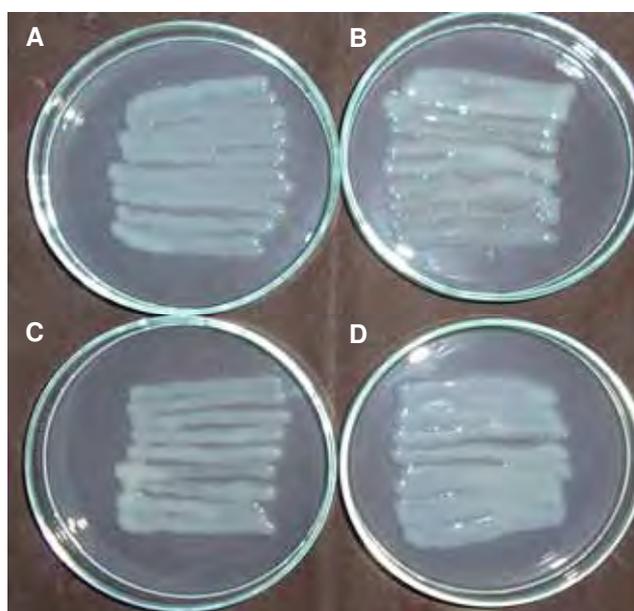


Figura 2. Estirpe de *Rhizobium tropici* SEMIA 4080, cultivadas em meio sólido definido (A) e modificado, contendo galactose (B), glicose (C) e sacarose (D), como fonte de carbono, a 28°C, 72 horas.

As estirpes de rizóbio de crescimento rápido diferem tanto em quantidade de produção de goma como em qualidade. Observou-se que a consistência da goma produzida pelas duas estirpes de *Rhizobium tropici* e 4080 é bastante variada. As Figuras 1 e 2 apresentam fotografias das culturas das duas estirpes crescidas em 4 condições de cultivo.

Em relação à estirpe SEMIA 4077 (Figura 1), esta apresentou produção média de goma quando cultivada em meio contendo glicerol e em meio com glicose. Nota-se uma produção inferior de goma, quando cultivada em meio contendo galactose, como fonte de carbono, porém ao ser tocado com a alça de Drigalsky forma um fio, dando a impressão de um elástico. Entretanto, as células dessa bactéria quando cultivadas em meio com sacarose na sua composição liberaram bastante goma, sendo esta opaca, coloração esbranquiçada e bastante viscosa. As culturas da estirpe SEMIA 4080 (Figura 2) em meio contendo glicerol, galactose, glicose e sacarose apresentaram aspecto gomoso, produção abundante, com o muco chegando a coalescer por toda a placa.

Vários autores classificam as colônias de rizóbio como mucosas “wet” - as que produzem muito muco - e secas “dry” as que produzem pouco muco. Para MOREIRA (1991) esta característica não é usada na classificação de rizóbio, mas, diversos resultados têm mostrado diferenças intrínsecas e ecológicas entre estirpes com colônias “wet” e “dry”. Os estudos das características culturais e morfológicas revelam uma diversidade bastante ampla dos isolados de rizóbio e costuma estar relacionado com estudos em nível de DNA. Estes dados são importantes, uma vez que o conhecimento das comunidades nativas por meio destas ou de outras técnicas revelam-se fundamentais para conhecer a diversidade das espécies (MOREIRA, 1991), sendo o principal recurso para o trabalho na área de biotecnologia.

Nos itens 2 e 3 serão abordados outros tópicos relacionados ao comportamento das estirpes em diferentes condições de cultivo.

2. Curvas de Crescimento de *Rhizobium tropici* estipes SEMIA 4077 e 4080.

Para alcançar o objetivo proposto neste estudo, de se obter a produção de EPS nas diferentes fases de desenvolvimento da cultura, foram inicialmente obtidas as curvas de crescimento celular de cada microrganismo estudado. Uma vez garantidos pelo ambiente os nutrientes e as condições adequadas para assimilá-los, as bactérias irão absorvê-los e transformá-los para que cumpram suas funções básicas do metabolismo (SCHAECHTER *et al.*, 1958).

O metabolismo de uma célula é a soma do seu catabolismo e anabolismo e depende do meio de cultura utilizado, embora não necessariamente em proporção de sua composição exata, e, da fase de crescimento na qual a célula se encontra. Grande parte dos processos metabólicos celulares requer ATP, o qual, em geral, é produzido à custa da oxidação de uma fonte de carbono (DARNELL *et al.*, 1990). A fase exponencial de crescimento, por exemplo, é uma fase de intenso metabolismo celular porque, para crescer exponencialmente, é preciso muita energia, isto é, a célula necessita produzir grandes quantidades de ATP à custa de um grande consumo de uma fonte de carbono (BARNETT, 1976).

O campo da fisiologia microbiana teve grande expansão a partir de 1958, com a descoberta fundamental de que a composição de macromoléculas bacterianas muda com a taxa de crescimento (SCHAECHTER *et al.*, 1958). O aumento na taxa de crescimento é acompanhado por um aumento nas concentrações de EPS liberado no meio, uma vez que, geralmente, a produção do biopolímero em um microrganismo é induzida pela limitação de um nutriente essencial, que não seja o carbono ou outra fonte de energia (SUTHERLAND, 2001).

Com base nos resultados obtidos neste estudo, que podem ser visualizados nas Figuras 3 a 6, pode-se observar que os açúcares de diferentes grupos que foram empregados, tais como: hexoses (glicose e galactose), polióis (glicerol) e dissacarídeos (sacarose) são metabolizados pelas duas estirpes de *Rhizobium tropici* SEMIA 4077 e 4080. Entretanto, o efeito dessas fontes de carbono no

crescimento bacteriano varia de acordo com a estirpe em estudo. Nos Apêndices 1 a 8, encontram-se as curvas de crescimento de cada estirpe cultivada em cada condição de cultivo, juntamente com os respectivos valores dos parâmetros utilizados no modelo.

Na Figura 3 pode-se observar que a estirpe SEMIA 4080 cresceu adequadamente nas hexoses, glicose e galactose, por outro lado, esses açúcares não permitiram grande desenvolvimento da estirpe SEMIA 4077. Na literatura microrganismos de crescimento rápido utilizam mais a galactose durante o crescimento comparando os de crescimento lento, enquanto que ambos os tipos de rizóbio sintetizam e liberam uma faixa ampla de aminoácidos para o meio de cultura (MOREIRA 1991). A galactose precisa ser transformada num intermediário da via glicolítica para poder ser catabolizada, sendo transformada em glicose-6-fosfato, podendo seguir diferentes caminhos de metabolização (VINCENT, 1977 citado por VICARI, 1992).

Analisando o crescimento da bactéria SEMIA 4077 em meio de cultura líquido RDM com glicose e em meio com galactose, observamos a semelhança das curvas de crescimento. Assim, observa-se que a curva de crescimento da estirpe em meio com glicose apresenta um crescimento correspondente a 23 unidades de Kletts (Figuras 3 e 6), e quando cultivada com galactose atingiu durante o período de incubação um crescimento máximo correspondente a 23 unidade Kletts (Figuras 3 e 5).

Entretanto, as células da SEMIA 4080 utilizaram em maior extensão estas hexoses (Figuras 3, 7 e 8). Cultivadas em meio de cultivo com glicose apresentaram um crescimento mais lento quando comparado com o crescimento em meio contendo galactose como fonte de carbono. A fase Lag, correspondente ao período de adaptação ao meio, ocorreu em 12 horas. Em seguida, observou-se que a curva de crescimento em meio com glicose apresentou uma fase Log acentuada, durante cerca de 53 horas de cultivo, atingindo a fase estacionária em 60 horas com 297 unidades Kletts, e no final do período de incubação um crescimento correspondente a 349 unidades Kletts. Já a resposta de crescimento

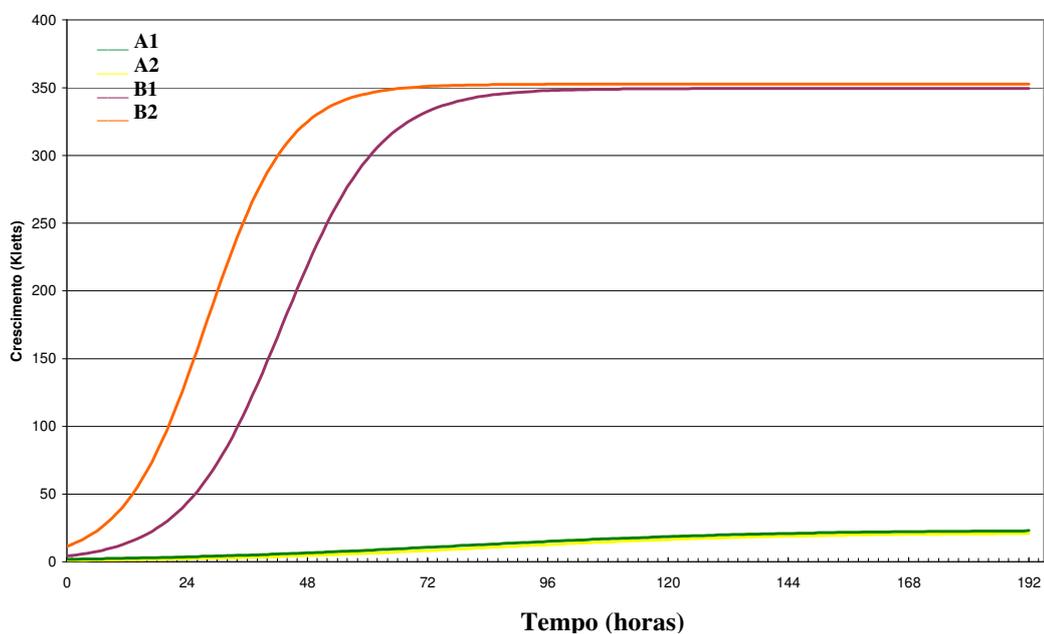


Figura 3. Curvas de crescimento obtidas de culturas de estirpes de *Rhizobium tropici* SEMIA 4077 (A) e SEMIA 4080 (B) mantidas em meio líquido RDM na presença de glicose (1) e em meio com galactose (2), a temperatura de 28 °C, sob agitação constante de 140 rpm.

em meio com galactose apresentou uma fase Log mais acentuada, ao longo de 45 horas. O início da fase estacionária ocorreu em torno de 50 horas com 330 unidades Kletts e durante a fase estacionária da curva de crescimento o declínio da intensidade colorimétrica detectada deve-se provavelmente a lise da célula durante o cultivo, assim as enzimas podem ser liberadas para o meio extracelular podendo ocorrer à degradação dos produtos poliméricos e a redução da massa (Figura 3).

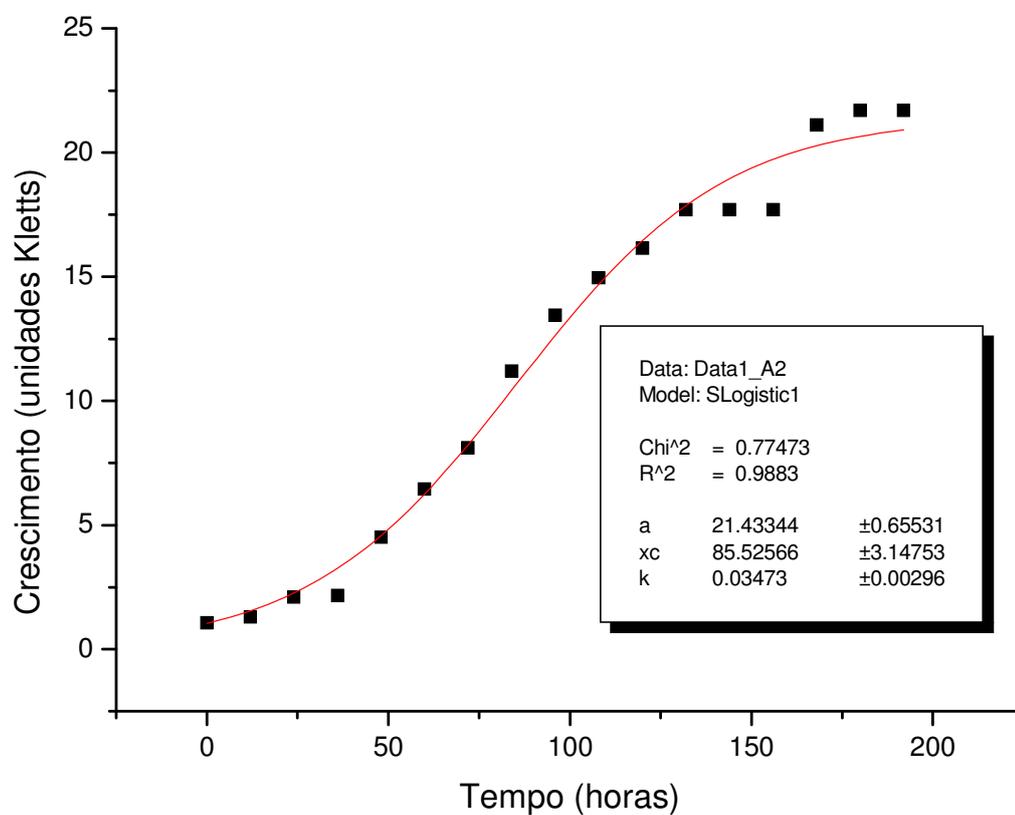


Figura 5. Curva de crescimento da estirpe *Rhizobium tropici* SEMIA 4077, mantidas em meio líquido RDM contendo galactose, com os respectivos parâmetros utilizados no modelo de equação, dada pela leitura da turbidez em relação ao tempo.

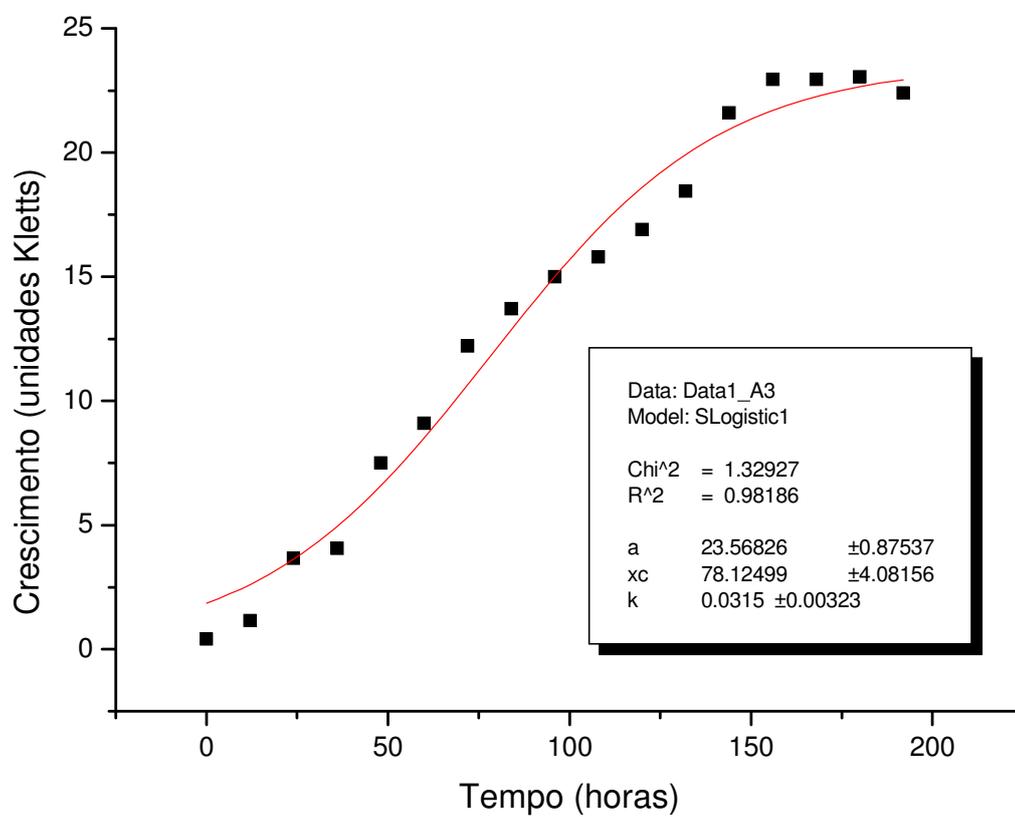


Figura 6. Curva de crescimento da estirpe *Rhizobium tropici* SEMIA 4077, mantidas em meio líquido RDM contendo glicose, com os respectivos parâmetros utilizados no modelo de equação, dada pela leitura da turbidez em relação ao tempo.

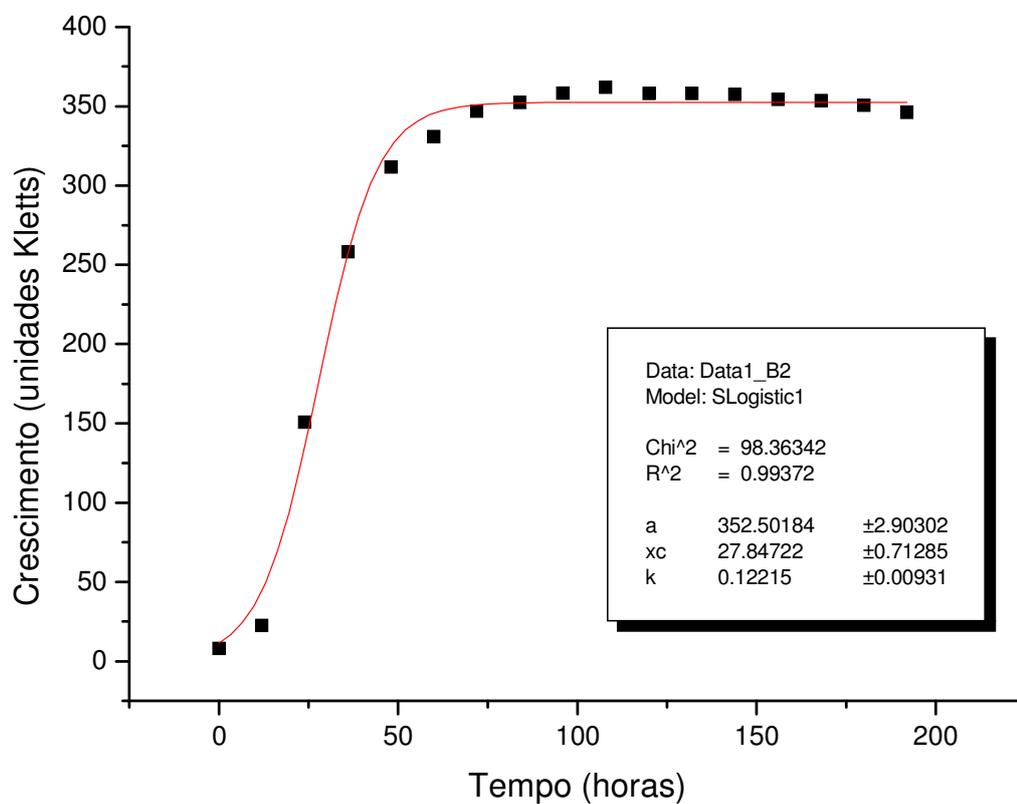


Figura 7. Curva de crescimento da estirpe *Rhizobium tropici* SEMIA 4080, mantidas em meio líquido RDM contendo galactose, com os respectivos parâmetros utilizados no modelo de equação, dada pela leitura da turbidez em relação ao tempo.

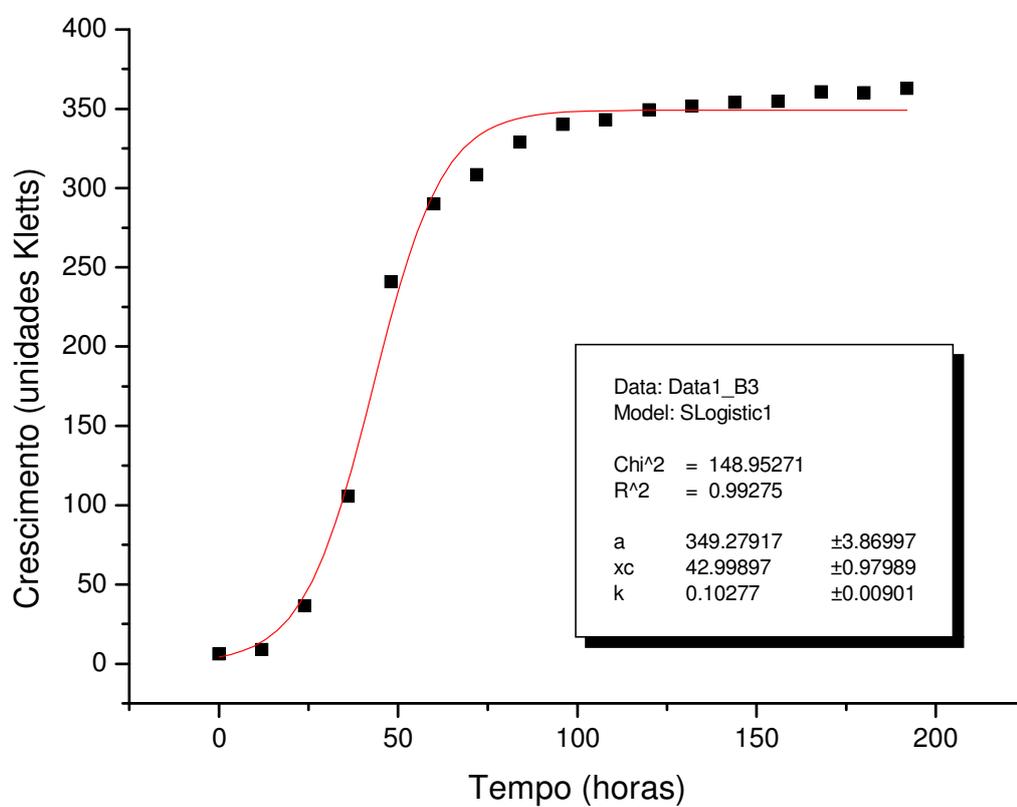


Figura 8. Curva de crescimento da estirpe *Rhizobium tropici* SEMIA 4080, mantidas em meio líquido RDM contendo glicose, com os respectivos parâmetros utilizados no modelo de equação, dada pela leitura da turbidez em relação ao tempo.

Ambas as estirpes cresceram em glicerol, porém a estirpe SEMIA 4077 cresceu muito pouco nesta fonte de carbono atingindo durante o período de incubação um crescimento máximo correspondente a 27 unidade Kletts (Figuras 9 e 10). Apesar disso, o glicerol foi descrito como uma excelente fonte de carbono para o crescimento de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (MARTINEZ DE DRETS & ARIAS, 1974; ARIAS & MARTINEZ DE DRETS, 1976 citados por VICARI, 1992). Podemos observar que a estirpe SEMIA 4080 cresceu adequadamente nesta fonte de carbono, atingindo a fase estacionária em 108 horas com 231 unidades Kletts (Figuras 9 e 11).

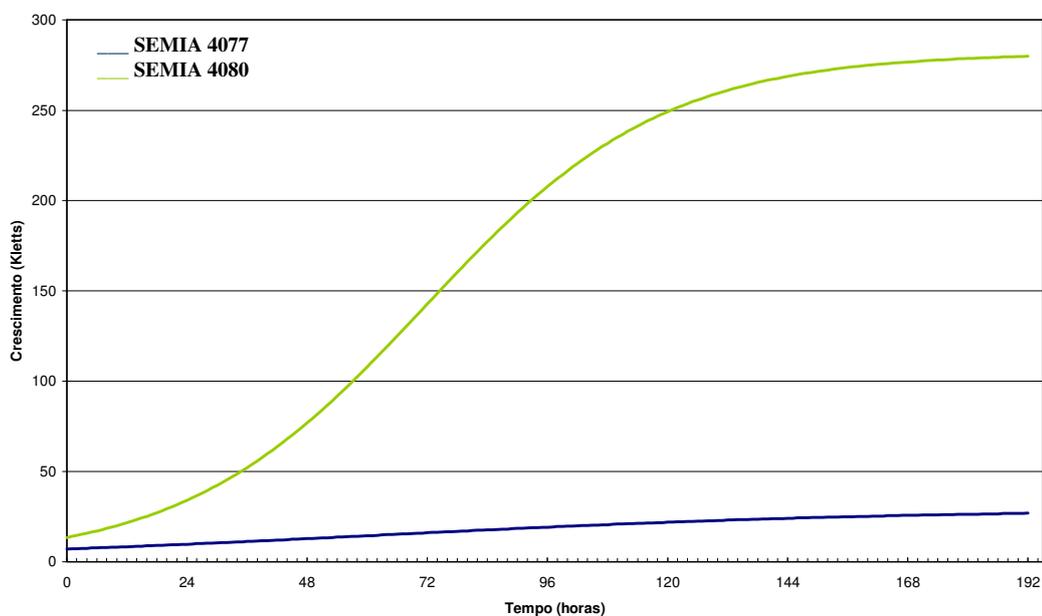


Figura 9. Curvas de crescimento obtidas de culturas de estirpes de *Rhizobium tropici* mantidas em meio líquido RDM com glicerol, a temperatura de 28 °C, sob agitação constante de 140 rpm.

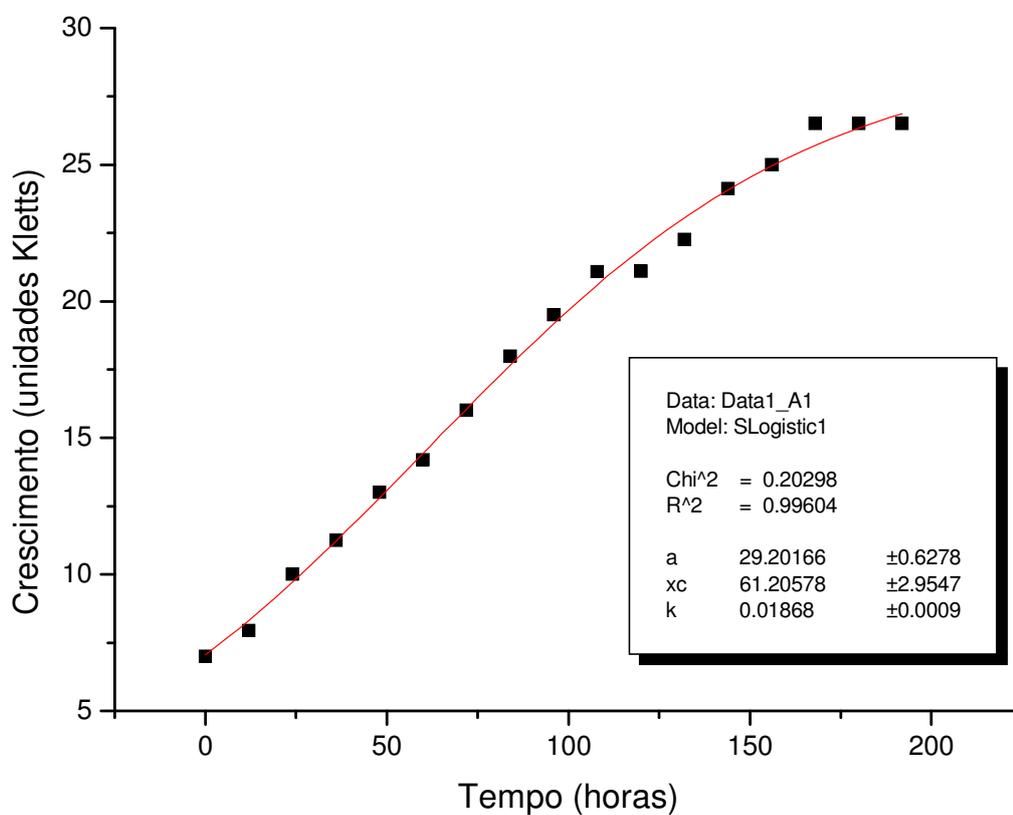


Figura 10. Curva de crescimento da estirpe *Rhizobium tropici* SEMIA 4077, mantidas em meio líquido RDM contendo glicerol, com os respectivos parâmetros utilizados no modelo de equação, dada pela leitura da turbidez em relação ao tempo.

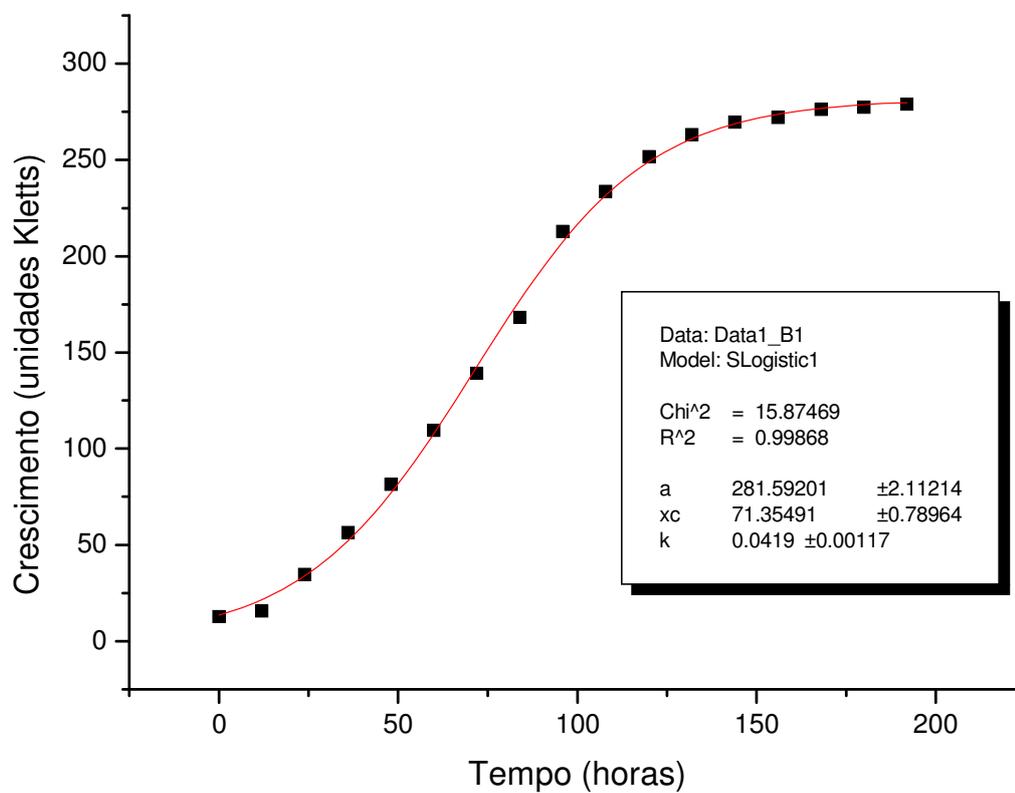


Figura 11. Curva de crescimento da estirpe *Rhizobium tropici* SEMIA 4080, mantidas em meio líquido RDM contendo glicerol, com os respectivos parâmetros utilizados no modelo de equação, dada pela leitura da turbidez em relação ao tempo.

Frequentemente, os estudos sobre utilização de carboidratos por *Rhizobium* mostram que os dissacarídeos são amplamente utilizados (STOWERS & EAGLESHAM, 1984; ELSHEIKH & WOOD, 1989; MONZA, *et al.* 1992 citados por VICARI, 1992) o que não ocorre com os *Bradyrhizobium* (STOWERS & EAGLESHAM, 1983; BRUNEL *et al.*, 1988 citados por VICARI, 1992). Na Figura 12, as curvas de crescimento das estirpes mostram que o dissacarídeo sacarose foi utilizado para promover o crescimento e liberação de EPS.

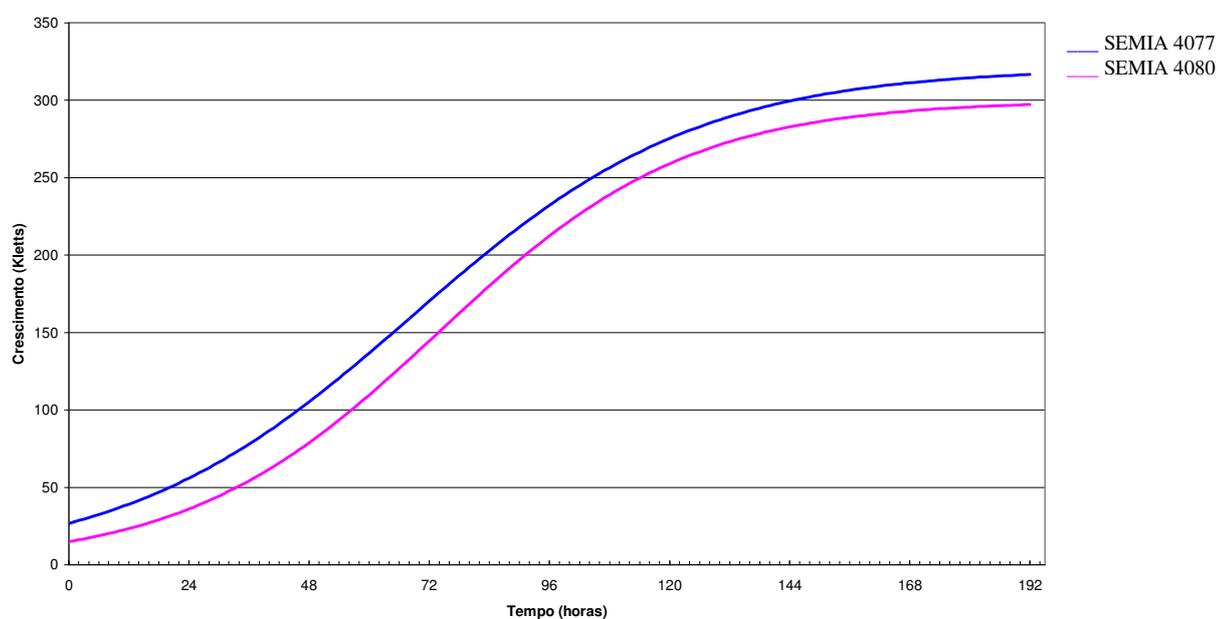


Figura 12. Curvas de crescimento obtidas de culturas de estirpes de *Rhizobium tropici* mantidas em meio líquido RDM com sacarose, a temperatura de 28 °C, sob agitação constante de 140 rpm.

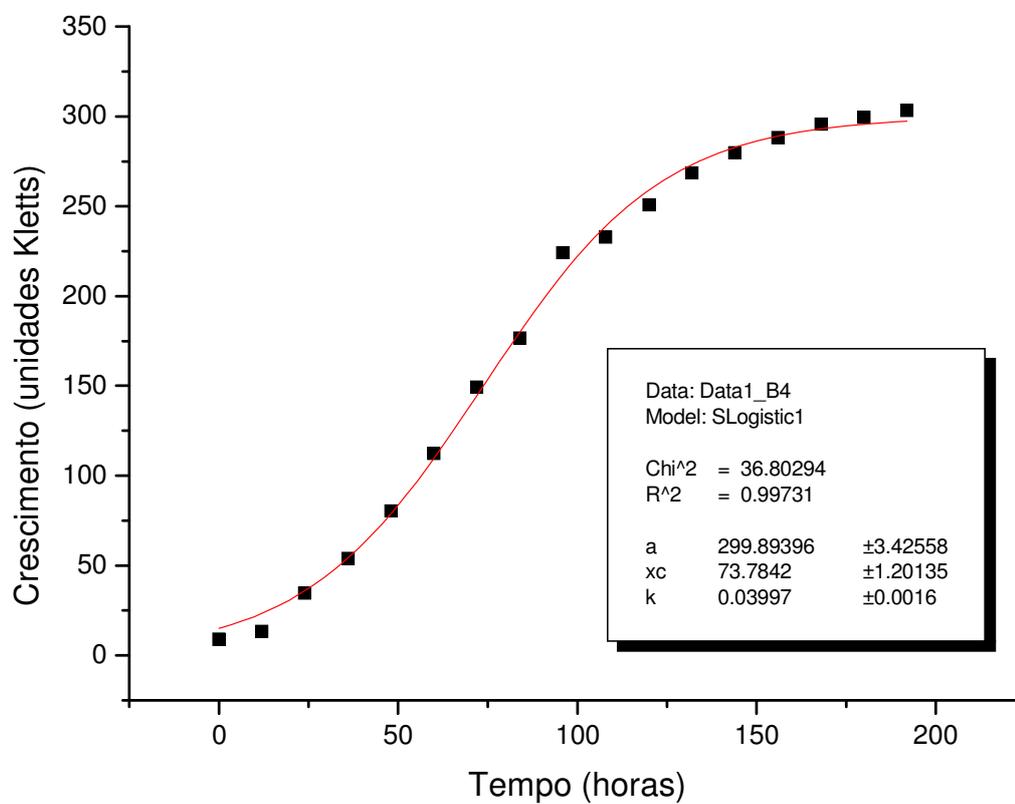


Figura 13. Curva de crescimento da estirpe *Rhizobium tropici* SEMIA 4080, mantidas em meio líquido RDM contendo sacarose, com os respectivos parâmetros utilizados no modelo de equação, dada pela leitura da turbidez em relação ao tempo.

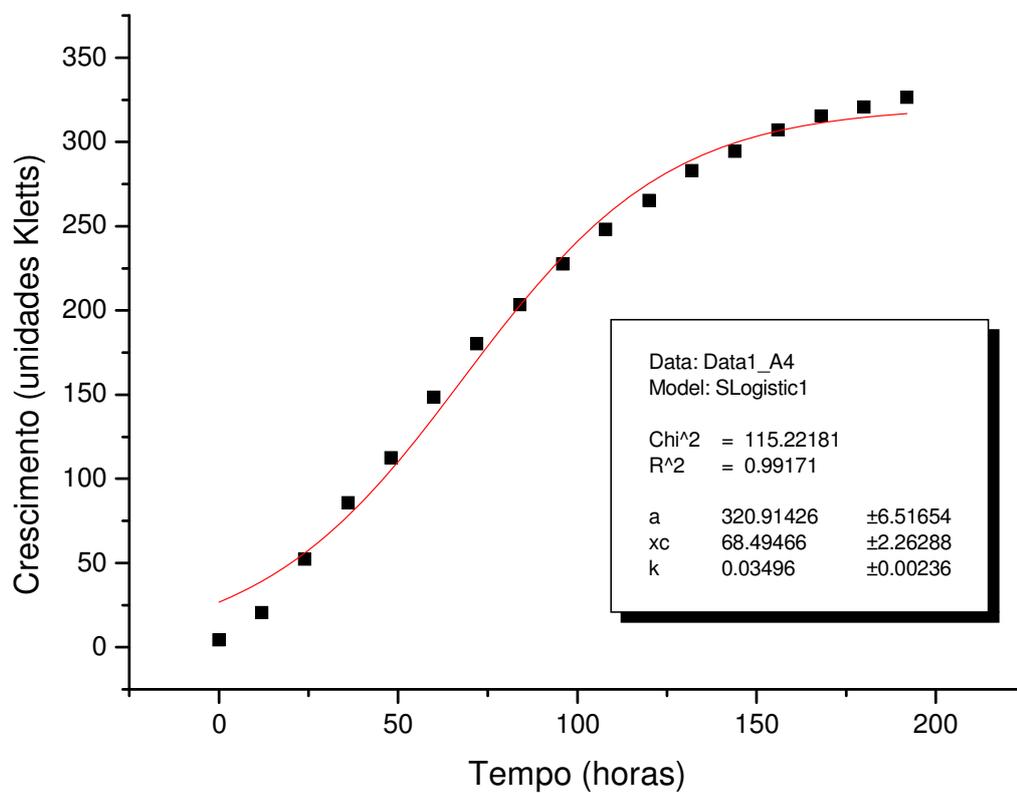


Figura 14. Curva de crescimento da estirpe *Rhizobium tropici* SEMIA 4077, mantidas em meio líquido RDM contendo sacarose, com os respectivos parâmetros utilizados no modelo de equação, dada pela leitura da turbidez em relação ao tempo.

Entretanto, tal utilização só se iniciou após 28 horas de cultivo e, então, foi aumentando progressivamente com o tempo. Esse resultado é devido à existência de enzimas que foram induzidas e são responsáveis pela hidrólise da sacarose. Após esta hidrólise, a glicose entra na via glicolítica e a frutose mais ATP, na presença de hexoquinase, a enzima que catalisa a primeira etapa da via glicolítica (BARNETT, 1976), formam a frutose-6-fosfato que já é um intermediário da via glicolítica. Mas para formar glicose e frutose a partir da sacarose, faz-se necessária a presença da enzima chamada invertase ou β -D-frutofuranosidase (ROSE & HARRISON, 1970). Em altas concentrações de glicose, a expressão do gene que codifica a invertase é reprimida (BARNETT, 1976), portanto, a sacarose é catabolizada somente quando a glicose é exaurida.

Na Tabela 6, encontra-se resumido o efeito das diferentes fontes de carbono, no desenvolvimento das duas estirpes de *Rhizobium tropici* estudadas.

Tabela 6. O efeito das diferentes fontes de carbono sobre o desenvolvimento de estirpes de *Rhizobium tropici*.

FONTE DE CARBONO	SEMIA 4077	SEMIA 4080
Glicerol	1	3
D-Galactose	1	5
D-Glicose	1	4
Sacarose	4	4

0 – 70 Kletts → 0; 71 - 140 Kletts → 1; 141 - 210 Kletts → 2;
211 - 280 Kletts → 3; 281 - 350 Kletts → 4; 351 - acima → 5.

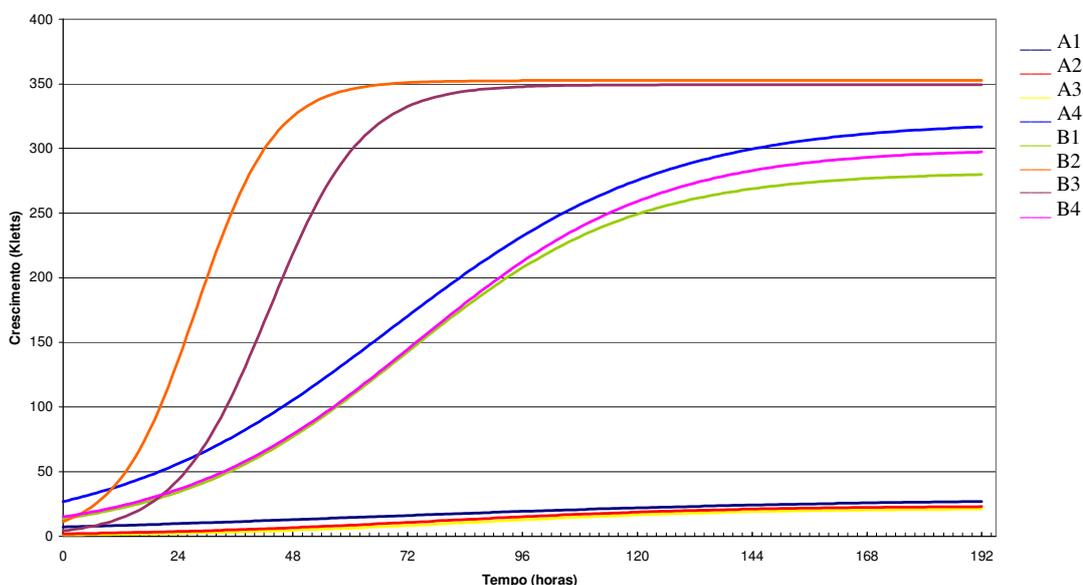


Figura 15. Curvas de crescimento de *Rhizobium tropici* das estirpes SEMIA 4077 (A) e 4080 (B) cultivadas em meio líquido RDM contendo glicerol (1), galactose (2), glicose (3) e sacarose (4), a temperatura de 28 °C, sob agitação constante de 140 rpm.

Como pode ser observado, o comportamento de cada estirpe frente aos diferentes açúcares é uma maneira de caracterizá-las. Além disso, pode ser observado que cada estirpe apresenta um melhor desenvolvimento com determinados açúcares. A estirpe SEMIA 4077 usa preferencialmente a sacarose, por sua vez, a estirpe SEMIA 4080 utilizou adequadamente todos os açúcares testados. Acredita-se que a comparação de crescimento das estirpes em diversos meios seja um importante fator na caracterização dessas bactérias que fixam nitrogênio em simbiose com leguminosas tropicais.

3. Produção de EPS

Na presente etapa foi avaliada a produtividade de EPS após 48, 96, 144 e 192 horas de cultivo. As Figuras 16 e 17 apresentam as produtividades médias dos

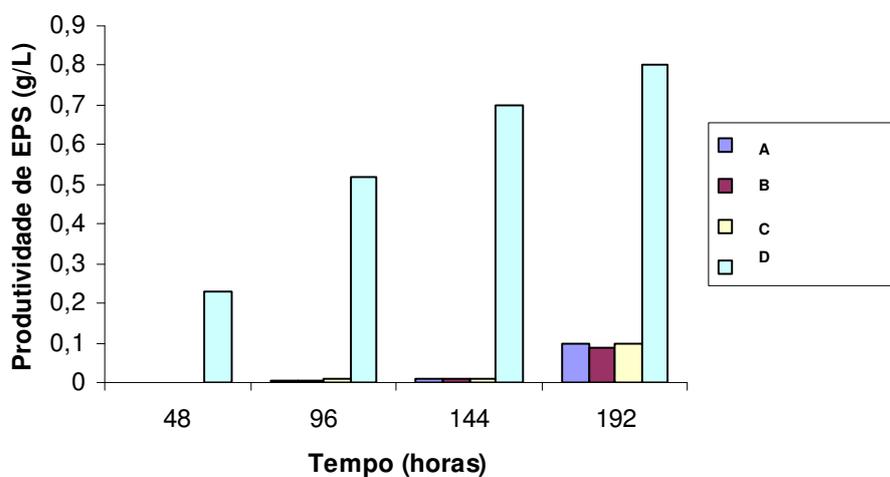


Figura 16. Produtividade de EPS da estirpe de *Rhizobium tropici* SEMIA 4077 cultivadas em meio sólido definido (A) e modificado, contendo galactose (B), glicose (C) e sacarose (D), como fonte de carbono.

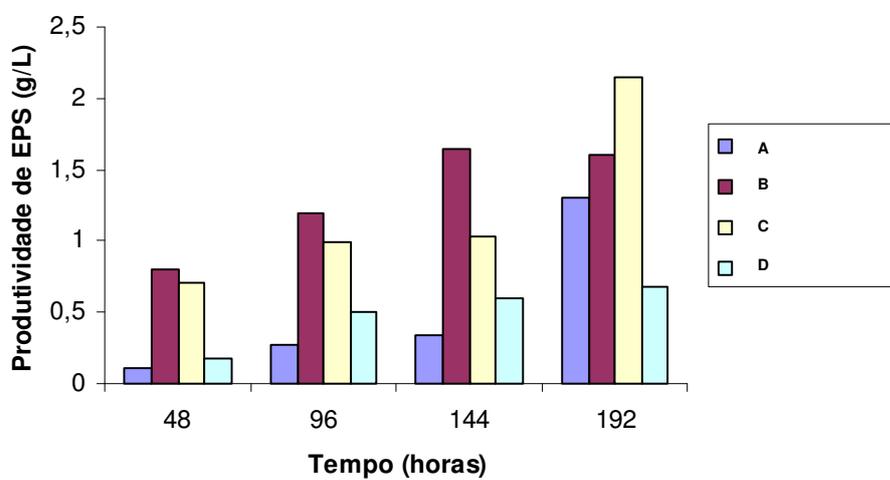


Figura 17. Produtividade de EPS da estirpe de *Rhizobium tropici* SEMIA 4080 cultivadas em meio sólido definido (A) e modificado, contendo galactose (B), glicose (C) e sacarose (D), como fonte de carbono.

cultivos realizados em duplicada. Nestas Figuras observa-se que a estirpe SEMIA 4080 quando cultivada em meio com glicose apresentou a maior produtividade, entretanto a estirpe SEMIA 4077 cultivada em meio com glicerol, galactose e glicose, apresentou produtividades menores que os demais estudados.

Com base nos resultados obtidos nesta etapa, pode-se afirmar que o microrganismo com maior produtividade de EPS é a SEMIA 4080.

Entretanto, sabe-se que a produtividade é influenciada pela linhagem do microrganismo, tempo e meio de fermentação (SOUZA & VENDRUSCOLO, 2000; ANTUNES *et al.*, 2000). Neste estudo, os cultivos foram realizados com o meio definido RDM (BISHOP *et al.*, 1976), que é um meio com menor disponibilidade de nutrientes. Este fator foi importante para a escolha deste meio para cultivar bactérias, uma vez que meios contendo elevado teor de fonte de carbono e baixo teor de nitrogênio favorece o acúmulo de polímero (SUTHERLAND, 1988). Neste caso, as fontes de carbono utilizadas como substrato foram glicerol, galactose, glicose e sacarose. Segundo MARGARITI & PACE (1985), obtém-se um alto rendimento quando ocorre a conversão de 70-80% da fonte de carbono utilizada em biopolímero.

Segundo BREEDVELD *et al.* (1990), o tempo de cultivo é um outro fator limitante, pois observaram que após este tempo é que ocorre a produção de EPS, que pode ser influenciada pela osmolaridade do meio de cultivo, regulando a abundância do biopolímero. Estudos realizados por PADILHA (2003) também verificou que os resultados de fermentação obtidos para linhagens de *Xanthomonas* utilizadas demonstraram a influência do tempo de incubação na produção de EPS. ASHTAPUTRE & SHAH (1995), estudando a produção de um EPS a partir de *Sphingomonas paucimobilis* GS1, observaram que quase 75% do produto se formou durante a fase de crescimento exponencial, sendo o restante acumulado durante a fase estacionária, mostrando que a produção de biopolímero está relacionada ao crescimento. Segundo SUTHERLAND (2001), alguns EPS são sintetizados durante todo o crescimento bacteriano enquanto que outros são produzidos somente durante a fase logarítmica ou na fase estacionária.

4. Análises da composição dos exopolissacarídeos.

A partir dos resultados das avaliações descritas no item 3, foi selecionado o tempo de 144 horas para a recuperação dos EPSs rizobianos, uma vez que neste tempo as duas estirpes de *R. tropici*, cultivadas nas diferentes condições de cultivo, produziram quantidade suficiente para o processo de preparo das amostras de EPS para análise por CLAE e FTIR. Vale salientar que, a partir deste tempo, pode ocorrer lise da célula durante o cultivo, assim as enzimas podem ser liberadas para o meio extracelular podendo ocorrer a degradação do biopolímero.

Os resultados obtidos pela análise dos EPSs das estirpes de *R. tropici* SEMIA 4077 e SEMIA 4080, cultivadas sob diferentes fontes de carbono, estão relatadas na Tabela 7, e os perfis cromatográficos representativos de uma mistura de monossacarídeos padrões, como também dos monômeros marcados com PMP, obtidos a partir da hidrólise ácida do EPS das estirpes estão apresentados nas Figuras .

Através das análises por CLAE verificou-se que os EPSs das duas estirpes de *R. tropici* SEMIA 4077 e 4080, cultivadas no meio líquido RDM com diferentes fontes de carbono, têm em sua composição açúcares neutros (manose, ramnose, glicose e galactose), e, açúcares ácidos (ácido glucurônico e galacturônico) em diferentes concentrações.

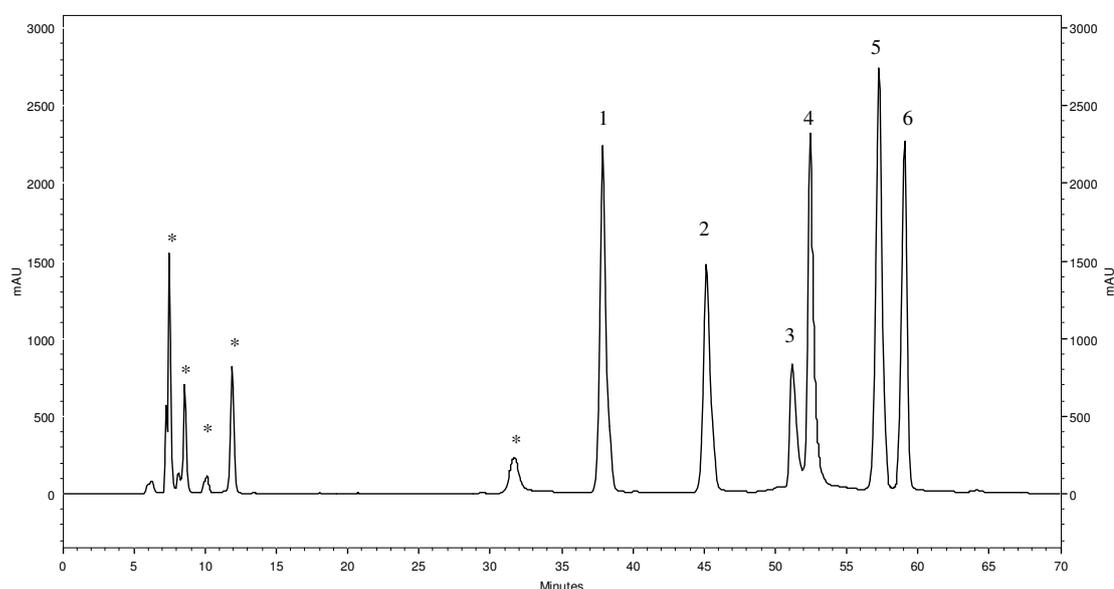


Figura 18. Perfil cromatográfico padrão representativo de uma mistura de monossacarídeos padrões derivados com PMP. (*) resíduo PMP, solventes; (1) manose; (2) ramnose; (3) ácido glucurônico; (4) ácido galacturônico; (5) glicose; (6) galactose.

Tabela 7. Composição dos exopolissacarídeos em monossacarídeos ⁽¹⁾ produzidos pelas duas estirpes de *Rhizobium tropici*: SEMIA 4077 e SEMIA 4080, cultivadas em diferentes fontes de carbono.

Estirpes ⁽²⁾	Man	Rha	GlcA	GalA	Glc	Gal
	(mg.mL ⁻¹)					
SEMIA 4077 (1)	0,0002 f	0,0003 d	0,0115 b	0,0002 a	0,0966 g	0,0524 g
SEMIA 4077 (2)	0,0010 c	0,0004 c	0,0124 b	0,0003 a	0,1395 d	0,0815 c
SEMIA 4077 (3)	0,0010 c	0,0003 d	0,0115 b	0,0003 a	0,1465 c	0,0785 d
SEMIA 4077 (4)	0,0020 b	0,0010 b	0,0124 b	0,0002 a	0,1680 b	0,0895 b
SEMIA 4080 (1)	0,0010 c	0,0010 b	0,0120 b	0,0003 a	0,1225 e	0,0620 e
SEMIA 4080 (2)	0,0003 e	0,0004 c	0,0120 b	0,0003 a	0,1135 f	0,0580 f
SEMIA 4080 (3)	0,0004 f	0,0004 c	0,0180 a	0,0002 a	0,0805 h	0,0410 h
SEMIA 4080 (4)	0,0040 a	0,0020 a	0,0130 b	0,0002 a	0,1915 a	0,1190 a

⁽¹⁾ Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. ⁽²⁾ Estirpes crescidas em meio definido contendo: glicerol (1); galactose (2); glicose (3); e sacarose (4), como fonte de carbono, por 144 horas à 140rpm, a uma temperatura de 28 °C. Abreviações: Man, manose, Rha, ramnose, GlcA, ácido glucurônico, GalA, ácido galacturônico, Glc, glicose, Gal, galactose.

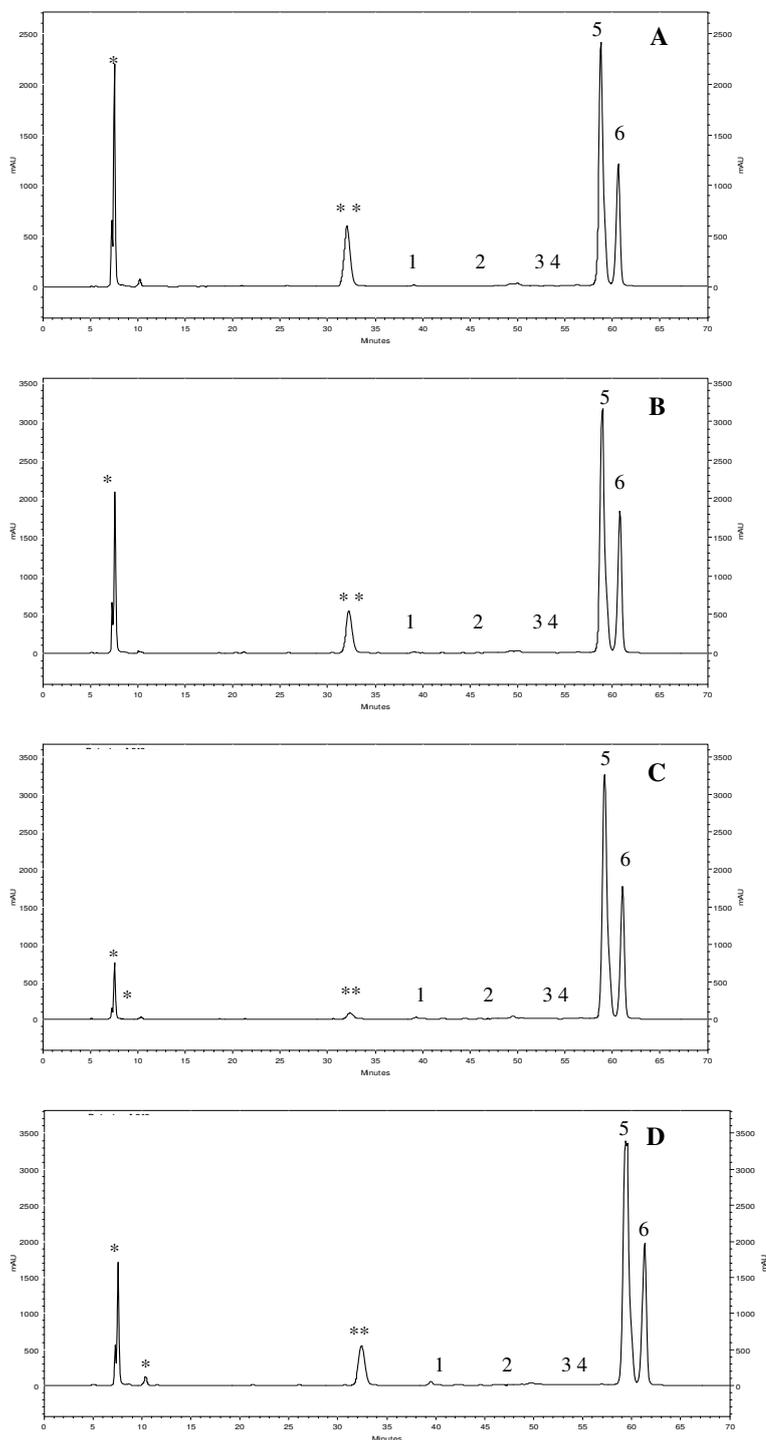


Figura 19. Perfil cromatográfico representativo de açúcares derivados com PMP obtidos a partir da hidrólise do EPS da estirpe *Rhizobium tropici* SEMIA 4077 cultivada em meio RDM (A), RDM 2 (B), RDM 3 (C) e RDM 4 (D). Onde (*) solventes e resíduos; (**) resíduo do marcador PMP; (1) manose; (2) ramnose; (3) ácido glucurônico; (4) ácido galacturônico; (5) glicose; (6) galactose.

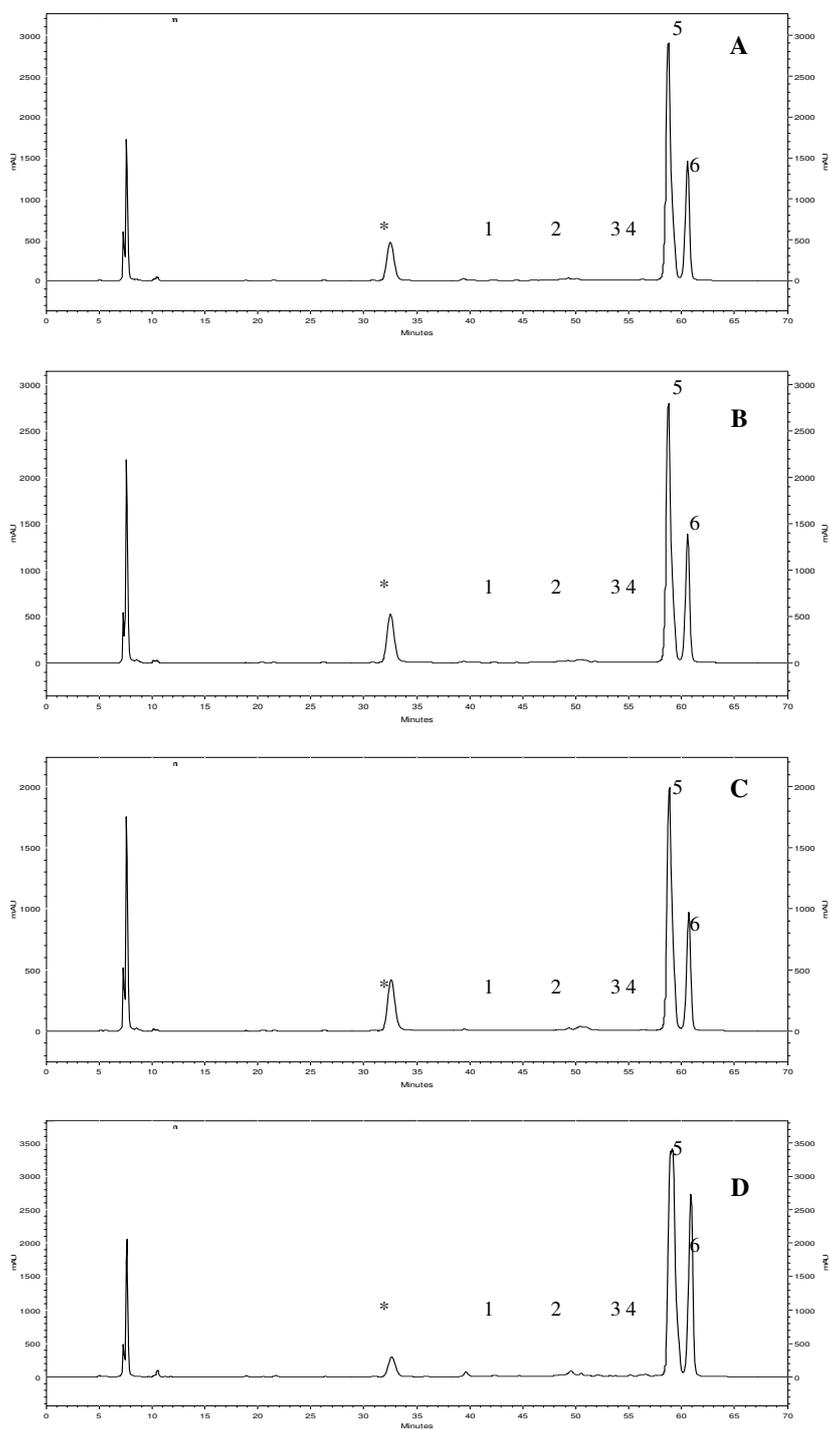


Figura 20. Perfil cromatográfico representativo de açúcares derivados com PMP obtidos a partir da hidrólise do EPS da estirpe *Rhizobium tropici* SEMIA 4080 cultivada em meio RDM (A), RDM 2 (B), RDM 3 (C) e RDM 4 (D). Onde: (*) solventes e resíduos; (**) resíduo do marcador PMP; (1) manose; (2) ramnose; (3) ácido glucurônico; (4) ácido galacturônico; (5) glicose; (6) galactose.

Entretanto, como pode ser verificado na Tabela 7, as duas estirpes apresentaram quantidades pequenas de manose, ramnose, ácido glucurônico e ácido galacturônico. Recentemente, STAEHELIN *et al.* (2006) analisando o EPS de *Rhizobium* sp. estirpe NGR234 também encontraram uma quantidade muito pequena de ácido glucurônico nas amostras. A presença de monossacarídeos ácidos (ácido glucurônico e galacturônico), mesmo em baixa concentração, torna o EPS mais acidificado e o seu acúmulo faz com que o heteropolissacarídeo fique altamente aniônico e, assim, podem atuar como resinas de troca iônica, concentrando minerais e nutrientes ao redor da célula (WHITFIELD, 1988).

A Tabela 7 mostra também a presença de ramnose (0,0003-0,0020 mg/ml) nos EPSs produzidos pelas duas estirpes. A ramnose é considerado um monossacarídeo característico do LPS. Embora, STREETER (1999) tenha observado que polissacarídeos extracelulares produzidos em nódulos que se diferenciavam dos demais EPSs pela presença da ramnose. Sugere-se que a presença desse açúcar seja uma característica desejável, pois, em geral, os polímeros dos quais faz parte possuem capacidade de formar géis verdadeiros (MCNELLY & KANG, 1977).

Os EPSs produzidos pela estirpe SEMIA 4080 nos meios RDM com sacarose e RDM com glicose parecem conter, respectivamente, maior quantidade de manose e ácido glucurônico o que justificaria seu maior potencial espessante. QUINN (1999) afirma que a eliminação dos terminais de manose da xantana diminui a sua capacidade de espessar.

Os biopolímeros das estirpes consistiram predominantemente da presença de galactose e glicose (Tabela 7). Os quatro tipos de meio de cultura tiveram efeitos diferentes ($F, P < 0,01$) na concentração destes monossacarídeos na composição do EPS, sendo maior para *Rhizobium tropici* SEMIA 4080 cultivada em meio contendo sacarose. Entretanto, quando a mesma estirpe foi cultivada em meio contendo glicose, esta apresentou as menores concentrações de glicose e galactose em relação às demais.

Na Figura 21 são apresentados os espectros FTIR dos diferentes EPS.

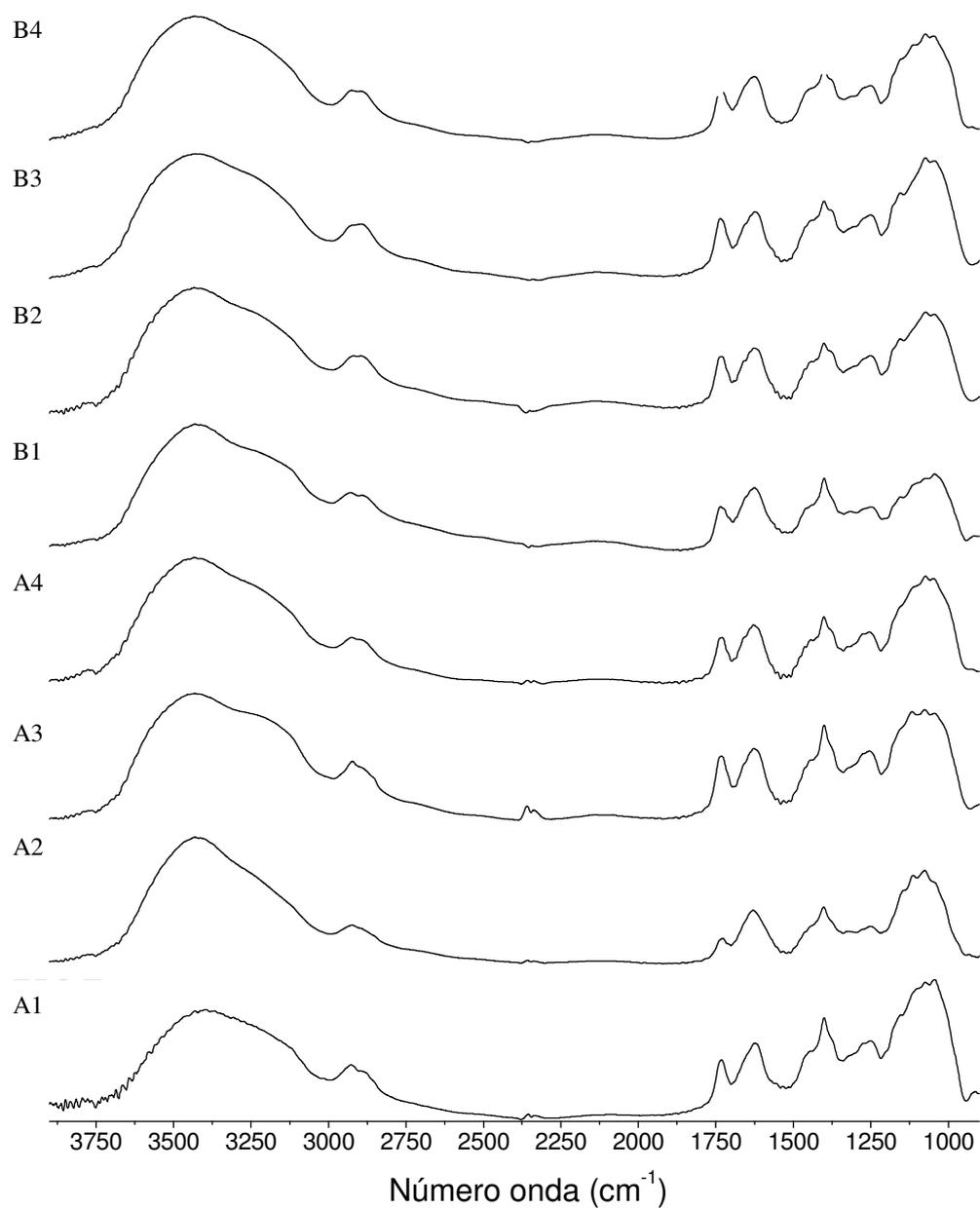


Figura 21. Espectros de FTIR de EPS produzido pela estirpe *Rhizobium tropici* SEMIA 4077 (A) e SEMIA 4080 (B) cultivada em meio contendo glicerol (1), galactose (2), glicose (3) e sacarose (4). As frequências dos picos foram determinadas através do espectro da segunda derivada (NAUMANN, 2000).

Na Figura 21 são apresentados os espectros FTIR dos diferentes EPS. Todos os sinais observado são característicos de sacarídeos parcialmente esterificados e sem presença impureza de proteínas, pela ausência do sinal em 1550cm^{-1} , típicos dessas moléculas. Neste espectro, o sinal largo entre 3700 e 3000cm^{-1} é devido ao estiramento das ligações OH, o sinal pequeno entre 3000 e 2800cm^{-1} aos grupos CH_2 e CH; o sinal entre 1700 e 1770cm^{-1} às vibrações de estiramento C=O do grupo funcional éster presente na estrutura do polissacarídeo extracelular (NAUMANN, 2000; FORATO *et al.*, 2003). Os ésteres, produtos derivados de carboidratos, além de serem atóxicos podem ser empregados como surfactantes e emulsificantes. O'Neill *et al.* (1991) também localizaram grupo funcional éster em EPS ácido secretado por algumas estirpes de *R. leguminosarum* que desenvolvem nódulos do tipo indeterminado. A região entre 1690 e 1600cm^{-1} corresponde aos sinais do estiramento de íon carboxilato, aos grupos COO^- , e as deformações angulares da ligação OH dos sacarídeos (FORATO *et al.*, 2003). O sinal estreito em 1400cm^{-1} , refere-se às vibrações de estiramento assimétrico do grupo COOH da cadeia lateral do EPS. Os sinais entre 1200 a 900cm^{-1} são atribuídos ao estreitamento das bandas de C-O dos polissacarídeos (FORATO *et al.*, 2003). A maior mudança que se observa nesses espectros é a menor intensidade do sinal em 1740cm^{-1} , relativo aos grupo C=O dos ésteres, para a amostra SEMIA 4077, cultivada em galactose (A2), quando comparada aos outros espectros. A razão do sinal em 1740 pelo sinal na região de 1600 a 1690cm^{-1} é de cerca de 0,8 para todos as amostras, exceto para amostra A2, onde essa razão é de apenas 0,45. Isso indica que quando a SEMIA 4077 foi cultivada em galactose, o EPS teve baixo grau de esterificação, que pode por exemplo ter contribuído para o baixo crescimento dessa bactéria nesta fonte de carbono como observado na culturas em meio sólido (Figura 1B). Isso também pode estar relacionado com a grande elasticidade observada nas colônias cultivadas em galactose (Figura 1B) e não observada nas outras condições (Figura 1A, 1C e 1D).

De acordo com os resultados observados, ocorrem variações nas proporções dos monossacarídeos encontrados na composição dos EPS das estirpes avaliadas, em função das alterações na fonte de carbono presente no meio de cultura. BECKER *et al.* (1998) verificaram que variações na composição do meio de cultura podem sim alterar a composição e estrutura do EPS produzidos por dois tipos de *Bradyrhizobium japonicum*. Isso indica que, tanto estirpes de rizóbio de crescimento rápido quanto lentos, utilizam seletivamente açúcares (MARTINEZ-DRETS & ARIAS, 1972). Contudo, segundo BECKER & PÜHLER (1998) os EPSs rizobianos são heteropolissacarídeos espécies- ou estirpe-específica.

5. Análise do LPS

Alguns relatos (De MAAGD *et al.*, 1988; CARRION *et al.*, 1990) tem indicado que o antígeno-O destes LPSs frequentemente consiste de oligossacarídeos de extensões específicas e presentes em forma dupla. Os perfis de proteínas celulares e LPS podem ser espécie - específico (CARRION *et al.*, 1990; De LAJUDIE *et al.*, 1994).

Na Figura 22 encontra-se a representação esquemática da estrutura química do Lipopolissacarídeo juntamente com o perfil eletroforético em SDS-PAGE.

As estirpes de *Rhizobium*, de crescimento rápido, não apresentam nas moléculas de LPS as bandas características e equidistantes na porção superior do gel (LPS I) que se repetem nas estruturas do antígeno-O da maioria das bactérias Gram-negativas e revelam um padrão, com bandas de alta e média mobilidade e de baixos pesos moleculares, próprias de moléculas do LPS II, que diferem entre si, pelo número de oligossacarídeos. Os perfis eletroforéticos dos LPSs rizobianos crescidos em diferentes fontes de carbono estão mostrados na Figura 23.

(a)

(b)

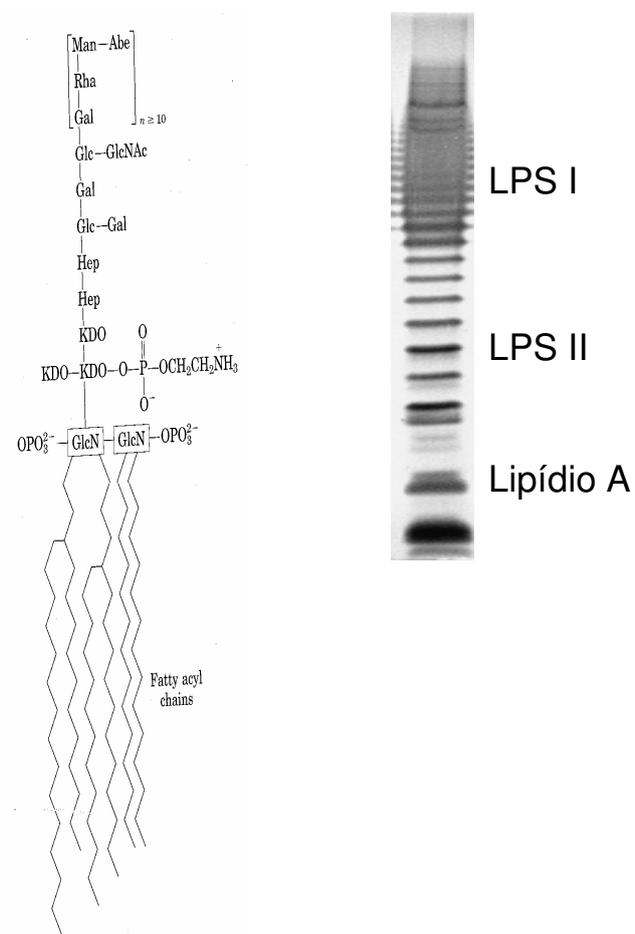


Figura 22. Esquema da estrutura química do lipopolissacarídeo (a) e perfil eletroforético em SDS-PAGE (b).

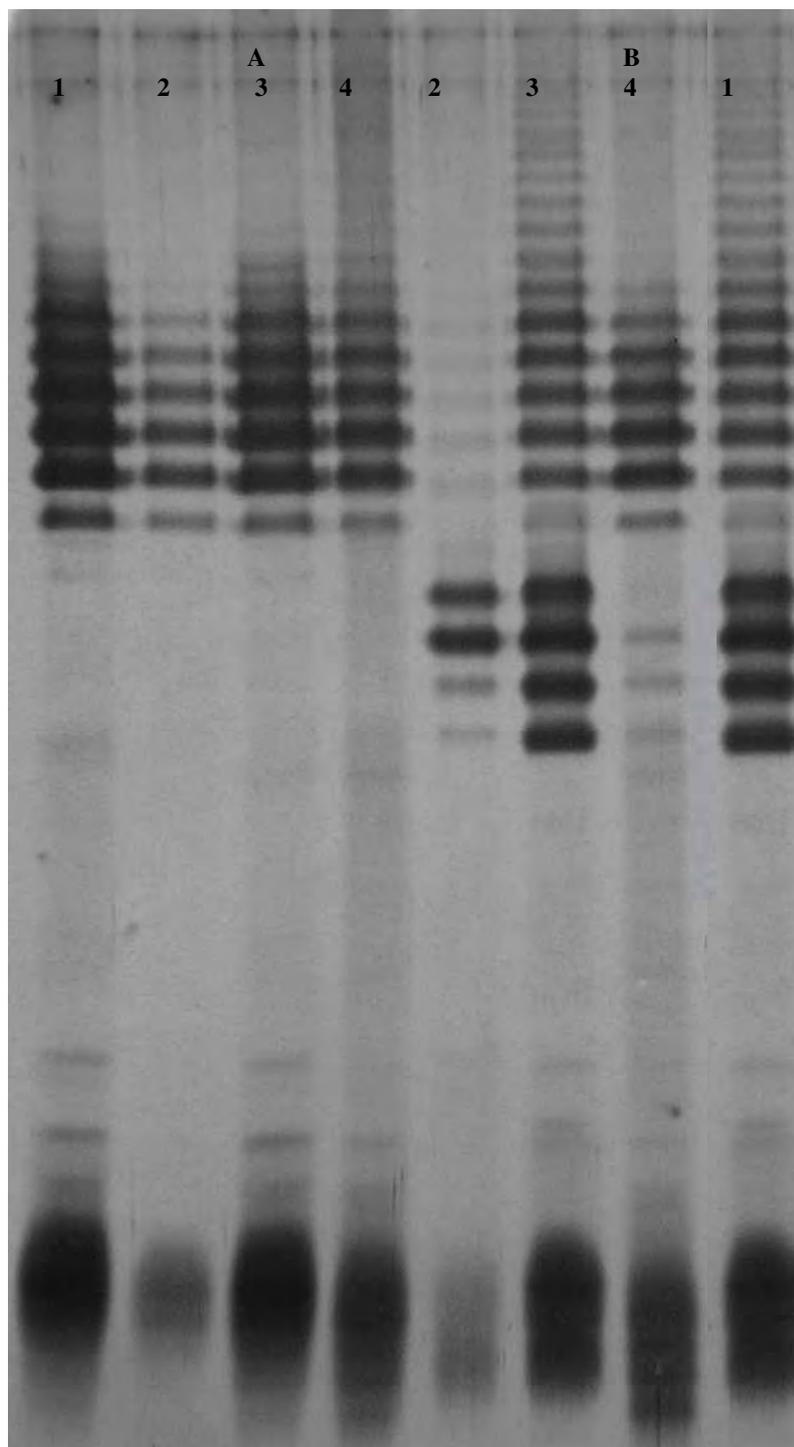


Figura 23. SDS-PAGE dos lipopolissacarídeos da parede celular das estirpes de *Rhizobium tropici* SEMIA 4077 (A) e 4080 (B), crescidas em glicerol, galactose, glicose e sacarose, respectivamente, canaletas 1, 2, 3 e 4.

Nota-se que o perfil eletroforético do LPS das células da estirpe SEMIA 4077, designada como estirpe padrão e que pertence ao tipo IIB (MARTÍNEZ-ROMERO *et al.*, 1991), não sofreu alterações em sua distribuição no gel, em função das diferentes condições de cultivo. A bactéria revela um perfil de LPS que pode ser considerado típico, com bandas equidistantes na porção médio superior do gel (antígeno-O), e as bandas de maior mobilidade característica da região do KDO e do Lipídio A, a qual é inserida dentro da bicamada da membrana externa e normalmente contém di-glucosamina-fosfato substituído por ácidos graxos. Entretanto, os LPSs da estirpe SEMIA 4080, que apresenta propriedades fisiológicas intermediárias entre os tipos IIA e IIB de *R. tropici* (HUNGRIA *et al.* 2000), se modificaram em função das condições de cultivo, porém, podemos observar grande semelhança entre os perfis do LPS quando a bactéria foi cultivada em meio contendo glicerol e em meio com glicose.

Várias estirpes de rizóbio diferem na composição do LPS, serologia, e no padrão dos géis com SDS como indicado em outros trabalhos (CARLSON *et al.* 1978, LIPSANEN & LINDSTRÖM 1989, YOKOTA & SAKANE 1991, CARARETO-ALVES & LEMOS 1996) O método de SDS-PAGE de LPSs tem sido amplamente utilizado como "screening" para diversidade de rizóbio. Este método permite, principalmente, diferenciar estirpes e espécies (RADEMAKER & BRUIJIN, 1997), sendo considerado uma ferramenta útil para o estudo da diversidade de microrganismos em geral e tem sido aplicado no estudo de diazotróficos simbióticos (MOREIRA *et al.*, 1993; DUPUY *et al.*, 1994; LAJUDIE *et al.*, 1994). Além disso, VANDAMME *et al.* (1990), KAMPFER (1995) e VANDAMME *et al.* (1997) demonstraram haver alta correlação entre resultados de hibridização DNA:DNA e do perfil eletroforético de LPS e proteínas.

A heterogeneidade do perfil de lipopolissacarídeos da célula, determinada por eletroforese em SDS-PAGE, permite a discriminação entre estirpes, detectando possíveis diferenças entre as pertencentes à mesma espécie ou sorogrupo, e inclusive da mesma estirpe cultivada em diferentes condições de

cultivo, pois o método tradicional de coloração com nitrato de prata é muito sensível, corando quantidades em nanogramas.

Pelo fato dos LPSs serem considerados como prováveis biomoléculas responsáveis pelo reconhecimento e união dos endossimbiontes às raízes das plantas, por apresentarem atividade antigênicas altamente específicas, é usual a relação entre a composição destes e sua hospedeira. Destas informações podemos concluir que uma mesma planta hospedeira pode ter relações simbióticas com mais de um tipo de simbiote, possivelmente ao nível de gênero, já que perfis eletroforéticos completamente diferentes foram obtidos de estirpes pertencentes à mesma espécie, *Rhizobium tropici*, da mesma planta hospedeira, feijoeiro.

6. Avaliação do processo de nodulação.

As duas estirpes de *Rhizobium tropici* SEMIA 4077 e SEMIA 4080 foram igualmente eficientes em nodular a cultivar, pois comparando as médias entre os tratamentos (Tabela 8) não se observaram diferenças significativas (teste F, $P > 0,01$).

Mesmo a estirpe *R. tropici* SEMIA 4080, apresentando grande quantidade de EPS liberado no meio de cultura, não apresentou diferença significativa no número de nódulos em relação aos tratamentos de inoculação com a estirpe *R. tropici* SEMIA 4077, sugerindo que o número de nódulos é regulado tanto por sinais internos como externos (LONG, 2001).

Tabela 8. Avaliação do Número médio de Nódulos (NN) ^(1, 2) e Massa Seca dos Nódulos (MSN) ^(1, 3) em cultivar de feijão IAC - Carioca submetida à inoculação das estirpes de *Rhizobium tropici* SEMIA 4077 e SEMIA 4080.

Tratamentos ⁽⁴⁾	NN	MSN
Test. s/inoc. ⁽⁵⁾	----	----
SEMIA 4077 (1)	162,250 a	32,671 b
SEMIA 4077 (2)	181,000 a	33,159 b
SEMIA 4077 (3)	161,500 a	40,669 b
SEMIA 4077 (4)	149,750 a	41,490 b
SEMIA 4080 (1)	161,500 a	55,229 a
SEMIA 4080 (2)	165,750 a	59,198 a
SEMIA 4080 (3)	173,500 a	59,719 a
SEMIA 4080 (4)	173,000 a	56,021 a
C.V. (%)	14,050	33,370
Média geral	166,031	47,270

⁽¹⁾ Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. ⁽²⁾ Resultados expressos em número de nódulos por planta. ⁽³⁾ Resultados expressos em mg de nódulos secos por planta. ⁽⁴⁾ Inoculante preparado a partir de estirpes cultivadas, multiplicadas separadamente, em meio definido contendo: glicerol (1); galactose (2); glicose (3); e sacarose (4), como fonte de carbono, à temperatura de 28°C, sob agitação constante de 140 rpm, até serem obtidas 10⁸ bactérias. mL⁻¹. ⁽⁵⁾ Não considerado na análise estatística.

O fato das estirpes *R. tropici* SEMIA 4077 e SEMIA 4080 não diferirem no número de nódulos, também pode estar relacionado à adesão das bactérias às raízes. Em diversos estudos foi constatado que apenas uma pequena proporção das bactérias presentes no meio é capaz de aderir às raízes, embora os sítios de adesão permaneçam insaturados mesmo em concentrações de 10⁸ células.mL⁻¹ (PUEPPKE, 1983). Diversos fatores estão envolvidos nessa adesão, como a fase de desenvolvimento da cultura bacteriana (SMITH & WOLLUM, 1991), e existem zonas radiculares mais suscetíveis à nodulação, cuja maior capacidade de aderência ocorre somente por algumas horas (SMITH & WOLLUM, 1989).

Em relação à massa seca dos nódulos, em todas as condições de preparo do inoculante, a cultivar estudada, IAC - Carioca, apresentou maior massa seca nodular com *R. tropici* SEMIA 4080 (Tabela 8). Por outro lado, a estirpe *R. tropici*

SEMIA 4077 apresentou um pior desempenho quanto à massa seca dos nódulos, considerando-se todas as condições de preparo do inoculante.

FRANCO *et al.* (2002) determinando a capacidade de nodulação e a especificidade de feijão dos conjuntos gênicos andino e meso-americano submetidos à inóculo de *Rhizobium*, verificaram que em nenhuma cultivar houve destaque da estirpe *R. tropici* CIAT 899 (= SEMIA 4077) em relação à produção de massa nodular, evidenciando a sua baixa especificidade, já amplamente documentada na literatura (MARTÍNEZ-ROMERO *et al.*, 1991), o que justifica o comportamento observado no presente trabalho. Apesar desta característica, SEMIA 4077 é considerada a estirpe-padrão da espécie *R. tropici* e pertence ao tipo IIB (MARTÍNEZ-ROMERO *et al.*, 1991), utilizada na maioria das pesquisas, e também recomendada para a produção de inoculante rizobiano em feijão, no Brasil (HUNGRIA, 2000). A SEMIA 4080 apresenta propriedades fisiológicas intermediárias entre os tipos IIA e IIB de *R. tropici* (HUNGRIA *et al.*, 2000), mas sua posição taxonômica ainda precisa ser definida.

V. CONCLUSÕES.

- Há diferenças no comportamento entre as duas estirpes de *Rhizobium tropici*, SEMIA 4077 e SEMIA 4080 cultivadas em meio definido com alterações nas fontes de carbono,
- A estirpe SEMIA 4080 apresenta maior produtividade em relação à outra estirpe, independente da fonte de carbono utilizada durante o cultivo.
- Ocorrem variações nas proporções dos monossacarídeos encontrados na composição dos EPS das estirpes avaliadas, em função das alterações na fonte de carbono presente no meio de cultura.
- Apenas ocorre influência da utilização de diferentes fontes de carbono no perfil eletroforético do LPS da estirpe de *Rhizobium tropici* SEMIA 4080.
- As duas estirpes de *Rhizobium tropici*, SEMIA 4077 e SEMIA 4080, são igualmente eficientes em nodular a cultivar, IAC-Carioca, independente da fonte de carbono utilizado no cultivo das bactérias.

VI. REFERÊNCIAS.

- AMARGER, N.; MACHERET, V.; LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Reading, v.47, p.996-1006, 1997.
- BECKER A, RUBERG S, KUSTER H, ROXLAU AA, KELLER M. The 32-kilo base exp gene cluster of *Rhizobium meliloti* directing the biosynthesis of galactoglucan: genetic organization and properties of the encoded gene products. *Journal of Bacteriology*, Washington v.179, p.1375-84, 1997.
- BECKER, A.; FRAYSSE, N.; SHARYPOVA, L. Recent advances in studies on structure and symbiosis-related function of rhizobial K-antigens and lipopolysaccharides. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 9, p.899–905, 2005.
- BECKER, A.; PÜHLER, A. Production of exopolysaccharides. In: SPAINK, H.P.; KONDOROSI, A.; HOOYKAAS, J.J. (Eds.). *The Rhizobiaceae*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. p. 97-118.
- BECKER, B. U.; K. KOSCH, M.; PARNISKE, P.; MÜLLER. Exopolysaccharide (EPS) synthesis in *Bradyrhizobium japonicum*: sequence, operon structure and mutational analysis of an *exo* gene cluster. *Molecular and General Genetics*, Berlin, v. 259, p.161-171, 1998.
- BISHOP, P. E.; GUEVARA, J. G.; ENGELKE, J. A.; EVANS, J. H. Relation between glutamine synthetase and nitrogenase activities in the symbiotic association between *Rhizobium japonicum* and *Glycine max*. *Plant Physiology*, Rockville, v.57, p.542-546, 1976.
- BREEDVELD, M. W.; ZEVENHUIZEN, L. P.; ZEHNDER, A. J. Excessive excretion of cyclic beta-(1,2)-glucan by *Rhizobium trifolii* TA-1. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.56, n.7, p.2080-6, 1990.
- BREWING, N.J. Development of the legume root nodule. *Ann. Rev. Cell Biol*, Palo Alto, v.7, p.191-226, 1991.

- CARARETO-ALVES, L. M. E.; LEMOS, E. G. M. Use of lipopolysaccharides to characterize *Bradyrhizobium* spp. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.28, p.1227-1234, 1996.
- CARLSON, R.W. et al. 1978. Host-symbiont interactions. III Purification and partial characterization of *Rhizobium* lipopolysaccharides. *Plant Physiology*, v.62, p.912-917.
- CARLSON, R.W., LEE, R. A comparison of the surface polysaccharides from *Rhizobium leguminosarum* 128C53 sm(r) rif(r) with the surface polysaccharides from its exo (-1) mutant. *Plant Physiology*, v. 71, p. 223-228. 1983.
- CARRION, M.; BHAT, U. R.; REUHS, B.; CARLSON, R. W. Isolation and Characterization of the Lipopolysaccharides from *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of Bacteriology*, Washington, v.172, p.1725-1731, 1990.
- CASTELLANE, T. C. L. Composição dos exopolissacarídeos produzidos por diferentes estirpes padrões de rizóbio. 2004. 95f Monografia (Graduação em Agronomia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.
- VICARI, M. V. Caracterização biológica de quatro estirpes de *Bradyrhizobium* spp. 1992. 93f Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético Vegetal). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1992.
- DEMAIN, A. L. Small bugs, big business: the economic power of microbe. *Biotechnology Advances*, n.18, p.499-514, 2000.
- CHEN W. M., et al. Nodulation of Mimosa spp. by the beta-proteobacterium *Ralstonia taiwanensis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, St. Paul, v.16, p.1051-1061, 2003.
- CHI, Z. & ZHAO, S. Optimization of medium and cultivation conditions for pullulan production by a new pullulan-producing yeast strain. *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 206-211, 2003

COLETTA FILHO, H.D. Avaliação da fixação biológica do N₂ em genótipos de feijoeiro. 1993. 72p. Dissertação (Mestrado), CENA, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1993.

DARNELL, J.; LODISH, H.; BALTIMORE, D. *Molecular Cell Biology*, 2Ed., Scientific American Books, Inc.; New York, 1990; p. 3,4.

DAZZO, F.B.; TRUCHET, G.L.; SHERWOOD, J.E.; HRABEK, E.M.; ABE, M.; PANKRATZ, S.H. Specific phases of root hair attachment in the *Rhizobium trifolii* – clover symbiosis. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.48, p.1140-1150, 1984.

De MAAGD, R.A.; VAN ROSSUM, C.; LUGTENBERG, B.J.J. Recognition of individual strains of fast-growing rhizobia by using profiles of membrane proteins and lipopolysaccharides. *Journal of Bacteriology*. Washington, v.170, p.3782-3785, 1988.

De LAJUDIE, P.; WILLENS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D.; MAESTROJUAN, G.; NEYRA, M.; COLLINS, M.D.; DREYFUS, B.; KERSTERS, K.; GILLIS, M. Polyphasic taxonomy of rhizobia: Emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* com. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *International Journal Systematic of Bacteriology*, Baltimore, v.44, p.715-733, 1994.

DUDMAN, W. F. Structural studies of the extracellular polysaccharides of *R. japonicum* strains 71 A, CC 708 and CB 1795. *Carbohydrates Research*, v. 66, p.9-23, 1978.

DUSHA, I; OLÁH, B; SZEGLETES, Z; ERDEI, L; KONDOROSI, A. *syrM* is involved in the determination of the amount and ratio of the two forms of the acidic exopolysaccharide EPSI in *Rhizobium meliloti*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, St. Paul, v.9, p.755-65, 1999.

FORATO, L.A.; BICUDO, T.C.; COLNAGO, L.A. Conformation of α zeins in solid state by Fourier transform IR. *Biopolymers*, v.72, p.421–426, 2003.

FRANCO, M.C.; CASSINI, S.T.A.; OLIVEIRA, V.R.; VIEIRA, C.; TSAI, S.M. Nodulação em cultivares de feijão dos conjuntos gênicos andino e meso-

- americano. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.37, n.8, p.1145-1150, 2002.
- FRAYSSE, N.; COUDERC, F.; POINSOT, V. Surface polysaccharide involvement in establishing the *rhizobium*-legume symbiosis. *Eur. J. Biochem.*, v.270, p.1365-1380, 2003.
- FRED, E.B., BALDWIN, I.L.; MCCOY, E. *Root nodule bacteria of leguminous plants*. Madison: University of Wisconsin Press, 1932. 343p.
- FU, D.; O'NEILL, R. A. Monosaccharide composition analysis of oligosaccharides and glycoproteins by high - performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, v. 227, p. 377-384, 1995.
- GONZALEZ, J.E.; REUHS, B.L. & WALKER, G.C. Low molecular weight EPS II of *Rhizobium meliloti* allows nodule invasion in *Medicago sativa*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* v.93, 8636-8641, 1996.
- GRAHAM, P. H. Studies on the utilization of carbohydrates and Krebs cycle intermediates by rhizobia, using an agar plate method. *Antonie van Leeuwenhoek*, Dordrecht, v.30, p.68-72, 1964.
- GRAY, J. X.; B. G. ROLFE. Exopolysaccharide production in *Rhizobium* and its role in invasion. *Molecular Microbiology*, Oxford, v.4, p.1425-1431, 1990.
- HANCOCK, R.E.W. Bacterial outer membranes: evolving concepts. *ASM News*, v.54, p.175-182, 1991.
- HOTTER, G. S.; SCOTT, B. Exopolysaccharide mutants of *Rhizobium loti* are fully effective on a determinate nodulating host but are ineffective on an indeterminate nodulating host. *Journal of Bacteriology*, Washington, v. 173, p.851-859, 1991.
- HUBER, T. A.; AGARWAL, A. K.; KEISTER, D. L. Extracellular polysaccharide composition, ex. planta nitrogenase activity and DNA homology in *Rhizobium japonicum*. *Journal of Bacteriology*, Washington, v.158, p.1168-1171, 1984.
- HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; CHUEIRE, L.M.O.; PROBANZA, A.; GUTTIERREZ-MAÑERO, F.J.; MEGÍAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.32, p.1515-1528, 2000.

- HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.R.; PERES, J.R.R. Fixação biológica do nitrogênio na soja. In: ARAUJO, R.S.; HUNGRIA, M. (Eds.). *Microrganismos de importância agrícola*. Brasília: Embrapa-SPI, 1994. p.9-89.
- JORDAN, D.C. *Rhizobiaceae* Conn 1938. In: KRIEG, N.R. & HOLT, J.G. (Eds.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore/London, Williams & Wilkins, 1984. p.235-244.
- KARR, D. B.; RONG-TI, L.; REUHS, B. L.; EMERICH, D. W. Altered exopolysaccharides of *Bradyrhizobium japonicum* mutants correlate with impaired soybean lectin binding, but not with effective nodule formation. *Planta*, Berlin, v.211, p. 218-226, 2000.
- KIRICHENKO, E.V.; TITOVA, L.V.; YA-KOTS, S. The significance of exometabolites in the formation and operation of soybean-*Rhizobium* symbiosis. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v.40, n.5, p.490-493, 2004.
- KOSENKO, L.V.; KHAILOVA, G.F.; KORELOV, V.E. Fiziology Biokhim. Kul's Rast., v.33, n.4, p.347-354, 2001.
- LAEMMLI, V.L. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. London, v.227, p.680-685, 1970.
- LEIGH, J. A.; COPLIN, D. L. Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. *Annual Review of Microbiology*, Palo Alto, v.46, p.307-346, 1992.
- LOH J, STACEY G. Nodulation gene regulation in *Bradyrhizobium japonicum*: a unique integration of global regulatory circuits. *App. Environ. Microbiol.* 2003;69:1352-1360.
- LONG, S.R. Genes and signals in the *Rhizobium* -legume symbiosis. *Plant Physiology*, v.125, p.69-72, 2001.
- LOOIJESTEIJN, J. P.; TRAPET, L.; VRIES, E.; ABEE, T.; HUGENHOLTZ, J. Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v.64, p.71-80, 2001.

- MARTINEZ-DRETS, G.; ARIAS, A. Enzymatic basis for differentiation of *Rhizobium* into fast and slow-growing groups. *Journal of Bacteriology*, Washington, v.109, p.467-470, 1972.
- MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, E.; MERCANTE, F.M.; FRANCO, A.A.; GRAHAM, P.H.; PARDO, M.A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *International Journal of Systematic Bacteriology*, London, v.41, p.417-426, 1991.
- PACE, G. W.; RIGHELATO, R. C. Production of extracellular microbial polysaccharides. *Advances in Biochemical Engineering*, v.15, p.41-70, 1980.
- MENDES, I. C.; HUNGRIA, M. Resposta da soja à adubação nitrogenada na semeadura. (http://radiobras.gov.br/ct/artigos/2001/artigo_060701.htm), 2001.
- MENDRYGAL, K. E.; GONZALEZ, J. E. Environmental regulation of exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, Washington, v.182, p 599–606, 2000.
- MINAMISAWA, K. Comparison of extracellular polysaccharide composition, rhizobiotoxine production and hydrogenase phenotype among various strains of *B. japonicum*. *Plant Cell Physiology*, v.30, p.877-884, 1989.
- MOREIRA, A. S. *Produção, caracterização e aplicação de biopolímero sintetizado por cepas de Xanthomonas campestris pv pruni*. Tese de Doutorado – Programa de Doutorado em Biotecnologia, Centro de Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Pelotas, 2002
- MORT, A. J.; BAUER, W.D. Application of two new methods for cleavage of polysaccharides into specific oligosaccharide fragments. *Journal of Biology and Chemistry*, v.257, p.1870-1875, 1982.
- NAUMANN, D. Infrared Spectroscopy in Microbiology. In: MEYERS, R.A. (Ed.) *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Wiley, Chichester. 2000. p.102–131.
- NICOLÁS, M.F. *Comparação da composição de polissacarídeos extracelulares em estirpes de Bradyrhizobium por HPLC*. 1996. 84f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1996.

- NOEL, K.D.; DUELLI, D.M. *Rhizobium* lipopolysaccharide and its role in symbiosis. In: TRIPLETT, E.W. (Ed.). *Prokaryotic Nitrogen Fixation: a Model System for Analysis of Biological Process*. Wymondham: Horizon Scientific press, 2000. p. 415-431.
- O'NEILL, M.A.; DARVILL, A.G.; ALBERSHEIM, P. The degree of esterification and points of substitution by O-acetyl and O-(3-hydroxybutanoyl) groups in the acidic extracellular polysaccharides secreted by *Rhizobium leguminosarum* biovars *viciae*, *trifolii*, and *phaseoli* are not related to host range. *Journal Biological Chemistry*, v.266, p.9549–9555, 1991.
- OSIRO, D.; COLNAGO, L.A.; OTOBONI, A.M.M.B.; LEMOS, E.G.M.; de SOUZA, A.A.; COLETTA FILHO, H.D.; MACHADO, M.A. A kinetic model for *Xylella fastidiosa* adhesion, biofilm formation, and virulence. *FEMS Microbiology Letters*, v.236, p.313–318, 2004.
- PACE, G. Polímeros microbianos. In: BU'LOOCK, John; KRISTIANSEN, Bjorn. *Biotecnología Básica*. Traducción: Paloma Liras Padín. Zaragoza: Acribia, 1991. p. 449-462.
- PARNISKE, M.; KOSCH, K.; WERNER, D.; MÜLLER, P. ExoB mutants of *Bradyrhizobium japonicum* with reduced competitiveness for nodulation of *Glycine max*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, St. Paul, v. 6, p.99-106, 1993.
- PARNISKE, M.; SCHMIDT, P. E.; KOSCH, K.; MÜLLER, P. Plant defense responses of host plants with determinate nodules induced by EPS-defective *exoB* mutants of *Bradyrhizobium japonicum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, St. Paul, v. 7, p.631-638, 1994.
- PORTILHO, M. *Avaliação da produção de exopolissacarídeo insolúvel por duas linhagens de Agrobacterium sp*, Tese de doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciência de Alimentos, UNICAMP, 2002. 86p
- PUEPPKE, S. G. *Rhizobium* infection threads in root hairs of *Glycine max* (L.) Merr., *Glycine soja* Sieb. & Zucc., and *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Canadian journal of microbiology*, v.29, p.69-76, 1983.

- PUVANESARAJAH, V., SCHELL, F. M.; GERHOLD, D.; STACEY, G. Cell surface polysaccharides from *Bradyrhizobium japonicum* and a nonnodulating mutant. *Journal of Bacteriology*, Washington, v.169, p.137-141, 1987.
- RAETZ, C. R. H.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review Biochem.* v.71, p.635-700, 2002.
- REINHOLD, B. B.; CHAN, S. Y. ; REUBER, T. L. ; MARRA, A.; WALKER G. C.; REINHOLD V. N. Detailed structural characterization of succinoglycan, the major symbiotically important exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti* strain Rm1021. *Journal of Bacteriology*, Washington, v.176, p. 1997–2002, 1994.
- RIVAS R.; et al. Description of *Devosia neptuniae* sp. nov. that nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, an aquatic legume from India. *Syst Appl Microbiol*, v.26, p.47-53, 2003.
- RUSSA, R. et al. Structural analysis of lipid A from lipopolysaccharides of nodulating and non-nodulating *Rhizobium trifolii*. *Arch Microbiol.*, v.141, p.284-292, 1985.
- SÁ, N.M.H. *et al.* Selection and characterization of *Rhizobium* spp. strains stable and capable in fixing nitrogen in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Ver. Microbiol.*, v.24, p.38-48, 1993.
- SCHULTZE, M., KONDOROSI, A. Regulation of symbiotic root nodule development. *Anu. Rev. Genet.*, v. 32, p. 33-57, 1998.
- SEGOVIA, L.; YOUNG, J.P.W.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Washington, v.43, p.374-377, 1993.
- SILVA, F.R.; VETTORE, A. L.; KEMPER, E. L.; LEITE, A.; ARRUDA, P. Fastidiam gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, n.203, p.165-171, 2001.
- SMITH, G.B.; WOLLUM, A.G. Bacterial culture history affects the attachment of *Bradyrhizobium japonicum* to host *Glycine max* roots. *Canadian journal of microbiology*, v.37, n.10, p.730-736, 1991.

- SMITH, G.B.; WOLLUM, A.G. Nodulation of *Glycine max* by Six *Bradyrhizobium japonicum* Strains with Different Competitive Abilities. *Applied Environmental Microbiology*, v.55, p.1957-1962, 1989.
- SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. J. *Handbook for rhizobia: Methods in legume Rhizobium technology*. New York: Springer Verlag, 1994. 450p.
- SPAINK, H. P. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annual Review of Microbiology*, Palo Alto, v.54, p.257-288, 2000.
- STAEHELIN, C.; FORSBERG, L.S.; D'HAENZE, W.; GAO, M.; CARLSON, R.W.; XIE, Z.; PELLOCK, B.J.; JONES, K.M.; WALKER, G.C.; STREIT, W.R.; BROUGHTON, W.J. Exo-Oligosaccharides of *Rhizobium* sp. Strain NGR234 Are Required for Symbiosis with Various Legumes. *Journal of Bacteriology*, v.188, p.6168–6178, 2006.
- STRALIOTTO, R.; TEIXEIRA, M.G.; MERCANTE, F.M. Fixação biológica de nitrogênio: In: AIDAR, H.; KLUTHOCOUSKI, J.; STONE, L.F. eds. Produção do feijoeiro comum em várzeas tropicais. Santo Antônio de Goiás: Centro Nacional de Pesquisa Agropecuária de Arroz e Feijão, 2002. p.123-153.
- SUTHERLAND, I. W. Bacterial surface polysaccharides: structure and function. *Int. Rev. Cytol.* v. 113, p. 187-231, 1988.
- SUTHERLAND, I. W. Microbial polysaccharides from gram-negative. *International Dairy Journal*, Barking, n.11, p.663-674, 2001.
- SUTHERLAND, I. W. Polysaccharases for microbial exopolysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, v.38, p. 319-328, 1999.
- TAVERNIER, P.; BESSON, I.; PORTAIS, J. C.; COURTOIS, J.; COURTOIS, B.; BARBOTIN, J. N. *In vivo* ¹³C- NMR studies of polymer synthesis in *Rhizobium meliloti* M5N1 strain v.58, p.250-253, 1998.
- TSAI, C.M., FRASCH, C.E. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrilamide gels. *Analytical Biochemistry*, v.119, p.115-119, 1982.

- TSAI, S.M. *et al.* Minimizing the effect of mineral nitrogen on biological nitrogen fixation in common bean by increasing nutrient levels. *Plant Soil*, Dordrecht, v.152, p.131-138, 1993.
- VAN BERKUM, P.; EARDLY, B. D. The Aquatic Budding Bacterium *Blastobacter denitrificans* Is a Nitrogen-Fixing Symbiont of *Aeschynomene indica*. *Applied and environmental microbiology*, Washington, v.68, p.1132-1136, 2002.
- VANDAMME, P., HOLMES, B., VANCANNEYT, M., COENYE, T., HOSTE, B., COOPMAN, R., REVETS, H., LAUWERS, S., GILLIS, M., KERSTERS, K., AND GOVAN, J.R. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.47, p.1188–1200, 1997.
- VANDAMME, P.; *et al.* *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. *Syst Appl Microbiol.* v.25, p.507-512, 2002.
- VEDAM, V.; HAYNES, J.G.; KANNENBERG, E.L.; CARLSON, R.W.; SHERRIER, D.J. A *Rhizobium leguminosarum* lipopolysaccharide lipid-A mutant induces nitrogen-fixing nodules with delayed and defective bacteroid formation. *Molecular and General Genetics*, Berlin, v.17, n.3, p.283-291, 2004.
- VERMANI, M. V.; KELKAR, S. M.; KAMAT, M Y. Production and optimization of certain growth parameters for an exopolysaccharide from *Azotobacter vinelandii* MTCC 2460 isolated from a plant rhizosphere. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, Osaka, v.80, n.6, p.599-602, 1995.
- VINCENT, J. M. *A manual for the practical study of root nodule bacteria*. ICB HandBook, 15, Oxford: Blackwell Scientific, 1970. p.200
- VORHÖITER, F. J., NIEHAUS, K.; PÜHLER, A. Lipopolysaccharide biosynthesis in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: a cluster of 15 genes is involved in the biosynthesis of the LPS O-antigen and the LPS core. *Molecular Genetics and Genomics*, v.266, p.79-95, 2001.
- WESTPHAL, O., JANN, K. Bacterial lipopolysaccharides. *Methods Carbohydr. Chem.*, v.5, p.83-91. 1965.

WHITFIELD, C. Bacterial extracellular polysaccharides. *Can. J. Microbiol.* v. 34, p. 415-420, 1988.

WHITFIELD, C. Bacterial extracellular polysaccharides. *Can. J. Microbiol.* v. 34, p. 415-420, 1988.

WHITFIELD, C.; ROBERTS, I. S. Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, Salem, n.31, p.1307-1319, 1999.

YONES A, ACHOMAK W, MAROL C; HEULIN T. Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflower roots. *App. Environ. Microbiol.* 2000; 66:3393-3398.

ZAHRAN, H. H. Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *Journal of Biotechnology*, Washington, v.91, p.143-153, 2001.

ZAKHIA, F. & LAJUDIE, P. Taxonomy of rhizobia. *Agronomie*, v.21, p.569-576, 2001.

ZEVENHUIZEN, L.P.T.M. Cellular glycogen, β -1,2,glucan, poly-3-hydroxybutyric acid and extracellular polysaccharides in fast-growing species of *Rhizobium*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 47, p. 481-497, 1981.

ZEVENHUIZEN, L.P.T.M. Succinoglycan and galactoglucan. *Carbohydr. Polym.*, v.33, p.139-144, 1997.

ZOHURIAAM, M. J.; SHOKROLAHI, F. Thermal studies on natural and modified gums. *Polymer Testing*. v. 23, p. 575-579, 2004.

Nome do arquivo: Diss_CASTELLANE.doc
Pasta: C:\Documents and Settings\lbmp\Desktop
Modelo: C:\Documents and Settings\lbmp\Dados de aplicativos\Microsoft\Modelos\Normal.dot
Título: UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Assunto:
Autor: XP
Palavras-chave:
Comentários:
Data de criação: 18/7/2007 11:29:00
Número de alterações: 24
Última gravação: 25/7/2007 14:36:00
Salvo por: lbmp
Tempo total de edição: 266 Minutos
Última impressão: 25/7/2007 15:01:00
Como a última impressão
Número de páginas: 87
Número de palavras: 19.327 (aprox.)
Número de caracteres:104.367 (aprox.)